

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a žádám, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Markéta Kráčmarová

Analýza vlivu mutací v C-terminální doméně na vnitrobuněčnou lokalizaci nukleofosminu

Analysis of the intracellular localization of nucleophosmin: effect of C-terminal mutations

Diplomová práce

Školitelka: Mgr. Barbora Brodská, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 14.8.2016

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Barboře Brodské PhD., za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a čas, který mi věnovala během vypracování této diplomové práce. Také za podporu a neustálý optimismus. Též bych ráda vyjádřila své poděkování všem členům naší laboratoře, zejména RNDr. Alešovi Holoubkovi, PhD., za trpělivost a laskavou pomoc při konstrukci plazmidů a transfekci buněk. Děkuji RNDr. Haně Španielové, Ph.D, za ochotné konzultace.

Zvláštní poděkování patří mým rodičům za umožnění studia a vytvoření vhodných studijních podmínek, Mgr. Alžbětě Vašíkové, PhD., za cenné připomínky a postřehy a Mgr. Petru Šašinkovi za psychickou podporu a pochopení.

Abstrakt

Mutace v C-koncové části genu pro nukleofosmin (NPM) patří mezi časté genetické aberace u nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML). Ve své práci jsem se zaměřila na charakterizaci C-terminálních mutací typu A, B a E u onemocnění AML. Za účelem sledování lokalizace a chování tohoto proteinu byly zkonstruovány tři vektory nesoucí gen pro NPM s jednotlivými mutacemi a jeden vektor s intaktním genem pro NPM. K produkci rekombinantních proteinů byly zvoleny tři savčí expresní systémy buněčných linií HEK293T, HeLa a NIH 3T3. Fluorescenční mikroskopii a nepřímou imunodetekcí byla popsána vnitrobuněčná lokalizace mutovaných forem NPM (mutNPM). MutNPM typu A a B vykazovaly téměř identickou, převážně cytoplazmatickou lokalizaci, zatímco mutNPM typu E byl přítomný v jadérku i cytoplazmě současně. Lokalizace jednotlivých mutovaných forem však byla výrazně ovlivněna použitou buněčnou linií. Bylo prokázáno, že exogenní a endogenní NPM spolu interagují a skrze oligomerizaci vzájemně ovlivňují svoji vnitrobuněčnou lokalizaci.

Studium genetických aberací má význam nejen pro klasifikaci nemocných do jednotlivých prognostických skupin, ale také v objasnění patogeneze nádorových onemocnění. Analýza vztahu mezi typem mutace a lokalizací mutovaného NPM pomáhá porozumět vlivu konkrétní mutace *NPM* na vznik a progresi AML a specifikovat její prognostický význam. Nové poznatky z výzkumu mutací *NPM* mohou být přínosem pro vývoj nových léčiv, zvláště pak v oblasti cílené terapie.

Klíčová slova: mutovaný nukleofosmin, leukémie, vnitrobuněčná lokalizace, oligomerizace, jadérko, exprese nukleofosminu

Abstract

C-terminal mutations of the phosphoprotein nucleophosmin (NPM) are the most frequent genetic aberration detected in adult acute myeloid leukemia (AML). I focused on characterization of type A, B and E of AML-related C-terminal mutations. The plasmids bearing fluorescently labeled wild type or mutated NPM have been constructed to characterize mutation-induced changes in the localization of NPM. Mammalian cell lines HEK293T, HeLa and NIH 3T3 were used for production of the chimeric proteins. The intracellular localization of the mutated forms of NPM was analyzed by immunofluorescence staining and fluorescence microscopy of the living cells. The localization of the mutNPM type A and B was almost identical and predominantly cytoplasmic, while mutNPM type E was detected in nucleolus and cytoplasm simultaneously. However localization of the mutated forms was greatly influenced by the used cell line. It has been demonstrated that the exogenous NPM interacts with the endogenous NPM and that they mutually affect their intracellular localization due to heterooligomer formation.

Detailed analysis of the relationship between the C-terminal mutations and the localization of the mutated NPM improves understanding of specific mutation effect on the formation and progression of AML and also specifies its prognostic meaning. Further investigation of NPM mutations might uncover new possibilities of drug development especially in case of targeted therapy.

Key words: mutated nucleophosmin, leukemia, intracellular localization, oligomerization, nucleolus, nucleophosmin expression

Obsah

1	ÚVOD	11
2	PŘEHLED LITERATURY	12
2.1	Leukémie.....	12
2.1.1	Typy leukémií	12
2.1.1.1	Akutní myeloidní leukémie (AML)	13
2.1.1.1.1	Etiologie.....	13
2.1.1.1.2	Klinické příznaky.....	14
2.1.1.1.3	Diagnóza	14
2.1.1.1.4	Klasifikace.....	14
2.1.1.1.5	Léčba	17
2.1.1.2	AML s mutovaným nukleofosminem	18
2.2	NPM.....	19
2.2.1	NPM1.....	20
2.2.1.1	Lidský <i>NPM1</i>	21
2.2.1.2	NPM1 a rakovina	22
2.2.1.3	Struktura NPM1.....	23
2.2.1.4	Funkce NPM1	25
2.2.1.5	Interakční partneři NPM1	26
2.2.1.5.1	NPM1 a p53	26
2.2.1.5.2	NPM1 a ARF	27
2.2.1.6	Posttranslační modifikace NPM1.....	28
2.2.1.7	Transport.....	29
2.2.1.8	Mutace NPM1	30
2.2.1.9	Oligomerizace.....	34
3	CÍLE.....	36
4	MATERIÁL A METODY.....	37
4.1	Materiál	37
4.1.1	Použité přístroje	37
4.1.2	Chemikálie.....	38
4.1.2.1	Chemikálie.....	38
4.1.2.2	Roztoky	40
4.1.3	Vektory.....	43
4.1.4	Buněčné linie	45
4.1.5	Bakteriální kmeny	46
4.1.6	Kity.....	46
4.1.7	Primery pro PCR reakce.....	46
4.1.7.1	Primery pro mutagenní PCR	46
4.1.7.2	Primery pro sekvenační PCR.....	47
4.1.8	Antibiotika.....	47
4.1.9	Protilátky.....	47

4.1.9.1	Primární protilátky.....	47
4.1.9.2	Sekundární protilátky.....	48
4.1.10	Markery molekulových vah.....	48
4.1.10.1	DNA marker molekulových vah.....	48
4.1.10.2	SDS-PAGE marker molekulových vah.....	48
4.2	Metody	48
4.2.1	Sterilizace	48
4.2.2	Práce s bakteriálními kulturami.....	48
4.2.2.1	Kultivace bakterií.....	48
4.2.2.2	Trasformace plazmidové DNA do kompetentních bakterií <i>E. coli</i>	49
4.2.2.3	Příprava konzerv z bakterií <i>E. coli</i>	49
4.2.3	Práce s DNA.....	50
4.2.3.1	Příprava genů obsahujících mutace.....	50
4.2.3.2	Štěpení DNA restrikčními enzymy	51
4.2.3.3	Agarózová gelová elektroforéza a izolace DNA z gelu.....	52
4.2.3.4	Klonování mutovaných genů do příslušných plazmidů	52
4.2.3.5	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> teplotním šokem.....	53
4.2.3.6	Izolace plazmidové DNA pomocí „Boiling miniprep“	53
4.2.3.7	Izolace plazmidu ve vysoké čistotě pomocí kitu Promega	54
4.2.3.8	Spektrofotometrické metody.....	55
4.2.3.9	Sekvenace	55
4.2.4	Práce s tkáňovými kulturami	55
4.2.4.1	Práce s kulturou buněčné linie HEK293T.....	55
4.2.4.1.1	Pasážování	55
4.2.4.1.2	Počítání buněk	56
4.2.4.1.3	Transfekce rekombinantním plazmidem	56
4.2.4.1.4	Nepřímá imunodetekce.....	57
4.2.4.2	Práce s kulturou buněčné linie HeLa.....	57
4.2.4.2.1	Pasážování	57
4.2.4.2.2	Počítání buněk	58
4.2.4.2.3	Transfekce rekombinantním plazmidem	58
4.2.4.2.4	Fixace.....	58
4.2.4.3	Práce s kulturou buněčné linie NIH 3T3	58
4.2.4.3.1	Pasážování	58
4.2.4.3.2	Počítání buněk	58
4.2.4.3.3	Transfekce rekombinantním plazmidem	58
4.2.5	Práce s proteiny.....	58
4.2.5.1	Příprava buněčných lyzátů pro SDS-PAGE.....	58
4.2.5.2	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	59
4.2.5.3	Western blot	59
4.2.5.4	Imunodetekce proteinů imobilizovaných na PVDF membráně	60
4.2.5.5	Průtoková cytometrie	60
4.2.6	Statistická analýza.....	61
5	VÝSLEDKY	62
5.1	Konstrukce plazmidů nesoucích gen pro wtNPM a jeho mutované formy	62
5.2	Expres mutovaných forem NPM a wtNPM	65

5.3	Sledování lokalizace kotransfekovaných proteinů.....	70
5.4	Nepřímá imunodetekce.....	75
5.5	Účinnost transfekce a hladina exprese vnášeného plazmidu.....	77
5.5.1	FACS.....	77
5.5.2	Western blot analýza.....	78
5.5.2.1	HeLa.....	78
5.5.2.2	NIH 3T3.....	79
5.5.2.3	HEK293T.....	80
5.5.3	Intenzita fluorescence eGFP.....	82
6	DISKUZE.....	83
7	SOUHRN.....	87
8	SEZNAM LITERATURY.....	88

Seznam použitých zkratek

ALK	anaplastická lymfomová kináza (z ang. Anaplastic lymphoma kinase)
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AMK	aminokyselina
AML	akutní myeloidní leukémie
Ara-C	cytosinarabinosid
ARF	adenosindifosfát ribosylační faktor (z ang. Alternate reading frame)
B23	alternativní název pro nukleofosmin
BAX	člen BCL2 proteinové rodiny (z ang. BCL2 associated X protein)
BFM	bromfenolová modř
C23	nukleolin
<i>CBFβ</i>	gen kódující beta podjednotku transkripčního faktoru z PEBP2/CBF rodiny (z ang. Core-binding factor subunit beta)
CD34	antigen hematopoetických kmenových buněk
CDK1	cyklin-dependentní kináza 1 (z ang. Cyclin-dependent kinase 1)
CDK2	cyklin-dependentní kináza 2 (z ang. Cyclin-dependent kinase 2)
<i>CEBPα</i>	gen kódující transkripční faktor CEBP α (z ang. CCAAT/enhancer binding protein alpha)
CK2	kaseinová kináza II (z ang. casein kinase II)
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
CRM1	exportní protein (z ang. Chromosomal maintenance 1)
Da	dalton
<i>DEK</i>	protoonkogen kódující protein DEK
del	delece
DIC	diferenciální interferenční kontrast (z ang. differential interference contrast)
<i>DNMT3A</i>	gen kódující specifickou <i>de novo</i> methyltransferázu (z ang. DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha)
EtBr	ethidium bromid
<i>EVI1</i>	gen kódující transkripční faktor EVI1 (z ang. Ecotropic viral integration site-1)
FAB	Francouzsko-Americko-Britská klasifikace
FACS	průtoková cytometrie (z ang. Fluorescence-activated cell sorting)
<i>FLT3</i>	gen kódující receptorovou tyrosinovou kinázu (z ang. Fms-like tyrosine kinase 3)
<i>FLT3-ITD</i>	vnitřní tandemová duplikace genu <i>FLT3</i> (z ang. Internal tandem duplication)
GFP	zelený fluorescenční protein (z ang. green fluorescent protein)
HAUS1	z ang. HAUS augmin-like complex, subunit 1
HIF-1 α	transkripční faktor (z ang. Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HIV-1	z ang. Human immunodeficiency virus type 1
HREs	z ang. HIF-1- responsive elements
I	izoleucin

inv	inverze
J/m ²	joul/metr čtvereční (jednotky dávky ozáření)
Kan	kanamycin
kDa	kilodaltony
L	leucin
MDa	megadaltony
MDS	myelodysplastický syndrom
MDM2	specifická ubiquitin ligáza (z ang. Mouse double minute 2 homolog)
<i>MKL1</i>	gen kódující protein MKL1 (z ang. Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1)
MLF1	myeloidní leukemický faktor 1 (z ang. Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1)
<i>MLL</i>	gen kódující histon 3 lysin 4 specifickou methyltransferázu (z ang. Mixed-lineage leukemia)
<i>MLLT3</i>	gen kódující protein AF-9 (z ang. Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3)
mutNPM	mutovaný NPM
<i>MYH11</i>	gen kódující myosin-11 (z ang. Myosin heavy chain 11)
NES	jaderný exportní signál (z ang. Nuclear export signal)
NK	nukleové kyseliny
NLS	jaderný lokalizační signál (z ang. Nuclear localization signal)
NO28	alternativní název pro nukleofosmin
NO29	alternativní název pro NPM3
NoLS	jadéřkový lokalizační signál (z ang. Nucleolar localization signal)
NPM	nukleofosmin
<i>NPM1</i>	gen kódující nukleofosmin funkčního typu 1
NPM1-3	funkční typy nukleofosminu
<i>NPM1.1-1.3</i>	izoformy genu <i>NPM1</i>
NPMc+ AML	podskupina akutní myeloidní leukémie s cytoplazmaticky lokalizovaným nukleofosminem
NPMc+	cytoplazmaticky lokalizovaný nukleofosmin
<i>NUP214</i>	gen kódující nukleoporin 214 (z ang. Nucleoporin 214 kDa)
P	prolin
p	krátké raménko chromozomu
PBS	fosfátový pufr (z ang. Phosphate buffered saline)
PBS-T	0,5% roztok Tween20 v PBS
PBS-TW	0,2% roztok Tween20 v PBS
PEBP2/CBF	transkripční faktor - heterodimer (z ang. Polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor)
pre-rRNA	preribozomální RNA
<i>PML</i>	gen kódující tumor supresorový protein promyelocytární leukémie (z ang. Promyelocytic leukemia)
PVDF	polyvinyliden difluorid
q	dlouhé raménko chromozomu
RanGTP	z ang. Ras-related guanosine triphosphate binding nuclear protein
<i>RARα</i>	gen kódující receptor alfa kyseliny retinové (z ang. retinoic acid receptor α)

<i>RBM15</i>	gen kódující protein RBM15 (z ang. RNA Binding Motif Protein 15)
Rev	transkripční protein regulující expresi HIV-1
RFP	červený fluorescenční protein (z ang. red fluorescent protein)
RPL5	ribosomální protein L5 (z ang. Ribosomal protein large subunit)
RPL23	ribosomální protein L23 (z ang. Ribosomal protein large subunit)
RPS9	ribosomální protein S9 (z ang. Ribosomal protein small subunit)
<i>RPN1</i>	gen kódující riboforin I (z ang. Ribophorin I)
<i>RUNX1</i>	gen kódující transkripční faktor RUNX1 (z ang. Runt-related transcription factor 1)
<i>RUNX1T1</i>	gen kódující protein CBFA2T1 (z ang. Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1)
S	serin
SDS	dodecylsulfát sodný (z ang. Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
siRNA	krátká dvouvláknová ribonukleová kyselina (z ang. Small interfering RNA)
T	threonin
UV	ultrafialové záření
V	valin
t	translokace
W	tryptofan
WHO	světová zdravotnická organizace (z ang. The World Health Organization)
wt	wild type (divoký typ)

1 ÚVOD

Ve vyspělých státech patří nádorová onemocnění spolu s nemocemi srdce a cév k nejvýznamnějším příčinám úmrtí, pracovní neschopnosti a invalidity. Nádorové bujení je mnohastupňový proces vzniklý jako důsledek poškození genů. Tyto genetické aberace způsobují deregulaci buněčné proliferace, po níž následuje klonální expanze transformovaných buněk.

Akutní myeloidní leukémie (AML) patří mezi hematologické malignity. Nejčastější geneticky podmíněnou aberací, vyskytující se zhruba u 1/3 pacientů s AML, je mutace v C-koncové části nukleofosminu (NPM), fosfoproteinu podílejícím se mimo jiné na ribogenezi, kontrole buněčného cyklu a apoptóze. Vlivem mutací dochází u NPM ke ztrátě jadéřkového lokalizačního signálu, případně také ke tvorbě jadéřkového exportního signálu, což má ve většině případů za následek přesun mutované formy NPM z buněčného jadérka do cytoplazmy. Výskyt mutace NPM bez přítomnosti dalších aberací je pozitivním prognostickým ukazatelem pro léčbu AML. Příznivá odpověď na terapii pravděpodobně souvisí s nekorektní cytoplazmatickou lokalizací mutovaného NPM. Dosud bylo popsáno přibližně 60 C-koncových mutací, z nichž nejčastěji se u pacientů vyskytuje mutace typu A. Kromě posunových mutací v genu pro NPM byly u AML popsány také chromozomální translokace zahrnující tento gen. Většina výsledných fúzních proteinů vykazuje taktéž aberantní vnitrobuněčnou lokalizaci.

Tato práce analyzuje vztah mezi typem mutace a lokalizací mutovaného NPM. Prostřednictvím připravených konstruktů nesoucích mutace A, B a E byla definována a charakterizována vnitrobuněčná lokalizace mutovaného NPM a stanovena hladina jeho exprese v různých buněčných liniích. Aberantní lokalizace NPM společně s jeho schopností interagovat s řadou regulačních proteinů a tumor supresorů má důležitou roli v leukemické transformaci, a proto je detailní analýza mutací v genu pro NPM předpokladem jak pro pochopení patogeneze AML, tak pro vývoj nových terapeutik a úspěšnou léčbu.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Leukémie

Leukémie představuje heterogenní skupinu onkologických onemocnění kostní dřeně s různou prognózou a odpovědí na terapii (DING *et al.* 2015). Kostní dřeň je orgánem krvetvorby – zajišťuje vznik všech typů krevních buněk z buněk kmenových. Vlivem různých faktorů (viz kapitola Etiologie) může v průběhu vývoje krevní buňky dojít ke vzniku genových mutací vedoucích ke ztrátě kontroly proliferace a leukemické transformaci (BUČKOVÁ *et al.* 2013, s. 11-12). Abnormální zmnožení leukemických buněk vede obvykle k utlumení krvetvorby a tedy k poklesu počtu erytrocytů, trombocytů, příležitostně i leukocytů, jejichž hladina však ve většině případů bývá zvýšena (BUČKOVÁ *et al.* 2013, s. 11, VYDRA *et al.* 2015, s. 269).

2.1.1 Typy leukémií

Existuje mnoho druhů leukémií, v praxi se však využívá rozdělení na 4 základní typy (tab. 1) podle projevu a rychlosti průběhu této nemoci a dle typu postižené zárodečné buňky. Rychle probíhající leukémie, které mohou být bez léčby fatální během několika málo týdnů, jsou označovány jako akutní. V tomto případě jsou zmnoženými leukemickými buňkami nezralé zárodečné buňky kostní dřeně, tzv. blasty. Chronické leukémie naopak postupují pomaleji, pacienti přežívají bez léčby i několik let a jejich leukemické buňky vypadají jako zralé krevní buňky, ovšem jejich funkce je poškozena. Dalším kritériem pro dělení leukemií je jejich původ, respektive řada, ve které dochází k maligní transformaci. V případě myeloidní leukémie je zasažena myeloidní řada - monocyty, granulocyty, erytrocyty a megakaryocyty. Naopak lymfocytární leukémie se vyvíjí na základě maligní transformace lymfoidní kmenové buňky (přehledně v POKHAREL 2012 a ve VORLÍČEK *et al.* 2012, s. 380-381).

Tabulka č. 1. *Hlavní rozdělení leukémií* (inspirováno BUČKOVÁ *et al.* 2013, s. 13)

akutní	chronické
akutní lymfoblastická leukémie (ALL)	chronická lymfocytární leukémie (CLL)
akutní myeloidní leukémie (AML)	chronická myeloidní leukémie (CML)

2.1.1.1 Akutní myeloidní leukémie (AML)

AML je jedním ze čtyř základních typů leukémií. Jedná se o klonální onemocnění krvetvorby, které je charakterizováno maligní transformací kmenové hematopoetické buňky myeloidní řady a zástavou diferenciací na úrovni blastů. Následkem toho se nediferencované patologické blasty akumulují v kostní dřeni, utlačují fyziologickou krvetvorbu a postupně se vyplavují do krve. Typickými rysy buněk akutní leukémie jsou autonomní proliferace, porucha reparace DNA a porucha apoptózy (ADAM *et al.* 2001, s. 37; VYDRA *et al.* 2015, s. 267-268). AML je nejčastějším nádorovým myeloidním onemocněním dospělých, u nichž tvoří 80% všech leukémií (LIU *et al.* 2014). V dětské populaci představuje asi 15-20% leukémií, jedná se tedy o poměrně vzácné onemocnění (HALL 2001). Incidence v České Republice je 4/100 000 obyvatel, avšak s přibývajícím věkem zřetelně roste (VYDRA *et al.* 2015, s. 268). Počet nově zjištěných případů ve věkové kategorii nad 65 let dosahuje hodnot 15-17/100 000 obyvatel (ADAM *et al.* 2008, s. 29). Průměrný věk pacientů v době stanovení diagnózy se pohybuje okolo 66 let, přičemž toto onemocnění častěji postihuje muže (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>).

2.1.1.1.1 Etiologie

Příčina vzniku AML není zcela objasněna, ačkoli byly identifikovány některé faktory, které prokazatelně zvyšují riziko vzniku AML. Patří mezi ně některé chemické látky, ionizující záření, genetické předpoklady, předchozí léčba cytostatiky nebo jiné myeloproliferativní onemocnění. Ke karcinogenním chemikáliím patří především benzen, toluen či insekticidy. Rozvoj AML po předchozí terapii nastává v důsledku radiačního záření, cytostatické léčby (inhibitory topoizomerázy II, alkylační cytostatika) nebo radioterapie (přehledně v VYDRA *et al.* 2015, s. 268). Pokud je AML vyvolaná přímou expozicí kancerogenům, rozvíjí se obvykle skrze myelodysplastický syndrom (MDS) (ADAM *et al.* 2001, s. 37). U části pacientů je AML asociována s chromozomálními aberacemi. Jedná se zpravidla o nebalancované translokace, inverze na chromozomu 16 a delece postihující zejména chromozomy 5 a 7. V důsledku genetické nestability byla detekována zvýšená incidence AML u pacientů s onemocněními jako jsou Bloomův syndrom, Fanconioho anémie, či Kostmanův syndrom. Zvýšené riziko vzniku AML bylo popsáno i u některých vrozených chromozomálních anomálií, např. Downův

syndrom, Klinefelterův syndrom a Patauův syndrom (přehledně v ADAM *et al.* 2001, s. 37; ADAM *et al.* 2008, s. 29; VYDRA *et al.* 2015, s. 268).

2.1.1.1.2 Klinické příznaky

Většina pacientů vykazuje širokou škálu nespecifických klinických symptomů, které jsou způsobené útlakem normální krvinečky (LOWENBERG *et al.* 1999, HASSAN a SMITH 2014). Nedostatek erytrocytů (anémie) se projevuje únavou a dušností. Pokles počtu neutrofilních granulocytů (neutropenie) způsobuje sníženou odolnost vůči infekcím. Úbytek trombocytů (trombocytopenie) je příčinou krvácení ze sliznic, např. z dásní nebo nosní dutiny a krvácení do kůže v podobě petechií či rozsáhlejších hematomů (HASSAN a SMITH 2014, ADAM *et al.* 2001, s. 38). V případě, že počet leukocytů/blastů v krvi přesahuje 50 až 100×10^9 v litru krve (hyperleukocytóza), může dojít k manifestaci syndromu leukostázy, který se projevuje respiračními a neurologickými poruchami (PORCU *et al.* 2000). V důsledku infiltrace leukemickými buňkami se u některých pacientů může objevit i postižení jiných orgánů než krve a kostní dřeně. Nejčastěji bývají infiltrovány extramedulární tkáně jako jsou játra, slezina či lymfatické uzliny. Dále pak centrální nervová soustava, kůže a vzácně i dásně (PIPPARD *et al.* 1979, STEFANIDAKIS *et al.* 2009).

2.1.1.1.3 Diagnóza

Diagnóza AML je stanovena na základě vyšetření krevního obrazu a vzorku kostní dřeně (LOWENBERG *et al.* 1999). AML je potvrzena v případě, že je detekováno více než 20% nezralých blastů v periferní krvi či v kostní dřeni. Výjimku z tohoto pravidla představují AML s konkrétními typy chromozomálních přestaveb, konkrétně AML s $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)$, $t(15;17)(q22;q12)$ a některé typy erytroleukémií. V těchto případech je pro diagnózu dostačující přítomnost fúzního genu bez ohledu na počet blastů v kostní dřeni nebo periferní krvi (VARDIMAN *et al.* 2009).

2.1.1.1.4 Klasifikace

Rozčlenění heterogenní skupiny AML do jednotlivých podskupin má význam pro volbu léčebné strategie a zhodnocení prognózy. Jedním ze dvou celosvětově užívaných

klasifikačních systémů rozdělujících AML do podskupin je FAB klasifikace navržená v sedmdesátých letech minulého století skupinou francouzských, amerických a britských odborníků. Podle ní bylo na základě morfologického a cytologického vyšetření definováno 8 podskupin leukemií s označením M0-M7 (tab. 2) (BENNETT *et al.* 1976, 1985). Později, s rozvojem cytogenetiky a molekulární biologie, stanovila světová zdravotnická organizace (WHO; The World Health Organization) nový systém pro klasifikaci AML (tab. 3) zohledňující vedle morfologie a cytochemie také imunofenotyp, genetický profil a klinické rysy leukemických blastů. Dalším klíčovým kritériem souvisejícím s diagnózou AML bylo snížení hranice zastoupení blastů v kostní dřeni ze 30 % na 20 % (BENNETT *et al.* 1985, VARDIMAN *et al.* 2009).

Tabulka č. 2. FAB klasifikace AML (převzato z BENNETT *et al.* 1985, ADAM *et al.* 2008, s. 32-33)

FAB podskupina	název leukémie
M0	akutní myeloblastická nediferenciovaná leukémie
M1	akutní myeloblastická leukémie s minimálním vyzráváním blastů
M2	akutní myeloblastická leukémie s vyzráváním blastů
M3	akutní promyelocytární leukémie
M4	akutní myelomonocytární leukémie
M4eo	akutní myelomonocytární leukémie s eozinofílií
M5	akutní monocytární leukémie
M6	akutní erytrocytární leukémie
M7	akutní megakaryoblastická leukémie

Tabulka č. 3. WHO klasifikace AML (převzato z VARDIMAN *et al.* 2009)

t = translokace; q = dlouhé raménko chromozomu; *RUNX1* = Runt-related transcription factor 1; *RUNX1T1* = Runt-related transcription factor 1, translocated to, 1; inv = inverze; p = krátké raménko chromozomu; *CBFB* = Core-binding factor subunit beta; *MYH11* = gen kódující myosinový těžký řetězec 11 (Myosin heavy chain 11); *PML* = gen kódující tumor supresorový protein promyelocytární leukémie (Promyelocytic leukemia); *RARα* = gen kódující receptor alfa kyseliny retinové (retinoic acid receptor α); *MLLT3* = gen kódující protein AF-9 (Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3); *MLL* = gen kódující histon 3 lysin 4 specifickou methyltransferázu (Mixed-lineage leukemia); *DEK* = protoonkogen kódující protein DEK; *NUP214* = gen kódující nukleoporin 214 (Nucleoporin 214 kDa); *RPN1* = gen kódující riboforin I (Ribophorin 1); *EVI1* = Ecotropic viral integration site-1; *RBM15* = RNA Binding Motif Protein 15; *MKL1* = Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1; *NPM1* = gen kódující nukleofosmin (Nucleophosmin); *CEBPα* = CCAAT/enhancer binding protein alpha

AML s rekurentní genetickou abnormalitou
t(8;21)(q22;q22), fúzní gen <i>RUNX1</i> s <i>RUNX1T1</i>
inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22), fúzní gen <i>CBFB</i> s <i>MYH11</i>
t(15;17)(q22;q12), fúzní gen <i>PML</i> s <i>RARα</i>
t(9;11)(p22;q23), fúzní gen <i>MLLT3</i> s <i>MLL</i>
t(6;9)(p23;q34), fúzní gen <i>DEK</i> s <i>NUP214</i>
inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2), fúzní gen <i>RPN1</i> s <i>EVI1</i>
t(1;22)(p13;q13), fúzní gen <i>RBM15</i> s <i>MKL1</i>
AML s mutací v <i>NPM1</i> genu
AML s mutací v <i>CEBPα</i> genu
AML spojená s myelodysplázií
AML související s léčbou
AML blíže nespecifikovaná
AML s minimální diferenciací
AML bez vyzrávání
AML s vyzráváním
akutní myelomonocytární leukémie
akutní monoblastická a monocytární leukémie
akutní erytrocytární leukémie
akutní megakaryoblastická leukémie
akutní bazofilní leukémie
akutní panmyelóza s myelofibrózou
myeloidní sarkom
myeloidní proliferace spojené s Downovým syndromem
neoplázie z blastických plazmocytoidních dendritických buněk
AML s multilineární dysplázií

2.1.1.1.5 Léčba

Pro určení optimálního léčebného postupu je potřeba zohlednit několik faktorů, v první řadě věk a karyotyp pacienta. Další důležité markery vycházejí z výsledků molekulárně genetického vyšetření na přítomnost fúzních genů (např. *PML* s *RARα*, *CBFB* s *MYH11*) a mutací v genech *NPM1*, *CEBPα*, *DNMT3A* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha) či *FLT3* (Fms-like tyrosine kinase 3). Stanovení léčebného režimu závisí také na počtu leukocytů, performance statutu (Karnofského skóre) a zda je AML sekundární, tedy vzniklá na základě předchozí protinádorové terapie či rozvinutá z jiného hematologického onemocnění jako je MDS (LOWENBERG *et al.* 1999, VILLELA a BOLANOS-MEADE 2011). Princip protinádorové léčby může být kurativní či paliativní.

Kurativní léčba je rozdělena do dvou fází - *indukční* fáze, jejímž cílem je dosažení kompletní remise, a *konsolidační* fáze, která má zabránit návratu onemocnění. Základními cytostatiky podávanými při *indukční* terapii jsou cytosinarabinosid (Ara-C) a lék ze skupiny antracyklinů (např. idarubicin, mitoxantron či nejhojněji používaný daunorubicin) (ELLISON *et al.* 1968, LOWENBERG *et al.* 1999, KIMBY *et al.* 2001). Protože se antracyklin podává v rámci cyklu 3 dny a Ara-C po dobu 7 dnů, nazývá se tento terapeutický režim 3+7 (ESTEY 2000). Pro *konsolidační* terapii se používá intenzivní chemoterapie, buď samotná (nejčastěji Ara-C ve vysokých nebo středních dávkách) nebo s následnou alogenní či autologní transplantací kostní dřeně. Volba vhodného typu konsolidační terapie závisí zejména na věku pacienta, dostupnosti dárce kostní dřeně a zařazení do rizikové skupiny AML podle cytogenetických a molekulárně genetických charakteristik (tab. 4) (LOWENBERG *et al.* 1999, KIMBY *et al.* 2001).

Paliativní léčba má zajistit co nejvyšší kvalitu života pacienta, pro něhož není dostupná vhodná kurativní léčba. Zmírňuje bolesti, ovlivňuje symptomy a pomáhá vyřešit i psychické problémy (European Association for Palliative Care, 1989 citováno podle FOLEY *et al.* 1990, s. 11). Paliativní terapie sestává z nízkých dávek Ara-C, který se podává formou podkožních injekcí, či z jiných cytotoxických látek užívaných orálně (např. hydroxyurea, 6-merkaptopurin) (KIMBY *et al.* 2001, LATAGLIATA *et al.* 2006, FREDLY *et al.* 2013).

Tabulka č. 4. Rizikové skupiny AML podle cytogenetických a molekulárně genetických charakteristik (převzato z MROZEK *et al.* 2012)

FLT3-ITD = vnitřní tandemová duplikace genu FLT3; ostatní zkratky vysvětleny již v tabulce č. 3.

riziko	cytogenetická charakteristika	molekulárně genetická charakteristika
nízké	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22) normální karyotyp normální karyotyp	fúzní gen <i>RUNX1</i> s <i>RUNX1T1</i> fúzní gen <i>CBFβ</i> s <i>MYH11</i> <i>NPM1</i> mutovaný bez přítomnosti <i>FLT3-ITD</i> <i>CEBPα</i> mutovaný
střední I	normální karyotyp normální karyotyp normální karyotyp	<i>NPM1</i> mutovaný s přítomností <i>FLT3-ITD</i> <i>NPM1</i> nemutovaný s přítomností <i>FLT3-ITD</i> <i>NPM1</i> nemutovaný bez přítomnosti <i>FLT3-ITD</i>
střední II	t(9;11)(p22;q23) jiné cytogenetické změny	fúzní gen <i>MLLT3</i> s <i>MLL</i>
vysoké	inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2) t(6;9)(p23;q34) translokace zahrnující lokus 11q23 -5 nebo del(5q) -7 abnormality 17p komplexní změny karyotypu	fúzní gen <i>RPN1</i> s <i>EVI1</i> fúzní gen <i>DEK</i> s <i>NUP214</i> fúzní gen zahrnující <i>MLL</i>

2.1.1.2 AML s mutovaným nukleofosminem

Klonální chromozomální abnormality detekované zhruba u 55% dospělých s AML jsou významným prognostickým faktorem pro celkové přežití pacientů a pro jejich odpověď na léčbu chemoterapií (GRIMWADE 2001, MROZEK *et al.* 2004). Na základě výsledků cytogenetických a molekulárně genetických vyšetření jsou pacienti rozděleni do tří prognostických skupin – příznivá, středně riziková a nepříznivá (GRIMWADE *et al.* 1998, SLOVAK *et al.* 2000, BYRD *et al.* 2002) (tab. 4). Nejčastější genetickou mutací u pacientů s AML s normálním karyotypem je mutace genu pro nukleofosmin (NPM; Nucleophosmin), jejíž výskyt bez přítomnosti dalších mutací je spojen s předpokladem příznivé odpovědi na léčbu (FALINI *et al.* 2005). Lidský NPM je multifunkční fosfoprotein lokalizovaný převážně v buněčném jádru, ačkoli neustále přechází mezi cytoplazmou a jádrem (BORER *et al.* 1989, CORDELL *et al.* 1999, COLOMBO *et al.* 2002, OKUDA 2002). U většiny pacientů s mutací NPM (přibližně 1/3 dospělých nemocných s AML) je ale mutovaný NPM (mutNPM) aberantně lokalizován v cytoplazmě (odtud označení NPMc+) (FALINI *et al.* 2005) a stává se

tak vhodným nástrojem pro diagnózu (FALINI *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2006b, KONOPLEV *et al.* 2009).

2.2 NPM

NPM patří mezi jaderné chaperony nukleofosmin/nukleoplasmin proteinové rodiny (EIRIN-LOPEZ *et al.* 2006). Jeho přítomnost byla potvrzena u savců, ryb, ptáků a much, avšak u bakterií a kvasinek nebyl nalezen (LINDSTROM 2011). Existují tři hlavní funkční typy proteinů nukleofosmin/nukleoplasminové rodiny odvozené na základě jejich sekvenční homologie - NPM1, NPM2, NPM3 (obr. 1) (SHACKLEFORD *et al.* 2001, EIRIN-LOPEZ *et al.* 2006). Ačkoli mají rozdílnou genovou předlohu, expresi, funkci i lokalizaci, sdílejí velmi konzervovanou N-terminální oligomerizační doménu (FREHLICK *et al.* 2007). Střední část této domény je zodpovědná za vazbu s dalšími molekulami a díky ní se NPM vyskytuje v oligomerech, nejčastěji ve formě pentameru. Interakcí dvou pentamerů mohou NPM proteiny vytvářet dekamery (CHAN a CHAN 1995, DUTTA *et al.* 2001, NAMBOODIRI *et al.* 2003, NAMBOODIRI *et al.* 2004, LEE *et al.* 2007).

Největší (u lidí 32575 Da, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPM1>) a nejrozšířenější funkční typ nukleofosminu, NPM1, je typ, jehož mutace je spojena s výskytem AML. Jeho exprese a lokalizace je studována v experimentální části této práce a proto je podrobněji charakterizován v následujících kapitolách.

NPM2, u obojživelníků nazývaný nukleoplasmin (EARNSHAW *et al.* 1980), byl poprvé izolován v roce 1978 z oocytů *Xenopus laevis* (LASKEY *et al.* 1978), v jejichž jádře je jedním z nejrozšířenějších proteinů (MILLS *et al.* 1980). Dosud byla jeho exprese detekována pouze v tomto buněčném typu (FREHLICK *et al.* 2007). Nukleoplasmin, který se váže na histony, může zprostředkovat sestavování nukleozomů a podílet se tedy na remodelaci chromatinu (LASKEY *et al.* 1978, EARNSHAW *et al.* 1980, DINGWALL *et al.* 1987). Po oplození usnadňuje dekonduzaci chromatinu ve spermiích, a to skrze výměnu specifických spermatických jaderných proteinů za histony (OHSUMI a KATAGIRI 1991, PHILPOTT *et al.* 1991).

Savčí NPM2 (u lidí 24152 Da, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPM2>) je stejně jako nukleoplasmin exprimovaný v oocytech a u myšího embrya jeho exprese přetrvává do stádia 8 buněk. Na rozdíl od nukleoplasminu jeho nepřítomnost nemá na remodelaci paternálního chromatinu žádný vliv. Je však zásadní pro správnou regulaci struktury chromatinu v oocytech a během časně embryogeneze (BURNS *et al.* 2003).

NPM3, u obojživelníků označovaný jako NO29, je nejmenší (u lidí 19344 Da, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPM3>) a nejkyselější ze zmíněných členů nukleofosmin/nukleoplasminové rodiny (ZIRWES *et al.* 1997). Nachází se zejména v jadérku interfázních buněk (HUANG *et al.* 2005) a jeho exprese byla potvrzena v mnoha různých tkáních. U člověka byla nejvyšší hladina NPM3 detekována v buňkách pankreatu a testes (MACARTHUR a SHACKLEFORD 1997, SHACKLEFORD *et al.* 2001). Represe jeho exprese v savčích oocytech vede po oplození k inhibici dekondezace chromatinu ve spermiích. To naznačuje, že by mohl mít podobnou funkci jako nukleoplasmin u *Xenopus laevis*, se kterým vykazuje shodu ve 42 % (MCLAY a CLARKE 2003). Interaguje s NPM1 a ovlivňuje jeho funkci v syntéze ribozomů (HUANG *et al.* 2005).



Obrázek č. 1. Funkční typy lidského NPM (inspirováno FREHLICK *et al.* 2007, LINDSTROM 2011, ARREGI *et al.* 2015)

NPM1-3 = funkční typy NPM; N = N konec proteinu; červeně = kyselá doména; CORE = střední část proteinu; žlutě = jaderný exportní signál (NES; nuclear export signal); zeleně = jaderný lokalizační signál (NLS; nuclear localization signal); šedě = DNA vázající doména; růžově = jadérkový lokalizační signál (NoLS; nucleolar localization signal); C = C konec proteinu; čísla vpravo odpovídají počtu aminokyselin (AMK)

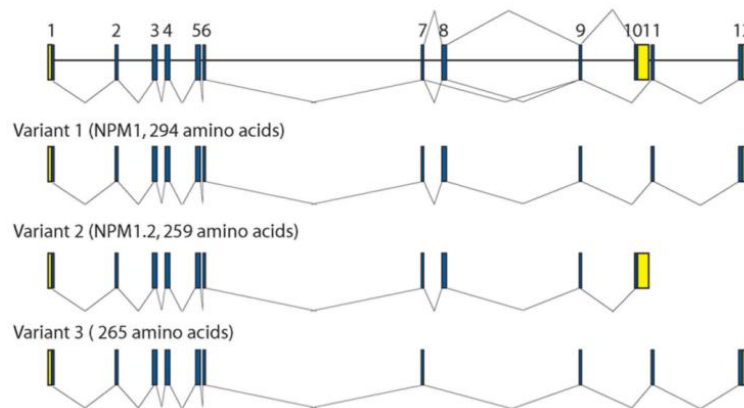
2.2.1 NPM1

NPM1, nejlépe prostudovaný člen nukleofosmin/nukleoplasminové rodiny, známý též jako NO38 (SCHMIDT-ZACHMANN *et al.* 1987), numatrin (FEUERSTEIN a MOND 1987) či B23 (YUNG *et al.* 1985), je hojně se vyskytující, konzervovaný fosfoprotein o udávané velikosti mezi 35 a 40 kilodaltonů (kDa) (LIM a WANG 2006). Poprvé byl identifikován v roce 1973

v jadérku krysích jaterních buněk a buněk Novikoff hepatomu (ORRICK *et al.* 1973). Jeho zvýšená hladina bývá detekována v rakovinných a proliferujících buňkách (CHAN *et al.* 1989, GRISENDI *et al.* 2006). U myšího modelu se vyskytuje ve dvou izoformách (B23.1 a B23.2) (CHANG a OLSON 1989), zatímco u člověka ve třech (FREHLICK *et al.* 2007). U obou organismů izoformy vznikají alternativním sestřihem jediného genu (CHANG a OLSON 1989, DALENC *et al.* 2002, LIM a WANG 2006).

2.2.1.1 Lidský *NPM1*

Lidský *NPM1* je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 5 (5q35) a je tvořen 12ti exony (<http://www.omim.org/entry/164040?search=NPM1&highlight=np1>). Může být transkribovaný ve třech variantách (obr. 2) - *NPM1.1*, *NPM1.2*, *NPM1.3*, které se odlišují délkou, funkcí a expresí (LINDSTROM 2011). *NPM1.1* je převažující izoforma a kóduje nejdelší produkt o délce 294 AMK (FREHLICK *et al.* 2007, CHAN *et al.* 1989, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002520). Využitím 3' terminálního alternativního exonu vzniká kratší protein *NPM1.2* dlouhý 259 AMK (DALENC *et al.* 2002, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001037738). Na rozdíl od *NPM1.1*, který je lokalizovaný především v jadérku (SPECTOR *et al.* 1984, CORDELL *et al.* 1999), byl *NPM1.2* detekován vzhledem k odlišnému C konci i v nukleoplazmě (OKUWAKI *et al.* 2002). V důsledku události nazývané exon skipping (přeskočení exonu - v tomto případě exonu 8) vzniká *NPM1.3*. Jedná se o transkripční variantu, jejíž produkt je tvořen 265 AMK, jeho funkce a exprese není známá (LIM a WANG 2006, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_199185). V dalším textu bude pod označením *NPM1* rozuměn protein kódovaný převažující transkripční variantou *NPM1.1*.



Obrázek č. 2. *Izofomy lidského NPM1* (převzato z LIM a WANG 2006)

žluté oblasti = netranslatované sekvence; modré oblasti = kódující sekvence; varianta 1 je tvořena 11 exony; varianta 2 je tvořena 10 exony; varianta 3 je tvořena 10 exony

2.2.1.2 NPM1 a rakovina

Funkce NPM1 v tumorigenezi je stále kontroverzní, neboť se může chovat jako nádorový supresor i jako protoonkogen. Zvýšená exprese genu *NPM1* bývá spojena s onkogenezi a může být použita jako jeden z markerů u solidních nádorů např. žaludku (TANAKA *et al.* 1992), tlustého střeva a konečníku (NOZAWA *et al.* 1996), ovarií (SHIELDS *et al.* 1997) a prostaty (SUBONG *et al.* 1999). NPM1 v rakovinných buňkách stimuluje jejich proliferaci a růst a zároveň inhibuje jejich apoptózu a diferenciaci (GRISENDI *et al.* 2006). U hematopoetických malignit se vyskytují chromozomální translokace zahrnující gen *NPM1* (RAIMONDI *et al.* 1989, MORRIS *et al.* 1994, REDNER *et al.* 1996, YONEDA-KATO *et al.* 1996) nebo jeho mutace (FALINI *et al.* 2005). Výsledkem je buď onkogenní fúzní protein, např. NPM1 s anaplastickou lymfomovou kinázou (ALK; Anaplastic lymphoma kinase) (MORRIS *et al.* 1994), NPM1 s RAR α (REDNER *et al.* 1996), NPM1 s myeloidním leukemickým faktorem 1 (MLF1; Myelodysplasia/myeloid leukaemia factor 1) (YONEDA-KATO *et al.* 1996), NPM1 s HAUS1 (HAUS augmin-like complex, subunit 1) (CAMPREGHER *et al.* 2016) nebo mutovaná forma NPM1 (FALINI *et al.* 2005).

Dále se onkogenní potenciál NPM1 může projevovat u hypoxických buněk, v nichž inhibuje apoptózu (LI *et al.* 2004). Vzhledem k autonomní buněčné proliferaci bývají nádorové tkáně hypoxické (HARRIS 2002). Za hypoxických podmínek je stabilizován transkripční faktor HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) a dochází k jeho translokaci do jádra. Prostřednictvím jeho vazby k HIF responivním oblastem v promotorech (HREs; HIF-1-

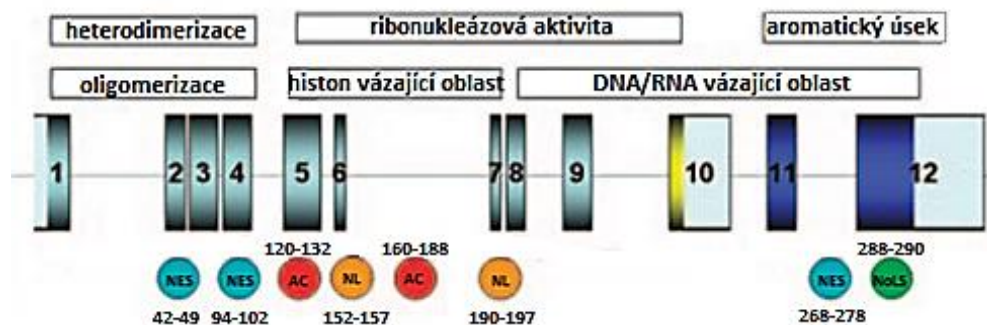
responsive elements) spouští expresi cílových genů, které umožní buňce přežít v prostředí s deficitem kyslíku (SEMENZA a WANG 1992, SEMENZA 2003). HRE sekvenci obsahuje i promotor genu *NPM1* a skrze vazbu HIF-1 α tedy může inhibovat apoptózu rakovinných buněk.

Na druhou stranu se *NPM1* podílí na udržení stability genomu (LIM a WANG 2006, GRISENDI *et al.* 2005) a skrze interakci s adenosindifosfát ribosylačním faktorem (ARF; Alternate reading frame) aktivuje v buňkách dráhu tumor supresorového proteinu p53 (ITAHANA *et al.* 2003, BERTWISTLE *et al.* 2004). Detaily jsou popsány níže v kapitole Interakční partneři.

2.2.1.3 Struktura *NPM1*

NPM1 je složen ze tří základních domén, které mají různé biochemické, strukturní a funkční vlastnosti. Nepochárná N-terminální doména obsahuje poměrně vysoké množství hydrofobních AMK a v jejím sekundárním uspořádání převažuje beta-skládaný list. Ve střední části proteinu se vyskytují dvě kyselé oblasti. Pro C-terminální doménu, složenou ze tří alfa-helixů, je charakteristická přítomnost bazických a aromatických AMK (CHAN *et al.* 1989, HINGORANI *et al.* 2000).

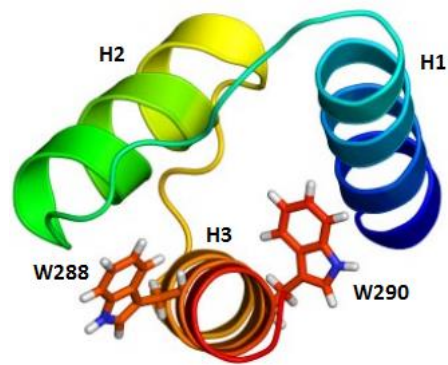
Za konkrétní aktivity proteinu zodpovídají jednotlivé polypeptidové segmenty (obr. 3). N-terminální doména se uplatňuje při vazbě ARF (ENOMOTO *et al.* 2006) a při tvorbě oligomerů (HERRERA *et al.* 1996), přičemž byla prokázána korelace mezi oligomerním stavem *NPM1* a jeho chaperonovou aktivitou (HINGORANI *et al.* 2000). Nepochárná část N-terminální domény a 2 kyselé oblasti ve střední části umožňují *NPM1* působit jako chaperon. Úseky mezi těmito kyselými oblastmi za přispění C-terminální domény udělují proteinu ribonukleázovou aktivitu (HINGORANI *et al.* 2000). Kyselé oblasti mohou interagovat s bazickými ribozomálními proteiny (CHAN a CHAN 1995) a první z kyselých segmentů ve střední oblasti obsahuje hlavní místo fosforylace - serin 125 (S125) (CHAN *et al.* 1986). Aromatické a bazické AMK na C konci zajišťují vazebnou aktivitu k nukleovým kyselinám (NK) (HINGORANI *et al.* 2000). V C-terminální doméně se nacházejí 4 threoninové zbytky, T199, T219, T234 a T237, které fungují jako další cílová místa fosforylace pomocí cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1; cyclin-dependent kinase 1) (NEGI a OLSON 2006).



Obr. č. 3. NPM1 obsahující 12 exonů – sekvenční motivy a aktivity proteinu (převzato z GRISENDI *et al.* 2006, FALINI *et al.* 2007)

jednotlivé exony a AMK pozice sekvenčních motivů jsou očíslovány; žlutě značený úsek exonu 10 = úsek v 3' terminálním alternativním exonu u izoformy NPM1.2; světle modře značené úseky exonů 1, 10 a 12 = netranslatované oblasti; tmavě modře značené úseky exonů 11 a 12 = alternativní konec proteinu u izoformy NPM1.1 a NPM1.3; tyrkysově NES = jaderný exportní signál; červeně AC = kyselá oblast; oranžově NL = jaderný lokalizační signál; zeleně NoLS = jadérkový lokalizační signál

NPM1 obsahuje také několik sekvenčních motivů, které ovlivňují jeho subcelulární lokalizaci. Na jeho N konci se vyskytují dva exportní signály (NES; nuclear export signal) (WANG *et al.* 2005), třetí fyziologický NES byl nedávno detekován v C-terminální oblasti (ARREGI *et al.* 2015). Jedná se o krátkou sekvenci hydrofobních AMK, jež zajišťuje export proteinů z jádra skrze jaderný pór (viz kapitola Transport). První NES (L-x-L-xx-V-x-L, kde L = leucin, x = jakákoli AMK, V = valin) je situovaný mezi zbytky 42-49 (YU *et al.* 2006), druhý NES (I-xx-P-xx-L-x-L, kde I = izoleucin, x = jakákoli AMK, P = prolin, L = leucin) se nachází mezi velmi konzervovanými zbytky 94-102 (WANG *et al.* 2005). Třetí NES, nejméně probádaný, je lokalizovaný mezi zbytky 268-278 (ARREGI *et al.* 2015). První dva fyziologické NES jsou ale slabé a poslední je neaktivní (BOLLI *et al.* 2007, ARREGI *et al.* 2015). Současná přítomnost bipartitního jaderného lokalizačního signálu (NLS; nuclear localization signal) v centrální části proteinu (HINGORANI *et al.* 2000) a jadérkového lokalizačního signálu (NoLS; Nucleolar localization signal) na jeho C konci (NISHIMURA *et al.* 2002) zajišťuje převážně jadérkovou lokalizaci NPM1. NoLS je obsažen ve třetím helixu C-terminální domény (obr. 4 a obr. 5) (GRUMMITT *et al.* 2008) a jeho důležitou součástí jsou dva tryptofanové zbytky W288 a W290 (NISHIMURA *et al.* 2002, FALINI *et al.* 2005), jak bude podrobněji popsáno v kapitole Mutace NPM1.



Obrázek č. 4. Schéma 3 helixů C-terminální domény NPM1 (převzato z GRUMMITT *et al.* 2008)
H1-H3 = helixy C-terminální domény; W288 a W290 = tryptofanové zbytky (součást NoLS)



Obrázek č. 5. Aminokyselinová sekvence 3 helixů C-terminální domény (převzato z GRUMMITT *et al.* 2008)
H1-H3 = helixy C-terminální domény; čísla znamenají pořadí AMK, jimž odpovídají jednopísmenné symboly; intenzita modrého pozadí AMK symbolu odpovídá stupni konzervace AMK u NPM1 mezi různými organismy

2.2.1.4 Funkce NPM1

NPM1 je multifunkční protein, který hraje důležitou úlohu při dozrávání preribozomálních částic (SCHMIDT-ZACHMANN *et al.* 1987) a jejich transportu z jádra do cytoplazmy (BORER *et al.* 1989) a také v jaderném importu některých proteinů, neboť má schopnost vázat peptidy jaderného lokalizačního signálu (SZE BENI *et al.* 1995). Mimo to se účastní reparace DNA (WU *et al.* 2002, POLETTO *et al.* 2014) a jako jeden ze substrátů komplexu cyklin-dependentní kináza 2 (CDK2; Cyclin-dependent kinase 2)/cyklin E se podílí na duplikaci centrozomu (OKUDA *et al.* 2000). Obě výše uvedené funkce jsou klíčové pro udržení stability genomu. Díky své chaperonové aktivitě předchází agregaci jadérkových proteinů, zprostředkovává sestavování histonů do nukleozomu, ovlivňuje strukturu chromatinu a zvyšuje transkripční aktivitu dané oblasti v závislosti na acetylaci (SZE BENI a OLSON 1999, OKUWAKI *et al.* 2001, SWAMINATHAN *et al.* 2005). S vysokou afinitou váže NK, zejména pak ty v jednovláknové podobě (DUMBAR *et al.* 1989, WANG *et al.* 1994). Tato interakce hraje spolu s vlastní ribonukleázovou aktivitou klíčovou roli při sestřihu

preribozomální RNA (pre-rRNA) (HERRERA *et al.* 1995), což potvrzuje nezbytnou úlohu NPM1 v biosyntéze ribozomů. Mimo to má tento protein destabilizační efekt na šroubovici RNA (DUMBAR *et al.* 1989). Byly u něj pozorovány antiapoptické účinky, neboť inhibuje aktivitu specifických DNáz aktivovaných enzymy ze skupiny kaspáz (AHN *et al.* 2005). V neposlední řadě přispívá k regulaci stability a aktivity proteinu p53 (COLOMBO *et al.* 2002).

2.2.1.5 Interakční partneři NPM1

Vzhledem k širokému spektru svých funkčních domén NPM1 interaguje s mnoha jinými proteiny. Mezi jeho nejvýznamnější interakční partnery z hlediska tumorigeneze patří tumor supresory ARF (ITAHANA *et al.* 2003) a p53 (COLOMBO *et al.* 2002) včetně jejich vazebných partnerů (viz následující dvě podkapitoly) a protoonkogen c-MYC (V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) (LI *et al.* 2008). Dále interaguje s ribozomálními proteiny jako jsou RPL5 (Ribosomal protein L5) (YU *et al.* 2006), RPL23 (Ribosomal protein L23) (WANZEL *et al.* 2008) a RPS9 (Ribosomal protein S9) (LINDSTROM a ZHANG 2008). Váže také komponenty chromatinu, např. histony H3, H4, H2A, H2B (OKUWAKI *et al.* 2001), proteiny dělicího vřeténka, např. CRM1 (Chromosomal maintenance 1) (viz kapitola Transport) (WANG *et al.* 2005) a proteiny regulující apoptózu, např. BAX (BCL2 associated X protein) (KERR *et al.* 2007). Kromě toho interaguje s jadéřkovým proteinem nukleolinem (C23) (LI *et al.* 1996), proliferaci ovlivňujícím jadéřkovým proteinem p120 (Catenin delta 1) (VALDEZ *et al.* 1994), ribonukleoproteinem HIV-1 Rev (Human immunodeficiency virus type 1; Regulator of expression of virion proteins) (FANKHAUSER *et al.* 1991) a řadou dalších proteinů.

2.2.1.5.1 NPM1 a p53

p53, proteinový produkt tumor supresorového genu *TP53* (<http://www.omim.org/entry/191170>), je jaderným transkripčním faktorem regulujícím expresi genů, které se podílejí na kontrole buněčného cyklu (EL-DEIRY *et al.* 1993, HARPER *et al.* 1993, XIONG *et al.* 1993), replikaci DNA (DUTTA *et al.* 1993, COX *et al.* 1995, MILLER *et al.* 1995) a apoptóze (LOWE *et al.* 1993, YONISH-ROUACH *et al.* 1993). p53 skrze indukci apoptózy (YONISH-ROUACH *et al.* 1991, SHAW *et al.* 1992, MIYASHITA a REED 1995) či zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (MERCER *et al.* 1990) brání maligní transformaci buněk

(MAIGUEL *et al.* 2004). Za fyziologických podmínek se v buňce nachází v latentní formě a k jeho stabilizaci a aktivaci dochází působením stresových faktorů (BERNAL a HERNANDEZ 2007).

Jedním ze způsobů regulace p53 je fosforylace (MEEK 1994). Pro aktivaci p53 je zásadním fosforylačním místem serin 15 (S15) (SHIEH *et al.* 1997, SILICIANO *et al.* 1997), který je mimo jiné citlivý na ultrafialové záření (UV) (SILICIANO *et al.* 1997). Hladina NPM1 určuje mezní hodnotu UV pro indukci fosforylace S15 a následnou aktivaci p53 (MAIGUEL *et al.* 2004). NPM1 také brání fosforylaci S15 vyvolané hypoxií (LI *et al.* 2004).

Dále NPM1 snižuje transkripční aktivitu p53 přímou interakcí s jeho N koncem (COLOMBO *et al.* 2002).

Na druhou stranu NPM1 může mít na p53 i stabilizační efekt. Během genotoxického stresu vyvolaného např. UV zářením, aktinomycinem D či expresí virového cyklinu-K dochází k redistribuci NPM1 do nukleoplazmy. Tím je umožněna jeho asociace se specifickou ubiquitin ligázou MDM2 (Mouse double minute 2 homolog), která funguje jako negativní regulátor p53. Tato interakce způsobuje uvolnění proteinu p53 z komplexu MDM2/p53, čímž dochází k jeho stabilizaci (HAUPT *et al.* 1997, KURKI *et al.* 2004).

2.2.1.5.2 NPM1 a ARF

ARF je vysoce bazický jadérový protein regulující aktivitu p53 v reakci na onkogenní podnět (WEBER *et al.* 1999, SHERR 2001, BERTWISTLE *et al.* 2004). Transientní přechod ARF mezi jádrem a nukleoplazmou a jeho schopnost vázat MDM2 umožňuje přesun této ligázy z jádra do jádérka (WEBER *et al.* 1999). Tím je znemožněna interakce MDM2 s p53. Vedle toho ARF inhibuje ubiquitin ligázovou aktivitu MDM2, která by jinak vedla k degradaci p53 (HONDA a YASUDA 1999). Výsledkem je stabilizace a aktivace p53 a tedy zastavení buněčného cyklu či navození apoptózy (BATES a VOUSDEN 1999, SIONOV a HAUPT 1999, SHERR 2001). Mimoto má ARF tumor supresorovou funkci nezávislou na p53. Může inhibovat syntézu ribozomální RNA, čímž omezuje tvorbu ribozomů a potlačuje tak buněčnou proliferaci (SUGIMOTO *et al.* 2003).

NPM1 asociuje s ARF v jadérku za vzniku komplexu s molekulovou hmotností od 2 do 5 megadaltonů (MDa) (ITAHANA *et al.* 2003, BERTWISTLE *et al.* 2004). Tato interakce umožňuje ARF indukovat ubiquitinaci a následnou degradaci NPM1 v proteazomu (ITAHANA *et al.* 2003). Jak již bylo zmíněno dříve, NPM1 využívá svoji endoribonukleázovou aktivitu pro sestřih pre-rRNA (HERRERA *et al.* 1995). Snížení koncentrace NPM1 prostřednictvím jeho ubiquitinace tudíž vede k utlumení biogeneze ribozomů (ITAHANA *et al.* 2003). Kromě toho ARF může bránit NPM1 v syntéze ribozomů skrze inhibici jeho nukleocytoplazmatického transportu, a to v důsledku jejich vzájemné interakce v jadérku (BRADY *et al.* 2004). V buňkách s vyšší hladinou NPM1 dochází ke stabilizaci a tedy akumulaci ARF, naopak inhibice syntézy NPM1 má na ARF destabilizační efekt (KUO *et al.* 2004).

Oligomerizační schopnost NPM1, zajištěná doménou na N konci, zůstává zachována i u forem NPM1 se změněnou C-terminální sekvencí. Důsledkem interakce ARF a NPM1 s mutací v C-terminální doméně dochází k přesunu ARF do cytoplazmy. Tím je znemožněna regulace stability a aktivace p53, což má zřejmě význam v procesu leukemogeneze (COLOMBO *et al.* 2006).

2.2.1.6 Posttranslační modifikace NPM1

Mezi nejběžnější posttranslační modifikace NPM1 patří fosforylace, acetylace, ubiquitylace a sumoylace (LINDSTROM 2011). Vzhledem k velkému počtu fosforylačních míst NPM1 (okolo 40), je však jeho nejvýznamnější modifikací fosforylace (LIM a WANG 2006, MITREA a KRIWACKI 2012, RAMOS-ECHAZABAL *et al.* 2012).

Během interfáze bývá S125, hlavní místo fosforylace nacházející se ve střední části proteinu, fosforylován kaseinovou kinázou II (CK2; casein kinase II) (CHAN *et al.* 1986), což zvyšuje pohyblivost NPM1 v jadérku (NEGI a OLSON 2006). V časně fázi mitózy protein kinázy CDK1 a CDK2 závislé na cyklinech B a E fosforylují zbytky T199, T234 a T237 (SHINMURA *et al.* 2005, NEGI a OLSON 2006, citováno podle PETER *et al.* 1990). Tato fosforylace má za následek změny ve struktuře NPM1 a nárůst negativního náboje zejména v C-terminální doméně. To vede ke snížení afinity proteinu k NK. Během jednotlivých fází mitózy se mění subcelulární umístění NPM1 (OCHS *et al.* 1983, DUNDR *et al.* 1997) (viz dále) a právě

fosforylace může být faktorem regulujícím tyto lokalizační změny v průběhu buněčného cyklu (NEGI a OLSON 2006)

Jak již bylo poznamenáno, fosforylace NPM1 pomocí CDK2 je důležitým dějem, který podmiňuje zahájení duplikace centrozomu. Během mitózy, ve fázi, kdy se rozpadá jaderná membrána, je NPM1 přemístěn do blízkosti centrozomu a specificky s ním asociuje. V pozdní G1 fázi buněčného cyklu fosforyluje komplex CDK2/cyklin E NPM1 na pozici T199. Fosforylovaný NPM1 disociuje od centrozomu a je zahájena duplikace centrioly. V průběhu telofáze dochází k opětné reasociaci NPM1 s oběma centriolami, čímž je zajištěno, že nedojde k aberantní duplikaci (OKUDA 2002, SHINMURA *et al.* 2005). Serin-threoninová polo-like kináza 1 je další kinázou, která během mitózy fosforyluje NPM1, a to na pozici S4. Podílí se nejen na duplikaci centrozomu, ale také následně na segregaci chromozomů a cytokinezi (ZHANG *et al.* 2004).

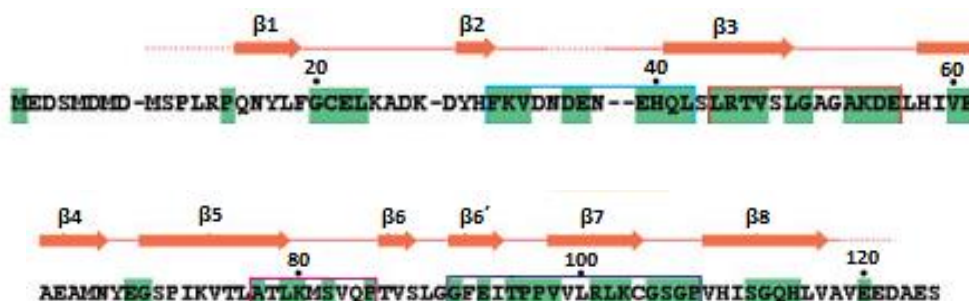
Fosforylace N-terminální domény má klíčovou roli v jeho oligomerizaci (viz kapitola Oligomerizace) (MITREA *et al.* 2014).

2.2.1.7 Transport

Nukleární export mnoha proteinů včetně NPM1 je zprostředkován exportním proteinem CRM1, známým také jako exportin 1 (STADE *et al.* 1997, WANG *et al.* 2005, YU *et al.* 2006). Gen *CRM1* byl poprvé identifikován u kvasinek *Schizosaccharomyces pombe*, u nichž jeho mutace způsobovala deformace v chromozomových strukturách (ADACHI a YANAGIDA 1989). CRM1 zajišťuje obecně export proteinů prostřednictvím specifické interakce s jejich NES motivem bohatým na leucin (FORNEROD *et al.* 1997, FUKUDA *et al.* 1997, STADE *et al.* 1997). Nezbytnou součástí funkčního exportního komplexu je také RanGTP (Ras-related guanosine triphosphate binding nuclear protein) (FORNEROD *et al.* 1997, RICHARDS *et al.* 1997).

Jak bylo uvedeno dříve, fyziologické NES NPM1 jsou slabé, což je jedním z důvodů, proč je schopnost exportu nemutovaného NPM1 do cytoplazmy omezená (BOLLI *et al.* 2007, ARREGI *et al.* 2015). V rámci sekundární struktury proteinu je převažujícím typem uspořádání NES motivů v N-terminální doméně beta-skládaný list (obr. 6) (LEE *et al.* 2007). Vzhledem k tomu, že CRM1 rozpoznává a váže NES v oblasti hydrofobního žlábků mezi dvěma helixy

(DONG *et al.* 2009), mohla by být sekundární beta-struktura fyziologických NES důvodem jejich slabé interakce s CRM1 (ARREGI *et al.* 2015). Nedávné *in vivo* experimenty potvrdily nulovou exportní aktivitu třetího NES (ARREGI *et al.* 2015). Naopak NES vzniklý mutací v C-terminální doméně vykazuje silnou afinitu pro CRM1 (FALINI *et al.* 2006a).



Obrázek č. 6. Sekundární struktura a aminokyselinová sekvence N-terminální domény (převzato z LEE *et al.* 2007)

červené šipky $\beta 1$ -8 = sekundární beta-struktura; pozice NES jsou 42-49, 94-102; zeleně označené AMK jsou mezi jednotlivými variantami NPM1 konzervované

2.2.1.8 Mutace NPM1

Mutace NPM1 se vyskytují vždy v heterozygotní formě (FALINI *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2007), v homozygotní jsou letální (GRISENDI *et al.* 2005). Objevují se s vyšší frekvencí u žen než u mužů (DOHNER *et al.* 2005, SCHNITTGER *et al.* 2005, THIEDE *et al.* 2006). Dosud bylo identifikováno přibližně 60 různých typů mutací NPM1, a to téměř výhradně v exonu 12 (velmi vzácně může dojít k mutaci v exonu 9 nebo 11) (MARIANO *et al.* 2006, ALBIERO *et al.* 2007, PITIOT *et al.* 2007, RAU a BROWN 2009, JEON *et al.* 2013). Molekulární podstatou těchto mutací jsou inserce či delece malého množství bází, jejichž počet není násobkem 3 (FALINI *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2007). To má za následek posun čtecího rámce a vznik aberantního proteinu s odlišnou AMK sekvencí (FALINI *et al.* 2005). U naprosté většiny mutovaných forem NPM1 dochází ke ztrátě AMK zbytků W288 a W290, případně pouze ke ztrátě W290, které jsou charakteristické pro NoLS. Dalším častým důsledkem mutace je vznik nového NES motivu v C-terminální doméně, který interakcí s CRM1 zvyšuje účinnost transportu mutovaného proteinu do cytoplazmy (FUKUDA *et al.* 1997, FALINI *et al.* 2006a, FALINI *et al.* 2007).

Delece tryptofanových zbytků má za následek nesprávné skládání (folding) C-terminální domény (GRUMMITT *et al.* 2008). To vede ke ztrátě její afinity pro sekvence

s G kvadruplexovou strukturou nacházející se např. v ribozomální DNA, superoxid dismutáze či v promotoru genu *MYC* (FEDERICI *et al.* 2010, CHIARELLA *et al.* 2013). Výsledkem je relokace NPM1 z jaderka do nukleoplazmy (NISHIMURA *et al.* 2002, WANG *et al.* 2005). Bylo shledáno, že delece W288 a/nebo pouze W290 koreluje s charakterem NES vzniklým na základě mutace (BOLLI *et al.* 2007). Z toho vyplývá, že pro zajištění účinného jaderného exportu mutantů je případná přítomnost W288 vyvážena nejsilnějším typem nově vzniklého NES (BOLLI *et al.* 2007). Nejvíce frekventovaný NES u mutovaných forem NPM1 je tvořen motivem L-xxx-V-xx-V-x-L a obvykle bývá přítomný u mutantů s oběma deletovanými tryptofany (FALINI *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2007, RAU a BROWN 2009). Naopak zachování W288 bývá asociováno s obměnami motivu L-xxx-V-xx-V-x-L, přičemž se typicky vyskytuje na 2. pozici místo V např. L, fenylalanin, cystein či methionin (FALINI *et al.* 2006a). Je zajímavé, že pro cytoplazmatickou lokalizaci NPM1 je zásadní nejen NES vytvořený mutací, ale také fyziologické NES na jeho N konci (FALINI *et al.* 2006a).

Nejdůležitějším faktorem při výběru mutací, jimiž se ve své diplomové práci zabývám, byla frekvence jejich výskytu u pacientů s AML a předpokládaná vnitrobuněčná lokalizace mutovaných forem. Protože doposud nebylo objasněno, zda při vzniku AML a při její léčbě hraje důležitější roli nefunkční protein jako důsledek mutace *NPM1* či změna lokalizace interakčních partnerů *NPM1* vyvolaná aberantní lokalizací mutNPM1, může být význam mutace přímo úměrný míře delokalizace mutNPM1.

Mutace A se u dospělých pacientů s mutNPM1 objevuje zhruba v 75-80 % případů (DOHNER *et al.* 2005, SCHNITTGER *et al.* 2005, VERHAAK *et al.* 2005, THIEDE *et al.* 2006), u dětí však tvoří pouze 11-50 % všech mutací *NPM1* (CAZZANIGA *et al.* 2005, BROWN *et al.* 2007, MULLIGHAN *et al.* 2007, THIEDE *et al.* 2007, HOLLINK *et al.* 2009). Vzniká jako důsledek duplikace tetranukleotidu TCTG v pozici 956-959 (obr. 6) (FALINI *et al.* 2005). V C-terminální doméně dochází k deleci W288 i W290 a vytvořeným NES je již zmíněný nejběžnější motiv L-xxx-V-xx-V-x-L. U pacientů s touto mutací je mutovaný protein lokalizovaný v cytoplazmě (FALINI *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2006a). Z klinického hlediska je zajímavým typem mutace D způsobena inzercí tetranukleotidu CCTG též v pozici 956-959. Kóduje protein o stejné primární struktuře jako mutace A, a proto mají podobný klinický dopad (FALINI *et al.* 2005, KOH *et al.* 2009)

Mutace B je u dospělých s mutNPM1 druhým nejrozšířenějším typem mutace s frekvencí výskytu 4-11 % (DOHNER *et al.* 2005, SCHNITTGER *et al.* 2005, SUZUKI *et al.* 2005, VERHAAK *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2006b, THIEDE *et al.* 2006). V dětské populaci však četnost výskytu dosahuje až 67 % (THIEDE *et al.* 2007). U této mutace je v pozici 956-959 inzerován úsek 4 bází CATG (obr. 6) (FALINI *et al.* 2005). I u této varianty, stejně jako u mutace A, chybí oba tryptofanové zbytky a export zprostředkovává motiv L-xxx-V-xx-V-x-L (FALINI *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2006a). Ve článku (KOH *et al.* 2009) se spekuluje o možnosti závislosti prognózy onemocnění na typu mutace. Dle této studie má mutace typu B, na rozdíl od mutace A, nepříznivou prognózu. Objasnění lokalizace NPM1 nesoucí mutaci B by tudíž mohlo vysvětlit případný vztah mezi prognózou a typem mutace.

Mutace E je zapříčiněna delecí 5 nukleotidů v pozici 965-969 a inzercí 9 nových bází ve stejném úseku (obr. 6) (FALINI *et al.* 2005). NPM1 s touto mutací se od předchozích uvedených mutantů liší především nejednoznačnou vnitrobuněčnou lokalizací, která je pravděpodobně způsobena zachováním W288 (BOLLI *et al.* 2007). Ten uděluje proteinu afinitu k jadérku a pro účinný transport mutovaného proteinu do cytoplazmy tedy musí vzniknout C-terminální NES s vysokou exportní aktivitou (BOLLI *et al.* 2007). Tím je u mutace E motiv L-xxx-L-xx-V-x-L (FALINI *et al.* 2006a). Mutovaný protein byl detekován v cytoplazmě, nukleoplazmě i v jadérku (BOLLI *et al.* 2007).

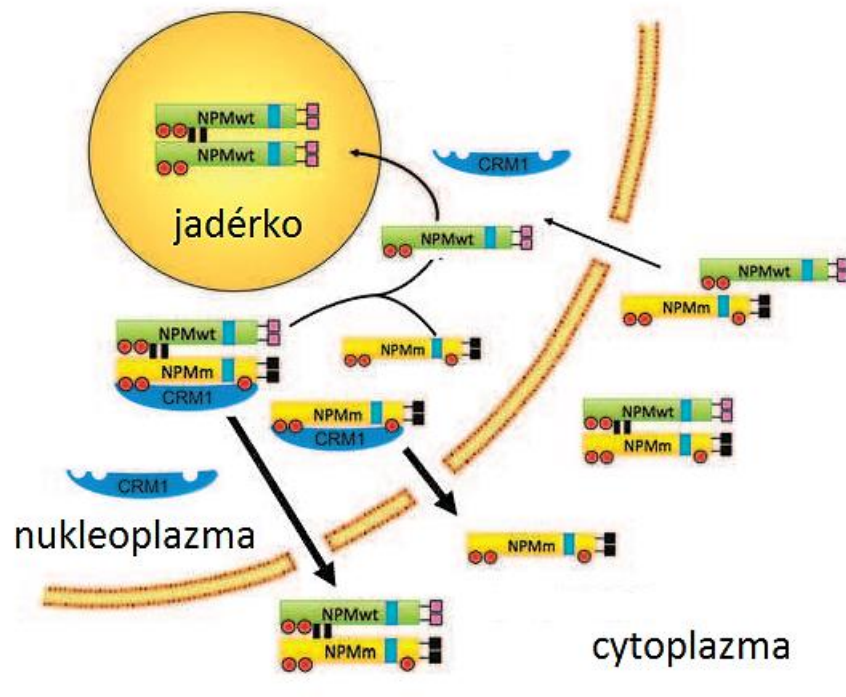
Mutation	DNA sequence of exon 12 of NPM1 gene	Protein
WT	gactctt gcaag	DLIQWRKSL
A	gactctt gcaag	DLCLA VEEVSLRK
B	gactctt gcaag	DLCLA VEEVSLRK
C	gactctt gcaag	DLCLA VEEVSLRK
D	gactctt gcaag	DLCLA VEEVSLRK
E	gactctt gcaag	DLWOS LAQVSLRK
F	gactctt gcaag	DLWOS LAQVSLRK
G	gactctt gcaag	DLWOC FQVSLRK
H	gactctt gcaag	DLWOC FQVSLRK
J	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
K	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
L	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
M	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
N	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
O	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
P	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
Q	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
R	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
S	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
DD [2]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
DD [4]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
DD [5]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
DD [10]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
DD [11]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
DD [12]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
DD [13]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
JH1	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
JH2	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
JH3	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
JH4	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
JH5	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
JH6	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
JH7	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
Hollink et al.[68]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK
Hollink et al.[69]	gactctt gcaag	DLWOS LSKVSLRK

Obrázek č. 7. Mutace NPM1 v exonu 12 u pacientů s AML podle Rau a BROWN 2009 (převzato z RAU a BROWN 2009)
červeně označeny inzerované nukleotidy charakteristické pro typy mutací, jimiž se ve své práci zabýváš; tučně označeny AMK NES motivu zprostředkovávající export mutovaného proteinu; v koncové sekvenci proteinu podtrženy pozice původních zbytků W288 a W290

2.2.1.9 Oligomerizace

Na základě schopnosti mnoha chaperonů vytvářet oligomery se předpokládá, že oligomerizační vlastnosti NPM1 úzce souvisejí s jeho chaperonovou aktivitou (EHRNSPERGER 1998, s. 553-575, citováno podle HINGORANI *et al.* 2000, BRAIG *et al.* 1994, citováno podle HINGORANI *et al.* 2000). Jak již bylo uvedeno v kapitole Struktura NPM1, mezi oligomerním stavem NPM1 a jeho chaperonovou aktivitou byla prokázána korelace (HINGORANI *et al.* 2000). Pro tvorbu oligomerů NPM1 je nezbytná N-terminální doména a v ní zejména dva cysteinové zbytky C21 a C104 (PRINOS *et al.* 2011, HUANG *et al.* 2013). Mezi dvěma extrémními strukturními stavy NPM1, tj. vysoce uspořádaným stabilním oligomerem a neuspořádaným monomerem, byl v N-koncové doméně zjištěn polymorfismus. Rovnováha mezi pentametrem a monomerem je regulována jak posttranslačními modifikacemi (fosforylací), tak intermolekulárními interakcemi (MITREA *et al.* 2014). Fosforylace serinu, tyrosinu a threoninu zvyšuje negativní náboj proteinu a omezuje tak stabilizační efekt kovových kationtů na pentamer. Výsledkem této reakce je destabilizace oligomerů a jejich rozpad na monomery (MITREA *et al.* 2014).

U NPM1 nesoucího mutaci v C-terminální doméně zůstává schopnost tvořit oligomery zachována (HUANG *et al.* 2013). Podle studie Falini *et al.* 2006 může mutNPM1 asociovat s divokým typem (wt; wild type) NPM1 za vzniku heterodimerů (FALINI *et al.* 2006a). Funkce wtNPM1 je u pacientů spadajících do podskupiny AML s cytoplazmaticky lokalizovaným NPM1 (NPMc+ AML) výrazně utlumena, neboť následkem oligomerizace s mutovanou formou dochází k relokizaci části wtNPM1 do nukleoplazmy a cytoplazmy (obr. 8) (FALINI *et al.* 2009). Je pravděpodobné, že stejným mechanismem, tedy díky tvorbě heterooligomerů obsahujících wild type a mutovanou formu, se naopak část mutovaného proteinu dostává do jádérka (BRODSKÁ *et al.* 2016).



Obrázek č. 8. *Mechanismus oligomerizace wtNPM a mutNPM a export heterodimerů do cytoplazmy* (převzato z FALINI *et al.* 2009)
 NPMm = mutovaný NPM; NPMwt = wild type NPM; CRM1 = exportní protein; růžový čtverec = nemutovaný W; černý čtverec = mutovaný W; modrý obdélník = NLS; oranžové kolečko = NES

3 CÍLE

Hlavním cílem této práce bylo popsat pomocí fluorescenční mikroskopie vnitrobuněčnou lokalizaci NPM v závislosti na přítomnosti mutací charakteristických pro AML. Dílčí cíle byly uskutečněny v těchto krocích:

- 1) Konstrukce vektoru s intaktním genem pro NPM a 3 varianty rekombinantního proteinu NPM nesoucího mutace typu A, B a E.
- 2) Analýza lokalizace a chování rekombinantních proteinů v různých expresních systémech pomocí konfokálního mikroskopu.
- 3) Analýza lokalizace rekombinantních proteinů pomocí imunofluorescenčního značení fixovaných buněk.
- 4) Porovnání hladiny exprese NPM v lyzátech použitých buněčných linií.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Použité přístroje

Analytické váhy AE200 Comesa (Mettler)

Aparatura pro horizontální agarózovou DNA elektroforézu E0738 (Sigma)

Aparatura pro SDS-PAGE (SDS polyakrylamidovou gelovou elektroforézu) (Bio-Rad)

Bunsenův kahan Fireboy plus (Integra Biosciences)

Centrifuga MiniSpin, rotor F45-12-11 (Eppendorf)

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

Centrifuga T 62,1 (MLW)

CO₂ termostat MCO-19AIC (UV) (Sanyo)

Hybridizační inkubátor ICP50 (Memmert)

Hybridizační pec ProBlot12 (Labnet)

Konfokální mikroskop Olympus FV 1000 (Olympus)

Laboratorní předvážky Scout (Ohaus)

Laminární box SafeFast 212D (Faster)

Laminární box Faster Two 30 (Faster)

Míchačka magnetická s ohřevem (RCT basic)

Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)

PCR cykler MiniOpticon (Bio-Rad)

pH metr GMH 3530 (Greiner)

Průtokový cytometr LSRFortessa Analyzer (BD Biosciences)

Přístroj pro detekci fluorescence a chemiluminiscence G:box Chemi XT4 (Syngene)

Rovnoramenné váhy (Chirana)

Semi-dry blotter (Sigma)

Sušárna laboratorní mikrovlnná (ETA)

Svářečka fólií (ETA)

Světelný mikroskop (Biolar)

System dokumentačního Bio-imaging (Syngene)
System pro zpracování gelů Processor Plus (GE Healthcare Life Sciences)
Transiluminátor UV TFX-20M (Vilber Lourmat)
Třepačka s inkubátorem KS 4000i control (IKA)
Třepačka Rotamax 120 (Heidolph)
Třepačka laboratorní LT2 (Kavalier)
Ultracentrifuga Sorvall WX90⁺, rotor 42.2TI (Thermo Scientific)
Vařič elektrický (ETA)
Vortex V-1 plus (Biosan)
Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
Vodní lázeň (Lauda)
Zdroj elektrického napětí (Biorad)
Zdroj elektrického napětí VWR (Power Source)
Zdroj elektrického napětí PS4001-2 (Sigma-Aldrich)

4.1.2 Chemikálie

4.1.2.1 Chemikálie

Agaróza (Sigma)
Akrylamid (Sigma)
Amonium persulfát (Sigma)
BamHI (Thermo Scientific)
Bisakrylamid (Serva)
Bromfenolová modř (BFM) (Sigma)
dNTP (Qiagen)
Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA - Na₂) (Sigma)
Dithiotreitol (DTT) (Sigma)
6x DNA Loading (Thermo Scientific)
Ethanol (Penta)
Ethidium bromid (EtBr)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Fluka)

Fetální bovinní sérum (Biochrom)
Formaldehyd (Sigma)
Gel Red (Biotium)
Glukóza (Penta)
Glycerín (Penta)
Glycerol (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)
Glycin (Penta)
HindIII (Fermentas)
Hoechst 33342 (Invitrogen)
Hydroxid sodný (Penta)
Chlorid draselný (Sigma)
Chlorid hořečnatý (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)
Chlorid sodný (Lach-Ner, s.r.o.)
Chlorid vápenatý (Lachema)
Izopropanol (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)
Jet Prime - transfekční činidlo (Polyplus transfection)
Jet Prime pufr (Polyplus transfection)
Kvasničný autolyzát (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)
Kyselina chlorovodíková (Penta)
Kyselina octová 99% (Penta)
Kyselina fosforečná (Lachema)
LB broth (Sigma)
Methanol (Lach-Ner, s.r.o.)
Octan sodný (Penta)
Polymeráza Pfu (Promega), EmeraldAmpGT PCR Master Mix (Takara)
Pufry pro restriční enzym: TANGO (Fermentas), BamHI (Thermo Scientific), HindIII (Fermentas); pro ligační směs (New England Biolabs); pro Pfu polymerázu (součástí kitu Promega)
Sacharóza (Lach-Ner, s.r.o.)
Signal Enhancer (Invitrogen)
Síran hořečnatý (Sigma)
Dodecylsulfát sodný (SDS) (Serva)

Substrát pro chemiluminescenci ECL™ (GE Healthcare)

T4 DNA ligáza (New England BioLabs)

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (Sigma)

Triton X-100 (Serva)

0,4% Trypanová modř (Sigma)

0,25% Trypsin-EDTA (Sigma)

Trypton (Sigma-Aldrich)

Tween (Sigma)

Xhol (Thermo Scientific)

Živný agar (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)

4.1.2.2 Roztoky

PBS (Phosphate Buffered Saline): 40 g NaCl
1 g KCl
14,5 g Na₂HPO₄ · 12H₂O
1 g KH₂PO₄
pH bylo upraveno na 7,4 (H₃PO₄) a objem byl doplněn
dH₂O do 5 l

2x Vzorkový pufr redukující: 0,12 g Tris, pH = 6,8 (upraveno HCl)
8 ml dH₂O
0,4 g SDS
0,31 g DTT
2 ml glycerol
50 µl 1% BFM

STET: 2 g 8% sacharóza
1,25 g 5% Triton X-100
2,5 ml 500 mM EDTA – NaOH
1,25 ml 500 mM Tris – HCl, pH = 8
objem byl doplněn dH₂O do 25 ml

TE pufr (Tris/EDTA pufr): 10 mM Tris

1 mM EDTA

pH bylo upraveno na 7,4 (5M KOH)

Tekuté LB médium: 10 g LB
400 ml dH₂O
20 mg Kan
rozdělit zhruba po 30 ml do Erlenmeyerových baněk

Agarové plotny: 7,5 g LB
5,8 g agar
320 ml dH₂O
15 mg Kan
rozdělit zhruba na 12 misek

LB médium pro přípravu kompetentních buněk: 10 g bacto-trypton
5 g kvasničný autolyzát
5 g NaCl
50 mg Kan
objem byl doplněn dH₂O do 1 l

EDTA – NaOH (pH = 8): 14,6 g 500 mM EDTA, pH = 8
pH bylo upraveno na 8 (5M NaOH) a objem byl doplněn dH₂O do 100 ml

TAE: 121 g TRIS
29 ml kyselina octová 99%
50 ml 0,5 M EDTA, pH = 8
objem byl doplněn dH₂O do 500 ml

SDS pufr pro horizontální elektroforézu: 4,5 g TRIS
21,6 g glycin
1,5 g SDS
1,5 l dH₂O

Blotovací pufr: 5,68 g glycin
11,62 g TRIS
400 ml methanol

- 1500 ml dH₂O
pH bylo upraveno na 9,2 (10M NaOH) a objem byl doplněn dH₂O do 2 l
- Akrylamid 30%: 29,2 g akrylamid
0,8 g bisakrylamid
25 ml glycerín
50 ml dH₂O
roztok byl přefiltrován přes filtrační papír a objem byl doplněn dH₂O do 100 ml
- Persíran amonný: 0,4 g persíran amonný ((NH₄)₂S₂O₈)
1 ml dH₂O
- Pufr pro dělicí gel: 18,1 g TRIS
0,4 g SDS
80 ml dH₂O
pH bylo upraveno na 8,8 (HCl) a objem byl doplněn dH₂O do 100 ml
→ dále se používá v předpisu pro separační gel pod názvem TRIS/SDS, pH = 8,8
- Pufr pro zaostřovací gel: 6,04 g TRIS
0,4 g SDS
80 ml dH₂O
pH bylo upraveno na 6,8 (HCl) a objem byl doplněn dH₂O do 100 ml
→ dále se používá v předpisu pro zaostřovací gel pod názvem TRIS/SDS, pH = 6,8
- Separací gel: 5 ml dH₂O
3,75 ml TRIS/SDS, pH = 8,8
6,25 ml 30% akrylamid
10 µl TEMED
20 µl persíran amonný
- Převrstvovací pufr: 3,75 ml dH₂O
1,25 ml TRIS/SDS, pH = 8,8

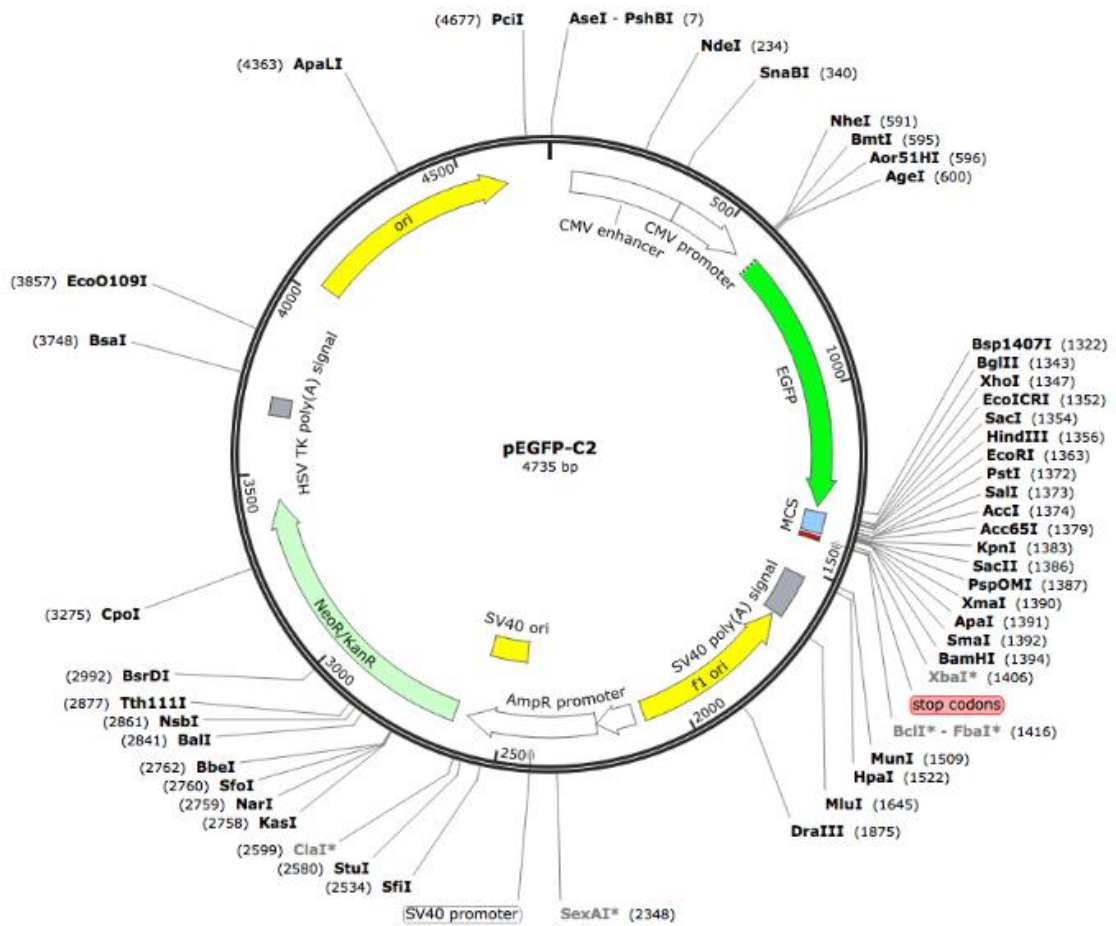
- Zaostřovací gel: 6,2 ml dH₂O
2,5 ml TRIS/SDS, pH = 6,8
1,3 ml 30% akrylamid
10 µl TEMED
20 µl persíran amonný
- DMEM médium se sérem: 510 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
obsahujícího glutamin (Sigma)
5 ml směs antibiotik (penicilin + streptomycin)
50 ml fetální telecí sérum (FCS)
- RPMI médium se sérem: 500 ml RPMI 1640 médium (Roswell Park Memorial Institute)
(Sigma)
10 ml 200 mM glutamin
5 ml směs antibiotik (penicilin + streptomycin)
50 ml fetální telecí sérum (FCS)
- SOC médium: 0,029 g 10 mM NaCl
0,0093 g 2,5 mM KCl
0,102 g 10 mM MgCl₂
0,123 g 10 mM MgSO₄
0,198 g 20 mM glukóza
0,25 g 0,5% kvasničný lyzát
1 g 2% trypton
pH bylo upraveno na 7,0 (NaOH) a objem byl doplněn dH₂O do 50 ml

4.1.3 Vektory

- peGFP_C2: plazmid pro expresi proteinů značených fluorescenčními proteiny, který obsahuje SV40 promotor, gen pro zelený fluorescenční protein (eGFP; Green fluorescent protein) a geny pro rezistenci ke Kan nebo neomycinu. Pro vložení genu pro nukleofosmin a následně i jeho mutované formy A, B, E byla využita restrikční místa BamHI a XhoI. Selektce byla provedena

pomocí kan^r. Mapa plazmidu je na obr. 9. (poskytnut Doc. D. Staňkem, PhD; Ústav molekulární genetiky, Akademie věd AV ČR)

- peGFP_C23: plazmid peGFP_C2 se zaklonovaným nukleolinem použitý jako zdroj sekvence vektoru pro zaklonování inzertu, tj. různých forem NPM, z důvodu jasné odlišitelnosti původního a cílového plazmidu (poskytnut RNDr. A. Holoubkem PhD., Oddělení proteomiky, Ústav hematologie a krevní transfuze ÚHKT)
- pmRFP1_C2: viz peGFP_C2, ale značený červeným fluorescenčním proteinem mRFP1 (RFP; red fluorescent protein)
- pmRFP1_C23: viz peGFP_C23, ale značený červeným fluorescenčním proteinem mRFP1
- pmRFP1_wtNPM: viz peGFP_C2, ale značený RFP a obsahující zaklonovaný gen pro NPM (z cDNA knihovny Jurkat Library (Origene), poskytnut RNDr. A. Holoubkem PhD., Oddělení proteomiky, Ústav hematologie a krevní transfuze ÚHKT)



Obrázek č. 9. Mapa vektoru eGFP-C2 (převzato z http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/fluorescent_protein_genes_and_plasmids/pEGFP-C2/)

4.1.4 Buněčné linie

Buněčná linie HeLa: lidská buněčná linie odvozená od nádorových buněk pacientky s rakovinou děložního čípku (poskytnuto doc. RNDr. J. Malínským, PhD.; Ústav experimentální medicíny AV ČR)

Buněčná linie HEK293T: lidská buněčná linie odvozená z embryonálních buněk ledvin s přidaným genem pro velký T antigen polyomaviru SV40, jenž umožňuje replikaci plazmidů obsahujících replikační počátek SV40 (poskytnuto RNDr. Š. Němečkovou, DrSc.; Oddělení imunologie, Ústav hematologie a krevní transfuze ÚHK)

Buněčná linie NIH 3T3: stabilní buněčná linie myších fibroblastů (poskytnuto PhDr. M. Jirouškovou, PhD.; Ústav molekulární genetiky AV ČR)

4.1.5 Bakteriální kmeny

Escherichia coli Top10 Chemically Competent: (Invitrogen)

4.1.6 Kity

PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega): kit pro izolaci plazmidové DNA z malého množství bakteriální kultury

protokol →

<https://www.promega.com/~media/files/resources/protcards/pureyield%20plasmid%20miniprep%20system%20quick%20protocol.pdf>

PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen): kit pro izolaci DNA z agarózového gelu
protokol →

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_quick_gel_extraction_kit_qrc.pdf

4.1.7 Primery pro PCR reakce

Primery byly navrženy pomocí veřejně dostupného nástroje Primer Blast databáze Pubmed. Následně byly doplněny o příslušná restrikční místa a sekvence s mutacemi.

4.1.7.1 Primery pro mutagenní PCR

NPM_wt_F: 5' AAA AAA **CTC GAG** CAT GGA AGA TTC GAT GGA CAT G 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro XhoI, zeleně iniciační kodon, podtržená část odpovídá vlastnímu primeru pro PCR reakci

NPM_mutA_R: 5' AAT TAA **GGA TCC** ACT ATT TTC TTA AAG AGA CTT CCT CCA CTG **CCA GAC** AGA GAT CTT GAA TAG CCT CTT GGT CAG 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro BamHI, modře stop kodon, fialově báze uváděné u mutace A, podtržená část odpovídá vlastnímu primeru pro PCR reakci

NPM_mutB_R: 5' AAT TAA **GGA TCC ACT** ATT TTC TTA AAG AGA CTT CCT CCA CTG **CCA TGC** AGA GAT CTT GAA TAG CCT CTT GGT CAG 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro BamHI, modře stop kodon, fialově báze uváděné u mutace B, podtržená část odpovídá vlastnímu primeru pro PCR reakci

NPM_mutE_R: 5' AAT TAA **GGA TCC ACT** ATT TTC TTA AAG AGA CTT **GGG CAA GAG** ACT GCC AGA GAT CTT GAA TAG CCT CTT GGT CAG 3'

Červeně je vyznačeno restrikční místo pro BamHI, modře stop kodon, fialově báze uváděné u mutace E, podtržená část odpovídá vlastnímu primeru pro PCR reakci

4.1.7.2 Primery pro sekvenační PCR

sekvenační reverse primer (5 μ M) (IDT): ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGA

sekvenační forward primer (5 μ M) (IDT): ACTACCTGAGCACCCAGT

4.1.8 Antibiotika

Kanamycin (Kan): používaná konečná koncentrace 50 μ g/ml (Gibco)

Penicilin streptomycin (Sigma)

4.1.9 Protilátky

4.1.9.1 Primární protilátky

GFP (B-2): myší monoklonální protilátka proti eGFP, pro western blot ředěno 1:1000, pro imunofluorescenci ředěno 1:50 v 0,2% roztoku Tween20 v PBS(PBS-TW) (Santa Cruz Biotechnology)

B23 (E-3): myší monoklonální protilátka pro epitop mezi AMK 253-294 NPM1, pro western blot ředěno 1:500 (Santa Cruz Biotechnology)

B23 (3F291): myší monoklonální protilátka proti N konci NPM1, pro western blot ředěno 1:1000, pro imunofluorescenci ředěno 1:50 v PBS-TW (Santa Cruz Biotechnology)

B23 (7H10B9): myší monoklonální protilátka proti rekombinantnímu lidskému NPM1, pro imunofluorescenci ředěno 1:50 v PBS-TW (Santa Cruz Biotechnology)

β -actin (C4): myší monoklonální protilátka proti β -aktinu, pro western blot ředěno 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology)

4.1.9.2 Sekundární protilátky

Kozí imunoglobuliny namířené proti myším imunoglobulinům konjugované s peroxidázou, pro western blot ředěno 1:50000 (ThermoFischer)

Kozí sekundární protilátka konjugovaná s Alexa Fluor 647 namířená proti myším imunoglobulinům, pro fixaci ředěno 1:200 v PBS-TW (Invitrogen)

4.1.10 Markery molekulových vah

4.1.10.1 DNA marker molekulových vah

GeneRuler™ DNA ladder Mix (Fermentas): 100 – 10000 bp

Easy ladder II (Bioline): 500 – 5000 bp (každý band odpovídá 50 ng DNA)

4.1.10.2 SDS-PAGE marker molekulových vah

Pink protein Ladder (Biosystems): asi 10 – 175 kDa

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Roztoky byly sterilizovány ve sterilizátoru Tuttnaver 2540EL (20 min, 121 °C). Špičky k mikropipetám, mikrozkuhavky a párátka byly sterilizovány v autoklávu STERIVAP 636 1ED (20 min, 105 kPa, 121 °C). Skleněné pipety a chemické sklo uzavřené pomocí aluminiového obalu byly sterilizovány ve sterilizátoru Stericell (2 hod, 180 °C). Mikrobiologické kličky byly sterilizovány plamenem.

4.2.2 Práce s bakteriálními kulturami

4.2.2.1 Kultivace bakterií

Kultivace bakterií probíhala přes noc na agarových plotnách s LB médiem (viz kapitola Materiál) v termostatu při 37 °C nebo v tekutém LB médiu (viz kapitola Materiál) v temperované orbitální třepačce při 37 °C.

Bakterie *Escherichia coli* Top10 z konzervy byly zaočkovány do 20 ml LB média. Suspenze byla inkubována za intenzivního třepání (230 rpm) přes noc při 37 °C. Následující den byl zaočkován 1 ml získaného inokula do 100 ml LB média v baňce o objemu 1 l a suspenze byla následně kultivována opět za intenzivního třepání při 37 °C, aby výsledná optická denzita kultury byla při 590 nm zhruba O.D.⁵⁹⁰ ~ 0,375. Poté byla baňka s kulturou inkubována 10 min v ledové tříšti. Následně byla suspenze rozdělena do dvou 50 ml centrifugačních zkumavek a centrifugována 10 min při 10000 g a 4 °C. Pelet v každé centrifugační zkumavce byl resuspendován ve 25 ml vychlazeného sterilního roztoku CaCl₂ (100 mM CaCl₂, pH = 8) a suspenze asepticky převedena do jedné 50 ml centrifugační zkumavky. V ní byla suspenze následně inkubována 20 min na ledu. Pak byla centrifugována 10 min při 10000 g a 4 °C a pelet byl resuspendován ve směsi 1,75 ml ledového roztoku CaCl₂ a 0,75 ml glycerolu. Suspenze byla rozdělena po 100 µl do vychlazených sterilních 1,5 ml mikrozkušavek, inkubována 30 min na ledu a poté uchována v -80 °C. Kompetence bakterií byla ověřena zkušební transformací plazmidové DNA.

4.2.2.2 Transformace plazmidové DNA do kompetentních bakterií *E. coli*

Mikrozkušavka se 100 µl chemicky kompetentních buněk zamražených v -80 °C se nechala mírně roztát na ledu po dobu asi 2 min. Poté bylo k těmto buňkám za opatrného míchání špičkou mikropipety přidáno 5–10 µl ligační směsi. Následně byla směs inkubována 20–40 min na ledu. Umístěním mikrozkušavky s buňkami na 50 s do 42 °C byl proveden teplotní šok (heat shock), po němž následovalo okamžité zchlazení mikrozkušavky na ledu po dobu několika min. K buňkám pak bylo opatrně přidáno 450 µl SOC média (viz kapitola Materiál) a takto byly inkubovány 1 hod na třepačce při 37 °C. 80 µl, 160 µl a zbytek buněčné suspenze byl vyset sterilní mikrobiologickou kličkou na 3 agarové plotny s Kan (viz kapitola Materiál). Tyto misky byly inkubovány přes noc v termostatu při 37 °C.

4.2.2.3 Příprava konzerv z bakterií *E. coli*

Bakterie byly přes noc inkubovány v tekutém LB médiu s antibiotikem (viz kapitola Materiál) při 37 °C za stálého třepání (230 rpm). Z takto kultivované bakteriální kultury bylo následně podle potřeby odebráno po 850 µl do připravených sterilních plastových

mikrozkumavek a ke každé alikvótě bylo přidáno 200 μ l glycerolu. Po jemném promíchání byly konzervy uloženy do -80 °C.

4.2.3 Práce s DNA

4.2.3.1 Příprava genů obsahujících mutace

Pro přípravu genů nesoucích mutace A, B a E byla použita PCR. Forward primery byly navrženy tak, aby specificky hybridizovaly s N koncem NPM. Reverse primery byly konstruovány tak, aby obsahovaly danou mutagenní sekvenci. Oba primery dále obsahovaly restriční místa, pro XhoI ve forward primeru a pro BamHI v reverse primeru (viz kapitola Materiál). Výchozí templát pro PCR - mRFP1_wtNPM - jsem měla k dispozici (viz kapitola Materiál). První PCR reakce využívající Taq DNA polymerázu byla provedena pro ověření specifity a funkčnosti navržených primerů. Teplotní protokoly jsou uvedeny v Tabulce č. 5 a č. 6.

PCR reakční směs 1.: 0,5 μ l 100x ředěný templát (mRFP1_wtNPM; c = 351,8 ng/ μ l)

1 μ l forward primer (c = 5 μ M), zásobní roztok c = 100 μ M 20x ředěný

1 μ l reverse primer (c = 5 μ M), zásobní roztok c = 100 μ M 20x ředěný

10 μ l demiH₂O

12,5 μ l Master mix EmeraldAmpGT (Takara, obsahuje Taq DNA polymerázu)

PCR reakční směs 2.: 2 μ l 100x ředěný templát (mRFP1_wtNPM; c = 351,8 ng/ μ l)

2 μ l forward primer (c = 5 μ M), zásobní roztok c = 100 μ M 20x ředěný

2 μ l reverse primer (c = 5 μ M), zásobní roztok c = 100 μ M 20x ředěný

38 μ l demiH₂O

1 μ l dNTP

5 μ l 10X pufr pro Pfu polymerázu (Promega)

0,8 μ l Pfu polymeráza (Promega)

Rozvařením 0,5 g agarózy v 50 ml TAE pufru byl připraven 1% gel, na který bylo naneseno 5 μ l vzorku v případě amplifikace Taq polymerázou v EmeraldAmpGT Master mixu s přidanou barvičkou nebo 2 μ l vzorku s 1 μ l nanášecí barvy (6X Loading Dye, Thermo Scientific), 5 μ l markeru GeneRulerTM DNA ladder Mix a případně 5 μ l markeru Easy ladder II

pro kvantifikaci. Elektroforéza probíhala při napětí 95 V po dobu 1 hod 30 min a následně byl gel vložen na 60 min do lázně s EtBr. Koncentrace produktu byla odhadnuta pomocí agarózové gelové elektroforézy za použití dokumentačního systému Bio-imaging a programu Aida Image Analyzer pro analýzu získaného obrazu.

Tabulka č. 5. PCR program pro ověření specifity navržených primerů

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	5 min	35x
95 °C	1 min	
58 °C	0,45 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Tabulka č. 6. PCR program pro amplifikaci sekvence NPM s různými mutacemi

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	2 min	35x
95 °C	1 min	
58 °C	0,5 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	

4.2.3.2 Štěpení DNA restrikčními enzymy

Restrikční endonukleázy rozpoznávají specifické, krátké úseky na DNA a jsou schopny rozštěpit dsDNA v těchto místech. Každá reakce obsahovala 2 µl BamHI, 1 µl XhoI, 8 µl 10X Yellow Buffer a pokud to koncentrace PCR produktu umožnila, 2 µg DNA. Celkový objem reakce byl pokaždé doplněn dH₂O na 42 µl. Restrikční směs byla inkubována 3–3,5 hod při 37 °C.

Restrikční směs:

wt NPM + vektor_mRFP1	8,5 µl plazmid mRFP1_wtNPM (c = 242,6 ng/µl)
vektor_GFP	1 µl plazmid peGFP_C23 (c = 2 µg/µl)
vektor_RFP	1,4 µl plazmid mRFP1_C23 (c = 1,5 µg/µl)
pro přípravu mut A:	25 µl mutNPM_A (c = 107,5 ng/µl)
pro přípravu mut B:	22 µl mutNPM_B (c = 111,5 ng/µl)
pro přípravu mut E:	25 µl mutNPM_E (c = 53 ng/µl)
	4 µl plazmid peGFP_mutNPM_E (c = 494,8 ng/µl)

4.2.3.3 Agarózová gelová elektroforéza a izolace DNA z gelu

DNA fragmenty byly separovány na základě velikosti pomocí agarózové gelové elektroforézy. Rozvařením 0,5 g agarózy v 70 ml TAE pufru byl připraven 0,7% gel. Každý vzorek byl smíchán s 8 μ l 6X Loading Dye a nanesen do dvou jamek ztuhlého gelu. Elektroforéza probíhala při napětí 95V po dobu 1 hod 15 min. Následně byl gel vložen na 40–50 min do lázně s EtBr. Požadované DNA fragmenty byly detegovány na UV transluminátoru, vyříznuty z gelu a izolovány a přečištěny kitem PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (viz kapitola Materiál) dle pokynů výrobce.

Izolované a přečištěné DNA fragmenty byly separovány na základě velikosti pomocí agarózové gelové elektroforézy. Rozvařením 0,5 g agarózy v 50 ml TAE pufru byl připraven 1% gel. 2 μ l vzorku byly smíchány s 1 μ l 6X Loading Dye a 4 μ l H₂O, dále bylo naneseno 5 μ l markeru Easy ladder II a 5 μ l markeru GeneRuler™ DNA ladder Mix. Elektroforéza probíhala při napětí 95V po dobu 1 hod 15 min. Následně byl gel vložen na 55 min do lázně s EtBr. Požadované DNA fragmenty byly detegovány systémem dokumentačního Bio-imaging a výsledné obrazové soubory následně kvantifikovány na počítači programem Aida Image Analyzer srovnáním s kvantifikačním markerem Easy ladder II.

4.2.3.4 Klonování mutovaných genů do příslušných plazmidů

Integrace inzertu do vektoru se provádí tzv. ligací pomocí enzymu T4 DNA ligáza. Na základě výsledků kvantifikace DNA a poměrů molekulárních hmotností vektoru a inzertu byla nastavena koncentrace složek ligační reakce tak, aby jejich výsledný poměr byl inzert:vektor = 3:1. Každá ligační směs obsahovala 4 μ l pufru pro T4 DNA ligázu a 1 μ l T4 DNA ligázy. Objem reakce byl pokaždé doplněn dH₂O na 41 μ l. Ligace probíhala 6 hod při 16 °C. Poté byla T4 DNA ligáza inaktivována 10 min při 65 °C a do směsi byly přidány 4 μ l NaAc a 100 μ l ethanolu pro vysrážení DNA. Ligační směs byla mírně protřepána a ponechána v -20 °C do následujícího dne.

Pokud byl nějaký konstrukt použit jako výchozí pro další štěpení a ligaci, jeho sekvence byla vždy před dalším klonováním ověřena sekvenováním.

Ligační směs:	eGFP_wtNPM	22 μ l inzert (c = 16,6 ng/ μ l)
		14 μ l vektor (c = 74 ng/ μ l)

e GFP_mut A	5 µl inzert ($c_A = 107,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) 14 µl vektor ($c = 74, \text{ ng}/\mu\text{l}$)
eGFP_mut B	4,5 µl inzert ($c = 111,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) 13,5 µl vektor ($c = 74 \text{ ng}/\mu\text{l}$)
mRFP1_mutA	5 µl inzert ($c_A = 107,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) 15 µl vektor ($c = 69,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$)
mRFP1_mutB	5 µl inzert ($c = 111,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) 15 µl vektor ($c = 69,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$)
e GFP_mutE	10 µl inzert ($c = 50,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) 22 µl vektor ($c = 29,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$)
mRFP1_mutE	22 µl inzert ($c = 14,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$) 11 µl vektor ($c = 50,7 \text{ ng}/\mu\text{l}$)

4.2.3.5 Transformace kompetentních buněk *E. coli* teplotním šokem

Následující den byla ligační směs centrifugována 30 min při 10000 g a 4 °C. Supernatant byl odebrán a pelet se nechal sušit při laboratorní teplotě asi 30–50 min. V případě mutanta typu E byla pro linearizaci nežádoucích plazmidů namíchána restriční směs s enzymem HindIII. Ta byla s ligační směsí inkubována 2 hod při 37 °C. Pro inaktivaci enzymu HindIII byla mikrozkuhavka inkubována 20 min v 80 °C. Směs pak byla protřepána a krátce zcentrifugována. Dále viz kapitola Transformace plazmidové DNA do chemicky kompetentních bakterií *E. coli*.

Restriční směs: ligační směs – vysušený pelet
 18 µl H₂O
 2 µl Red Buffer (výsledná koncentrace 1X)
 0,5 µl HindIII

4.2.3.6 Izolace plazmidové DNA pomocí „Boiling miniprep“

Pro orientační testování pozitivních transformantů *E.coli* byla plazmidová DNA izolována metodou „Boiling miniprep“ (modifikováno podle SAMBROOK *et al.* 1989).

Z agarových ploten byly náhodně vybrány kolonie a sterilně párátkem přeneseny na další agarové plotny s Kan. Ty byly inkubovány přes noc při 37 °C a následně uloženy v lednici. Pro další analýzu byly jednotlivé klony opět sterilně přeneseny na agarové plotny s Kan a inkubovány přes noc při 37 °C. Následující den byly narostlé bakterie párátkem odebrány a resuspendovány v 200 µl STET (viz kapitola Materiál) v nesterilních mikrozkuvkách. Vzorky byly důkladně promíchány a pak byly inkubovány 50 s ve vroucí vodě. Po vychladnutí byly centrifugovány 8 min při 10000 g. Párátkem byl odstraněn pelet a k supernatantu byl přidán přibližně stejný objem izopropanolu. Mikrozkuvky byly krátce prudce promíchány a na 1,5 hod inkubovány v -20 °C. Po uplynulé době byly centrifugovány 8 min při 10000 g a 4 °C, pipetou byl odstraněn supernatant a pelet se nechal sušit při laboratorní teplotě asi 40 min. Na závěr bylo k sedimentu přidáno 20–25 µl TE pufru (viz kapitola Materiál) a vzorky byly separovány a analyzovány podle velikosti pomocí agaróзовé gelové elektroforézy.

V případě mutantů typu A a B bylo provedeno kontrolní restriční štěpení pozitivních klonů enzymy BamHI a XhoI. Klony, které se jevíly po tomto štěpení jako pozitivní, byly následně použity pro izolaci kitem Promega. Restriční směs byla inkubována 2 hod při 37 °C.

Restriční směs:

- 8 µl H₂O
- 4 µl Yellow Buffer
- 4 µl testovaného plazmidu nesoucího NPM s mutací typu A nebo B
- 1 µl XhoI
- 2 µl BamHI

4.2.3.7 Izolace plazmidu ve vysoké čistotě pomocí kitu Promega

Klony vybrané při testování byly přeneseny za použití kahanu, mikrobiologické kličky a sterilního párátku na agarové plotny s Kan (viz kapitola Materiál) a rozetřeny do jednotlivých kolonií. Plotny pak byly inkubovány při 37 °C přes noc. Následující den byla vybraná monokolonie zaočkována do tekutého LB média s Kan (viz kapitola Materiál) a inkubována na třepače při 37 °C přes noc. Další den byly z narostlé kultury připraveny konzervy pro další uchování jednotlivých klonů v -80 °C a plazmidová DNA z narostlého inokula byla izolována pomocí kitu PureYield™ Plasmid Miniprep System podle návodu (viz kapitola Materiál) s jednou změnou - před krok 10 byla zařazena centrifugace

mikrozkumavek s kolonkami a odsátým supernatantem po dobu 1 min při 5500 g pro důkladné odstranění promývacího roztoku.

4.2.3.8 Spektrofotometrické metody

Výsledná koncentrace a čistota DNA byla vždy zjišťována pomocí přístroje ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop). Spektrofotometr byl očištěn dH₂O. Pro kalibraci přístroje bylo nanášeno 5 µl dH₂O a jako blank 2 µl dH₂O. Následně byla změřena koncentrace izolované DNA, přičemž byly nanášeny vždy 2 µl vzorku. Koncentrace DNA včetně její čistoty byla určena pomocí softwaru NanoDrop 1000 V3.8.1.

4.2.3.9 Sekvenace

Sekvenační analýza byla provedena Laboratoří sekvenace DNA (PřF UK), která k sekvenování využívá 3 analyzátoř firmy Applied Biosystems - čtyřkapilární 3130 Genetic Analyzer, šestnáctikapilární 3130xl Genetic Analyzer a dvacetičtyřkapilární 3500 Genetic Analyzer. Vzorky pro sekvenační reakci byly připravovány do 0,2 ml tenkostěnných zkumavek.

Reakční směs:

- 1 µl plazmid o koncentraci = 300 ng/1 reakce
- 1 µl sekvenační reverse primer (5 µM)
- 1 µl sekvenační forward primer (5 µM)
- 6 µl demineralizované H₂O (demi H₂O)

4.2.4 Práce s tkáňovými kulturami

Pozn.: Média, PBS, transfekční činidlo a pufr je nutno před použitím vytemperovat na laboratorní teplotu; 0,25% trypsin-EDTA je nutno předeřhát na 37 °C.

4.2.4.1 Práce s kulturou buněčné linie HEK293T

4.2.4.1.1 Pasážování

Z konfluentně porostlé kultivační lahvičky o ploše 25 cm² bylo odsáto DMEM médium se sérem (viz kapitola Materiál). Buňky byly rychle a krátce opláchnuty 2 ml 0,25% trypsin-

EDTA a následně inkubovány v 0,5 ml 0,25% trypsin-EDTA při laboratorní teplotě, dokud se neuvolnily ode dna kultivační lahvičky (asi 20 s). K uvolněným buňkám bylo přidáno 10 ml DMEM média se sérem pro zablokování trypsinu a buňky byly resuspendovány opakovaným protažením skleněnou pipetou. Suspenze byla přenesena do 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugována 5 min při 300 g. Médium bylo odsáto, k peletě bylo přidáno 5 ml nového DMEM média se sérem a buňky byly resuspendovány opakovaným protažením skleněnou pipetou. Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 0,5 ml do nové sterilní kultivační nádoby a šetrně promícháno s 10 ml DMEM média se sérem. Pasáž byla prováděna 3x do týdne.

4.2.4.1.2 Počítání buněk

Ze suspenze buněk získané po resuspenzi pelety během pasážování bylo odebráno 18 μ l a smícháno v mikrozkuhavce s 18 μ l 0,4% roztoku trypanové modři. Tato směs pak byla nanesena na obě strany Bürkerovy komůrky a pod světelným mikroskopem byly spočítány živé buňky. Z toho byla určena koncentrace buněk (viz vzorec níže) a stanoven požadovaný počet buněk na miskách.

Vzorec pro výpočet počtu buněk (<http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>) \rightarrow

$P = (N \times D \times 1000) / (H \times S)$, kde:

P = je počet buněk na 1 ml suspenze; N = je celkový počet buněk; D = 2 (ředění suspenze);

H = 0,1 (hloubka komůrky v mm); S = je počet čtverců

Na misky o průměru 29 mm byly vysety 2 ml kultury o koncentraci 120000 buněk/ml.

4.2.4.1.3 Transfekce rekombinantním plazmidem

Transfekce buněk plazmidovou DNA byla provedena chemicky za použití transfekčního činidla jetPrime (Polyplus transfection) a příslušného pufru jetPrime buffer. Ve sterilní mikrozkuhavce byla připravena transfekční směs o složení 100 μ l jetPrime pufru, 1 μ g plazmidové DNA a 2 μ l činidla jetPrime. Tato směs byla vortexována po dobu asi 15 s a potom inkubována 20 min při laboratorní teplotě. Poté byla po kapkách přidána do 2 ml kultury buněk o 60–80% konfluenci narostlé v miskách o průměru 29 mm se dnem tvořeným krycím sklíčkem pro mikroskopii (In Vitro Scientific). Následovala inkubace 4 hod

při 37 °C. Po uplynutí této doby bylo médium odsáto, k buňkám bylo přidáno čerstvé médium se sérem a misky byly inkubovány 24 hod a více při 37 °C.

4.2.4.1.4 Nepřímá imunodetekce

Buňkám transfekovaným plazmidovou DNA (peGFP_mutNPM_A) bylo druhý den po transfekci odebráno médium, byly 2x opláchnuty PBS (viz kapitola Materiál) a fixovány v 250 µl 4% formaldehydu v lednici přes noc. Následující den byly opět 2x opláchnuty PBS a pro permeabilizaci byly na 10 min inkubovány s 200 µl 0,2% Tritonu X-100. Poté byly promývány 3x 5 min v PBS-TW. Pro omezení nespecifit byly přidány 3 kapky Signal Enhanceru (součást SFX Kitu obsahujícího fluorescenčně značenou sekundární protilátku). Po 30 min působení tohoto činidla byly buňky opět promyty 3x 5 min v PBS-TW. Pak byla přidána primární myší protilátka v příslušném ředění (viz kapitola Materiál), buňky s ní byly inkubovány 1 hod a po uplynulé době promyty 3x 5 min PBS-TW. Následovala inkubace se sekundární anti-myší protilátkou Alexa Fluor 647 v příslušném ředění (viz kapitola Materiál) a 1µl 1mM barviva Hoechst33342, přičemž inkubace probíhala ve tmě a po dobu 1 hod. Na závěr byly buňky promývány 2x 5 min v PBS-TW a zality PBS. Poté byly pozorovány konfokálním mikroskopem.

4.2.4.2 Práce s kulturou buněčné linie HeLa

4.2.4.2.1 Pasážování

Z konfluentně narostlé kultivační nádoby o ploše 25 cm² bylo odsáto RPMI médium se sérem (viz kapitola Materiál). Buňky byly 2x opláchnuty 10 ml PBS (viz kapitola Materiál) a následně inkubovány 2,5 min v 0,5 ml 0,25% trypsin-EDTA při teplotě 37 °C, dokud se neuvolnily ode dna kultivační nádoby. K uvolněným buňkám bylo přidáno 10 ml RPMI média se sérem a buňky byly resuspendovány opakovaným protažením skleněnou pipetou. Suspenze byla přenesena do 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugována 5 min při 300 g. Médium bylo odsáto, k peletě bylo přidáno 10 ml nového RPMI média se sérem a buňky byly resuspendovány opakovaným protažením skleněnou pipetou. Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 1–1,5 ml do nové sterilní kultivační nádoby a šetrně promícháno s 10 ml RPMI média se sérem. Pasáž byla prováděna 3x do týdne.

4.2.4.2.2 Počítání buněk

Počítání HeLa probíhá stejným způsobem jako HEK293T s výjimkou stanovení koncentrace buněk pro vyšetí na misky na 100000 buněk/ml.

4.2.4.2.3 Transfekce rekombinantním plazmidem

Transfekce HeLa probíhá stejným způsobem jako HEK293T.

4.2.4.2.4 Fixace

Fixace HeLa probíhá stejným způsobem jako HEK293T.

4.2.4.3 Práce s kulturou buněčné linie NIH 3T3

4.2.4.3.1 Pasážování

Pasážování NIH 3T3 probíhá stejným způsobem jako HEK293T s rozdílem v délce působení trypsinu, která trvá zhruba 1 min.

4.2.4.3.2 Počítání buněk

Počítání NIH 3T3 probíhá stejným způsobem jako HEK293T s výjimkou stanovení koncentrace buněk pro vyšetí na misky na 100000 buněk/ml.

4.2.4.3.3 Transfekce rekombinantním plazmidem

Transfekce NIH 3T3 probíhá stejným způsobem jako HEK293T s rozdílem množství použitého transfekčního činidla jetPrime - 3 μ l.

4.2.5 Práce s proteiny

4.2.5.1 Příprava buněčných lyzátů pro SDS-PAGE

Médium z Petriho misky (5 ml) s narostlou buněčnou kulturou bylo odsáto. Buňky byly 2x opláchnuty 5 ml PBS (viz kapitola Materiál) a následně inkubovány 2,5 min v 300 μ l

0,25% trypsin-EDTA při 37 °C, dokud se neuvolnily ode dna Petriho misky. K uvolněným buňkám bylo přidáno 5 ml příslušného média se sérem a buňky byly resuspendovány. Suspenze byla přenesena do 15 ml centrifugační zkumavky a centrifugována 7 min při 300 g. Supernatant byl slit a pelet resuspendován v 1 ml PBS. Suspenze byla přepipetována do mikrozkuvek a centrifugována 5 min při 134 g. PBS bylo odstraněno Pasteurovou pipetou a k peletu bylo přidáno 150 µl vzorkového pufru (viz kapitola Materiál). Takto připravený vzorek byl 5 min inkubován ve vodní lázni o teplotě 93 °C. Následně byl vzorek zchlazen alespoň 15 min v -20 °C a poté centrifugován 4 hod při 180000 g a 4 °C. Supernatant byl odebrán do nové mikrozkuvky, opět 5 min inkubován ve vodní lázni o teplotě 93 °C a po stočení rozdělen pomocí SDS-PAGE.

4.2.5.2 SDS-PAGE

Skla pro elektroforézu byla důkladně omyta čistícím prostředkem a vodou a odmaštěna ethanolem. Suchá skla byla umístěna do nalévací aparatury a fixem na nich byl vyznačen spodek zubů hřebenu. Mezi skla byl nalit separační gel (viz kapitola Materiál) do výšky asi 3 mm pod okraj zubů hřebenu. Gel byl převrstven převrstvovacím pufrem (viz kapitola Materiál) a polymeroval asi 60 min. Poté byl převrstvovací pufr odstátý filtračním papírem, byl nalit zaostřovací gel (viz kapitola Materiál) a do aparatury vsunut hřeben. Gel polymeroval asi 30 min. Následně byl hřeben vytáhnout, skla byla přenesena do elektroforetické vany a jamky byly naplněny SDS pufrem (viz kapitola Materiál). Do první z jamek bylo pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky nanášeno 2 µl markeru Pink protein Ladder, do ostatních jamek 8 µl každého vzorku. Do elektroforetické vany bylo nalito 400 ml SDS pufru (viz kapitola Materiál) a do středu nalévací aparatury bylo přidáno 20 µl 0,005% roztoku BFM. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V asi 1 hod, dokud čelo označené BFM nedorazilo ke spodnímu okraji gelu.

4.2.5.3 Western blot

Nejprve bylo do 250 ml blotovacího pufru (viz kapitola Materiál) odváženo 0,1 g SDS. Polyvinyliden difluoridová (PVDF) membrána byla opláchnuta methanolem a následně demineralizovaná H₂O. Poté byla společně s filtračními papíry namáčena v připraveném blotovacím pufre po dobu 20 min. Filtrační papíry a membrána musí mít stejné rozměry jako

gel. Na desku blotteru byl položen jeden filtrační papír o tloušťce 0,4 mm nasycený blotovacím puřrem a byl uhlazen válečkem, aby byly odstraněny vzduchové bubliny. Dále byla přenesena navhlčená membrána a akrylamidový gel. Na závěr byl přenesen opět jeden filtrační papír nasycený blotovacím puřrem a vrstvy byla opatrně uhlazeny válečkem. Na takto připravený blotovací sendvič byla položena vrchní deska blotteru, přebytek blotovacího puřru byl slit a aparatura byla připojena ke zdroji napětí. Blotování probíhalo po dobu 1,5 hod při proudu 140 mA.

4.2.5.4 Imunodetekce proteinů imobilizovaných na PVDF membráně

PVDF membrána byla zatavena do fólie, která byla ze 3 stran uzavřena pomocí svářečky. Do takto připravené fólie bylo napipetováno dle velikosti membrány několik ml 5% roztoku odtučněného sušeného mléka v 0,5% roztoku Tween20 v PBS (PBS-T), svorkou byla uzavřena poslední strana fólie a membrána byla takto blokována na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1 hod. Poté byla přidána primární myšší protilátka v příslušném ředění (viz kapitola Materiál) a membrána v ní byla inkubována na třepačce při 4 °C přes noc. Druhý den byla membrána promývána 6x 5 min v PBS-T. Následovala inkubace se sekundární kozí protilátkou konjugovanou s peroxidázou (viz kapitola Materiál) po dobu 1 hod. Membrána pak byla opět promývána 6x 5 min v PBS-T. Podle návodu byl smíchán roztok luminolu a peroxidu v poměru 1:1 a kapáním nanesen na membránu. Inkubace probíhala 5 min, poté byla membrána vložena do fólie tak, aby mezi membránou a fólií nezůstaly vzduchové bubliny. Signál z označené membrány byl následně vyvolán prostřednictvím přístroje G:box Chemi XT4 (ThermoScientific).

4.2.5.5 Průtoková cytometrie

Vzorky pro analýzu pomocí průtokové cytometrie (FACS; Fluorescence-activated cell sorting) byly odebrány během přípravy buněčných lyzátů pro SDS-PAGE v kroku předcházejícím centrifugaci suspenze po dobu 5 min při 270 g. Fluorescenční signál byl detekován pomocí průtokového cytometru LSRFortessa Analyzer (BD Biosciences). Účinnost transfekce byla stanovena jako procento buněk s pozitivním signálem v kanále FITC (eGFP

fluorescence) a/nebo PE (mRFP1 fluorescence). Pro zjištění procenta mrtvých buněk byla suspenze obarvena roztokem Hoechst33342.

4.2.6 Statistická analýza

Hypotézy o shodě středních hodnot byly testovány za použití Studentova t testu s využitím statistického software GraphPad InStat. Statistická hodnota p menší než 0,05 je považována za ukazatel statisticky významného rozdílu mezi dvěma soubory hodnot (tab. 7).

Tabulka č. 7. Vysvětlení značení statistických hladin významnosti

	hladina významnosti	označeno v grafu
statistická p hodnota	< 0,05	*
	< 0,01	**
	< 0,001	***

5 VÝSLEDKY

5.1 Konstrukce plazmidů nesoucích gen pro wtNPM a jeho mutované formy

Jako zdroj sekvence wtNPM pro klonování byl použit plazmid pmRFP1_wtNPM připravený v naší laboratoři. Sekvence wtNPM byla z tohoto plazmidu přenesena do plazmidu peGFP_C2 standardními metodami molekulárního klonování. Funkčnost a specifita primerů navržených pro přípravu mutovaných forem NPM byly ověřeny pomocí standardní PCR za použití Taq DNA polymerázy. Jako templát pro tuto reakci sloužil původní plazmid s nemutovanou sekvencí – pmRFP1_wtNPM. Po ověření primerů byl úsek DNA, který měl posloužit jako inzert, amplifikován pomocí PCR s Pfu polymerázou. Získaný produkt byl rozdělen prostřednictvím agarózové elektroforézy a kvantifikován softwarem Aida Image Analyzer.

Jako zdroj sekvence vektoru peGFP_C2 a pmRFP1_C2 pro zaklonování inzertu byly využity plazmidy peGFP_C23 a pmRFP1_C23 dostupné v naší laboratoři. Sekvence DNA kódující protein C23 byla v těchto plazmidech vnesena mezi místa rozpoznávaná restrikčními enzymy BamHI a XhoI. Tato restrikční místa sloužila též pro klonování různých forem NPM. Plazmidy peGFP_C23 a pmRFP1_C23 byly použity za účelem odlišení původního plazmidu od plazmidu cílového při testování klonů vybraných po transformaci ligační směsí do kompetentních buněk.

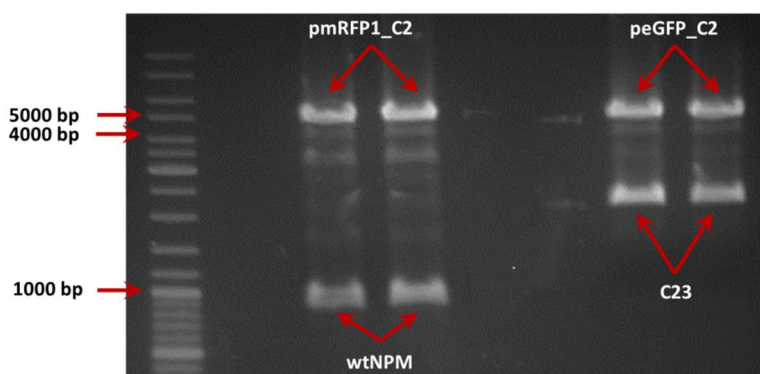
PCR produkt i vektor byly štěpeny restrikčními endonukleázami BamHI a XhoI a rozděleny v 0,7% agarózovém gelu (obr. 10). Pro následné klonování produktu do vektoru byly obě složky z gelu vyizolovány a přečištěny kitem PureLink™ Quick Gel Extraction Kit a opět kvantifikovány softwarem Aida Image Analyzer (obr. 11). Inzert byl následně ligován do vektoru za použití T4 DNA ligázy. Ligační směs byla transformována metodou teplotního šoku do kompetentních buněk *E. coli* Top10 Chemically Competent. Transformované buňky byly vysety na agarové plotny s Kan a následně byla z dostatečného počtu narostlých kolonií izolována plazmidová DNA metodou „Boiling miniprep“ (obr. 12 a 13). Plazmidová DNA izolovaná z vybraných kolonií byla testována pomocí agarózové gelové elektroforézy a pozitivní klony byly předběžně identifikovány na základě velikosti. U mutací typu A a B byly

při značení eGFP takto identifikované klony dále ověřovány restričním štěpením a byla hledána přítomnost inzertu o správné velikosti (obr. 14). U mutace typu E byla štěpením HindIII provedena linearizace nežádoucích produktů obsahujících sekvenci pro C23. Dodatečné ověřování pozitivně identifikovaných klonů pomocí vyštěpení inzertu tedy nebylo potřeba provádět. Z pozitivních klonů byla izolována plazmidová DNA ve vysoké čistotě kitem Promega. Takto izolovaná DNA byla transfekována do buněčných linií. Následně byla konfokálním mikroskopem kontrolována vnitrobuněčná lokalizace značených produktů. U pozitivně testovaných plazmidů byla úspěšnost klonování vždy ověřena sekvenací vneseného úseku DNA. Uvedeným postupem bylo připraveno 7 konstruktů - eGFP nebo mRFP1-fúzní plazmidy s vloženým NPM nesoucím typ mutace A, B, E a zeleně značený plazmid obsahující wtNPM (eGFP_wtNPM).

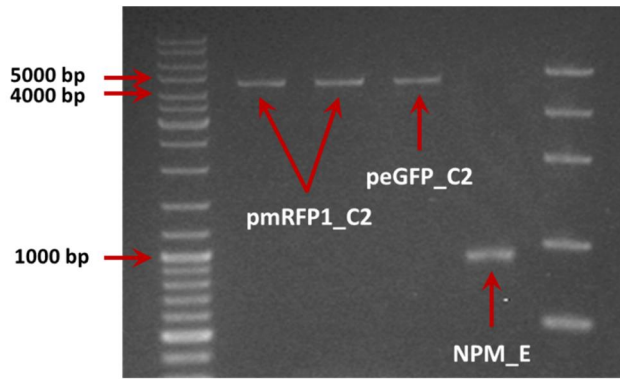
Schéma přípravy jednotlivých konstruktů a molekulárního klonování:

1. mRFP1_wtNPM (k dispozici) → wtNPM vyštěpen z mRFP1_wtNPM a zaklonován do peGFP_C2 → **peGFP_wtNPM**
2. mutNPM typu A a typu B zaklonován do peGFP_C2 → **peGFP_mutNPM typu A, peGFP_mutNPM typu B**
3. mutNPM typu A a typu B zaklonován do pmRFP1_C2 → **pmRFP1_mutNPM typu A, pmRFP1_mutNPM typu B**
4. mutNPM typu E zaklonován do peGFP_C2 → **peGFP_mutNPM typu E**
5. mutNPM typu E vyštěpen z peGFP_mutNPM typu E a zaklonován do pmRFP1_C2 → **pmRFP1_mutNPM typu E.**

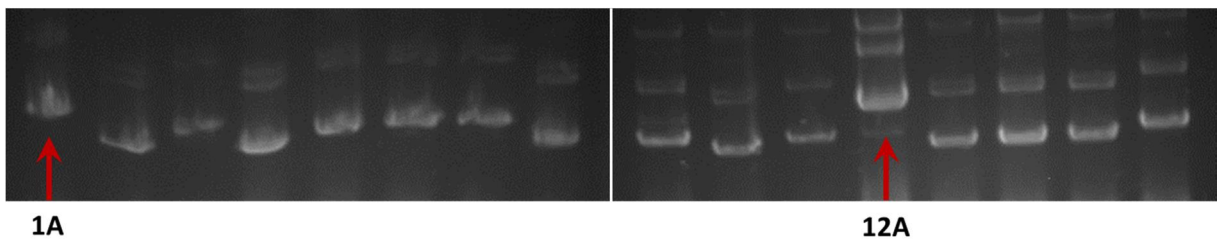
Pokud není uvedeno jinak, byl do vektoru klonován vždy PCR produkt.



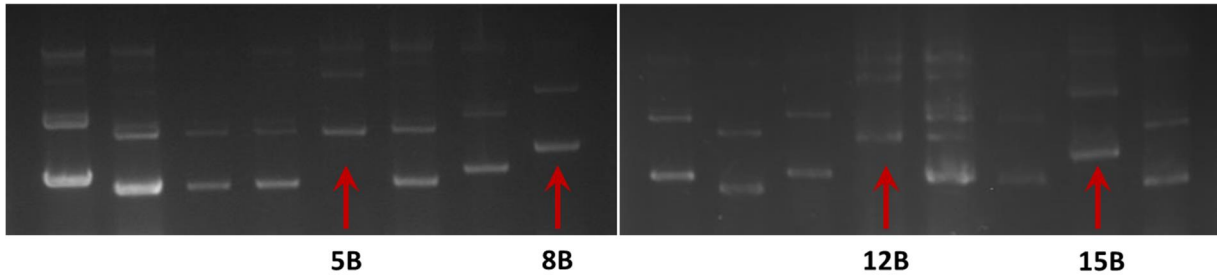
Obrázek č. 10. Restriční štěpení konstruktů mRFP1_wtNPM a eGFP_C23 enzymy BamHI a XhoI při přípravě vektoru a inzertu pro ligační reakci při klonování konstruktů eGFP_wtNPM



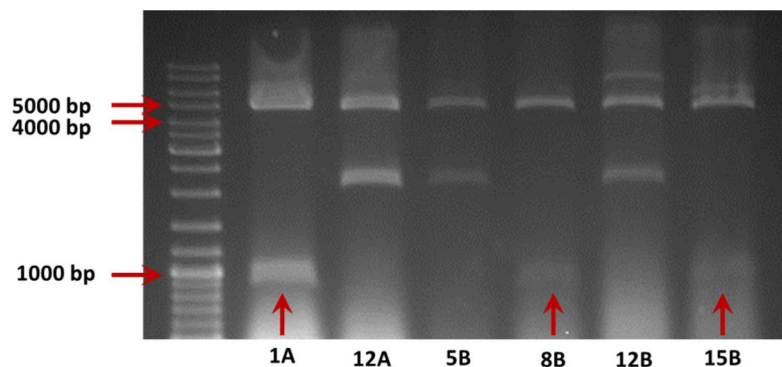
Obrázek č. 11. Kvantifikace inzertu *mutNPM* typu E a linearizovaných vektorů *mRFP1_C2* a *eGFP_C2* vpravo kvantifikační ladder Easy Ladder II (Bioline) - každý band odpovídá 50 ng DNA



Obrázek č. 12. Miniprep „Boling metoda“ při testování konstruktů *eGFP_mutNPM* typu A šípkami označeny klony vybrané pro další analýzu



Obrázek č. 13. Miniprep „Boling metoda“ při testování konstruktů *eGFP_mutNPM* typu B šípkami označeny klony vybrané pro další analýzu



Obrázek č. 14. Kontrolní restriční štěpení pozitivních klonů při klonování konstruktů *eGFP_mutNPM* typu A a B enzymy *BamHI* a *XhoI*

šipkami označeny klon vybrané pro izolaci DNA kitem Promega

Dále byly vybrané klon ověřovány sledováním lokalizace exprimovaného fúzního NPM v buňkách konfokálním mikroskopem, v tomto případě byly pozitivně otestovány klon 1A a 15B. Následná sekvenace potvrdila přítomnost předpokládané mutace v sekvenci NPM.

5.2 Expres mutovaných forem NPM a wtNPM

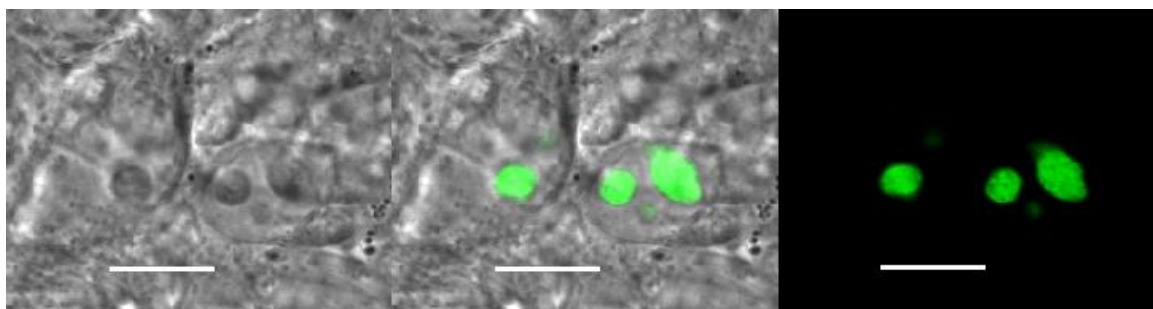
Pro studium exprese *mutNPM* bylo třeba zvolit vhodnou buněčnou linii. Na základě hladiny endogenního NPM, schopnosti exprese exogenního proteinu a dostupnosti expresního systému byly vybrány 3 buněčné linie - HEK293T, HeLa a NIH 3T3. Buněčná linie lidských embryonálních buněk ledvin, HEK293T, je běžně používaný savčí expresní systém vyznačující se vysokou rychlostí růstu a vysokými výtěžky rekombinovaných proteinů (BALDI *et al.* 2007, BANDARANAYAKE a ALMO 2014). Dalším použitým expresním systémem byla buněčná linie HeLa odvozená z lidských epitelových buněk. Lokus pro NPM je lokalizován v oblasti dlouhého raménka chromozomu 5, který se v karyotypu HeLa buněk vyskytuje ve více kopiích (MACVILLE *et al.* 1999). To je u této buněčné linie důvodem zhruba dvojnásobné exprese endogenního NPM než u linií s normálním počtem kopií lokusu pro NPM. Jako třetí buněčná linie byla vybrána NIH 3T3, která má svůj původ v myších fibroblastech a představuje vzhledem ke standardní expresi endogenního NPM a obvyklé amplifikaci plazmidové DNA kontrolní expresní systém.

Transfekce buněk rekombinantním plazmidem byla provedena prostřednictvím transfekčního činidla jetPrime. Vnitrobuněčná lokalizace wtNPM a jednotlivých vnesených mutantů NPM (A, B a E) byla v uvedených buněčných liniích sledována pomocí konfokálního mikroskopu. Z výsledků transfekce linie HEK293T (obr. 16) vyplývá, že lokalizace NPM s mutací typu A nebo B je převážně cytoplazmatická a u obou těchto typů téměř identická.

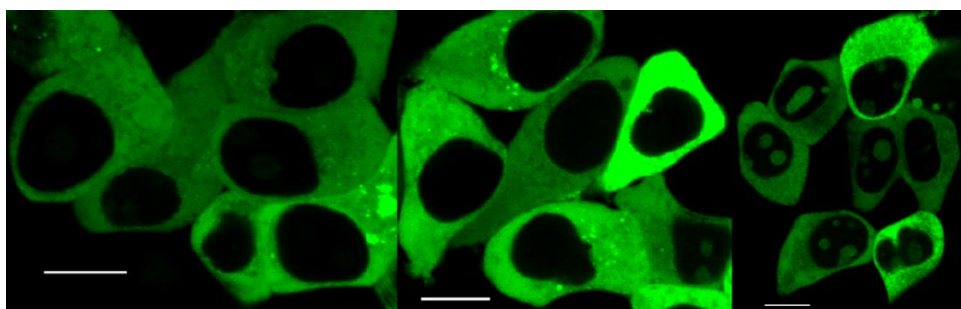
Naopak NPM s mutací typu E zůstává ve vysoké míře lokalizovaný i v jadérku (obr. 16), což je pravděpodobně spjata se zachovaným W288 v C-terminální doméně. Kromě typu mutace však lokalizaci exogenního NPM výrazně ovlivňuje také použitá buněčná linie (obr. 16, 18, 20).

HEK293T

Jak již bylo zmíněno, tato buněčná linie je vhodná pro expresi rekombinantního proteinu. Obsahuje T antigen specifický pro SV40 (SV40 Large T-antigen), který umožňuje vysokou amplifikaci vneseného plazmidu obsahujícího SV40 replikační počátek (BALDI *et al.* 2007). Důsledkem toho je u typu mutace A a B vysoký podíl buněk s mutNPM lokalizovaným pouze v cytoplazmě (obr. 16 a 31). V případě mutace E se jedná o menší frakci buněk s výhradně cytoplazmaticky lokalizovaným mutNPM (obr. 16 a 31).



Obrázek č. 15. *Transfekce buněčné linie HEK293T eGFP-značeným konstruktem nesoucím wtNPM*
 vlevo: buňky v procházejícím světle zobrazené pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC; differential interference contrast); vpravo: fluorescence eGFP
 Měřítko představuje 10 μ m

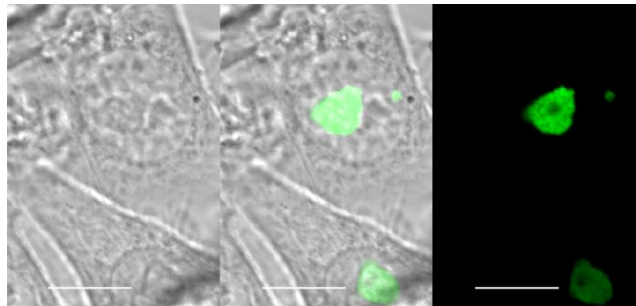


Obrázek č. 16. *Transfekce buněčné linie HEK293T eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A (vlevo), B (uprostřed) a E (vpravo)*
 Měřítko představuje 10 μ m

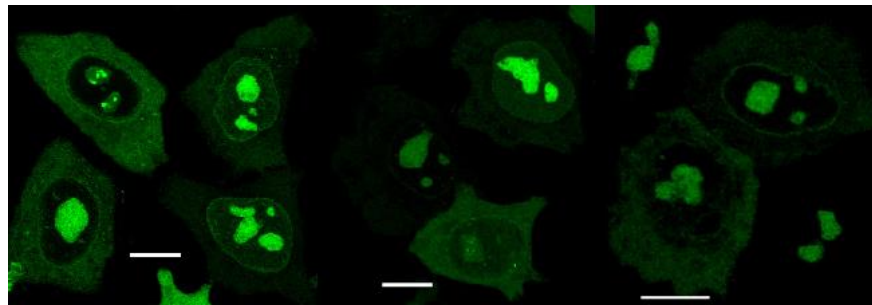
HeLa

V buněčné linii HeLa je podíl buněk s výhradně cytoplazmaticky lokalizovaným mutNPM velmi nízký, a to pravděpodobně z důvodu vysoké koncentrace endogenního NPM.

Na následujících obrázcích lze vidět, že je část mutovaného proteinu lokalizována také v jadérku (obr. 18).



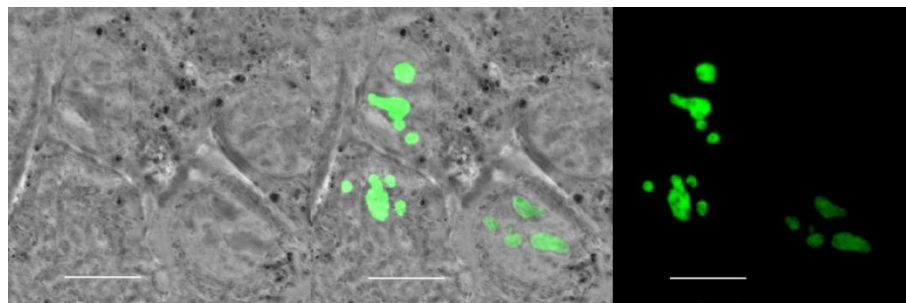
Obrázek č. 17. *Transfekce buněčné linie HeLa eGFP-značeným konstruktem nesoucím wtNPM*
vlevo: buňky v procházejícím světle zobrazené pomocí DIC; vpravo: fluorescence eGFP
Měřítka představuje 10 μ m



Obrázek č. 18. *Transfekce buněčné linie HeLa eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A (vlevo), B (uprostřed) a E (vpravo)*
Měřítka představuje 10 μ m

NIH 3T3

U tohoto expresního systému bylo procento buněk s mutNPM lokalizovaným i v jadérku podobné jako v HeLa buňkách, intenzita signálu mutGFP v cytoplazmě však byla ve srovnání s intenzitou signálu z jadérka vyšší než v buňkách linie HeLa (obr. 19 a 20).



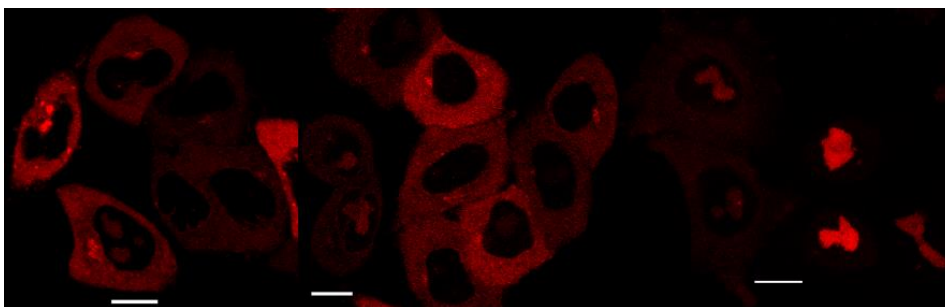
Obrázek č. 19. *Transfekce buněčné linie NIH 3T3 eGFP-značeným konstruktem nesoucím wtNPM*
vlevo: buňky v procházejícím světle zobrazené pomocí DIC; vpravo: fluorescence eGFP
Měřítka představuje 10 μ m



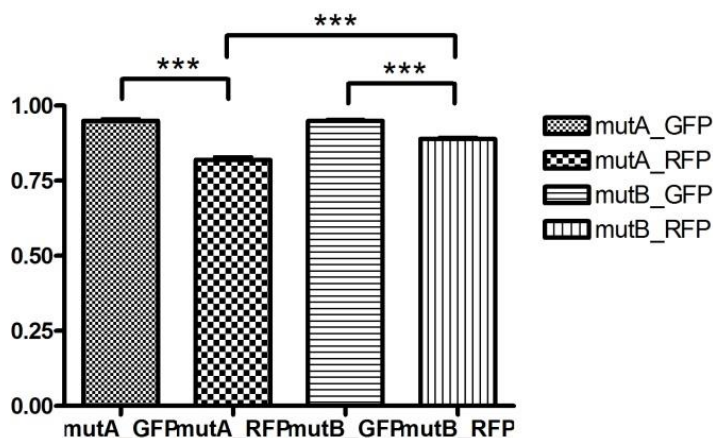
Obrázek č. 20. *Transfekce buněčné linie NIH 3T3 eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A (vlevo), B (uprostřed) a E (vpravo)*
Měřítka představuje 10 μ m

Značení mRFP1

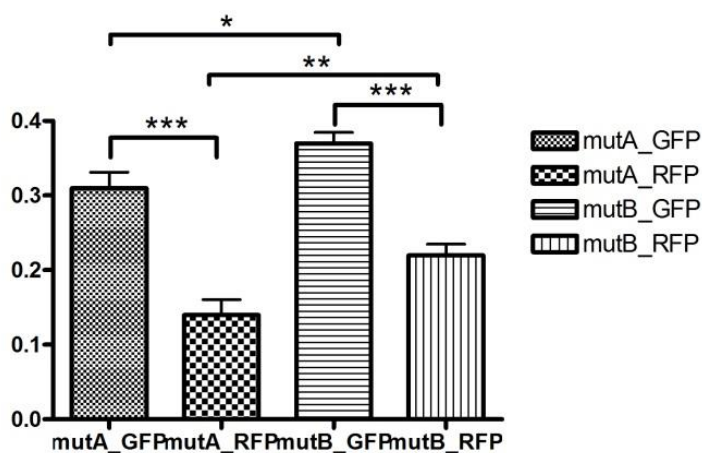
Všechny konstrukty s mutNPM byly připraveny v zelené (eGFP) i červené (mRFP1) variantě. Porovnání značení jednotlivými barevnými variantami přineslo vždy pro konkrétní mutaci a buněčný typ velmi podobné výsledky. Obr. 21 ukazuje příklad transfekce HeLa buněk červenou variantou jednotlivých mutantních typů. Pro studium lokalizace kotransfekovaných proteinů (viz následující kapitola) bylo třeba zvolit barevnou variantu plazmidu s mutNPM. Za tímto účelem bylo u linie HeLa provedeno měření kolokalizace (vzájemná shoda buněčné lokalizace) mutNPM typu A nebo B s opačně značeným wild typem v jadérku v obou možných barevných variantách (obr. 22 a 23). Vztah mezi jednotlivými intenzitami v porovnávaných kanálech charakterizují dva koeficienty – Overlap (překryvový) a Pearsonův. Overlap koeficient porovnává přítomnost obou signálů v každém bodě. Pearsonův koeficient též porovnává přítomnost obou signálů v jednotlivých bodech, ale na rozdíl od Overlap koeficientu ještě rozlišuje, zda tyto signály mají srovnatelnou intenzitu. Z grafů (obr. 22 a 23) vyplývá, že mutant značený mRFP1 kolokalizuje v jadérku s wtNPM hůře než mutant značený eGFP. Na základě měření a statistického vyhodnocení kolokalizace bylo rozhodnuto, že pro transfekce mutNPM budou vnášené plazmidy s mutanty značeny eGFP.



Obrázek č. 21. Transfekce buněčné linie HeLa mRFP1-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A (vlevo), B (uprostřed) a E (vpravo)
Měřítko představuje 10 μ m



Obrázek č. 22. Statistika kolokalizace mutantů s opačně značeným wtNPM, Overlap
*** $p < 0,001$; na ose y Overlap koeficient nabývající hodnot 0 až 1 \rightarrow čím blíže je 1, tím vyšší je kolokalizace



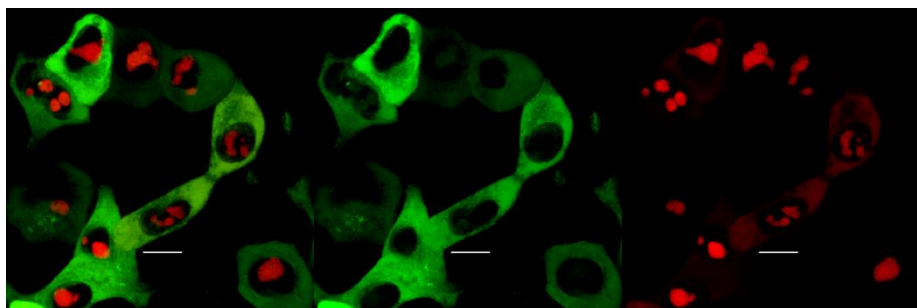
Obrázek č. 23. Statistika kolokalizace mutantů s opačně značeným wtNPM, Pearson
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; na ose y Pearsonův koeficient nabývající hodnot -1 až 1 \rightarrow čím blíže je 1, tím mají signály srovnatelnou intenzitu

Pro mutNPM typu A bylo analyzováno okolo 150 buněk, pro mutNPM typu B asi 250 buněk.

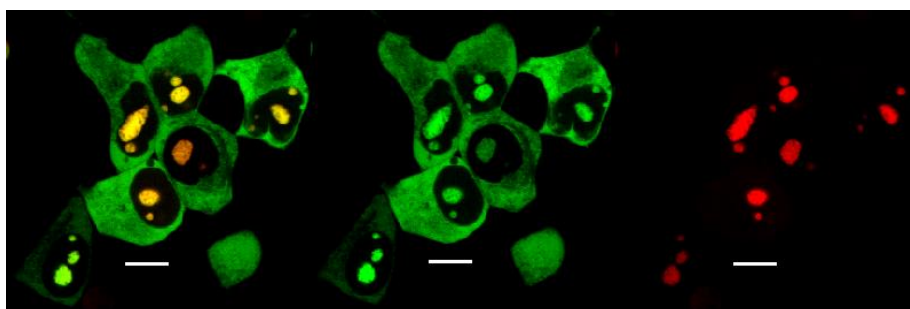
5.3 Sledování lokalizace kotransfekovaných proteinů

V případě, že byly buňky kotransfekovány konstrukty s wtNPM a mutNPM, bylo pozorováno, že frakce buněk s expresí mutNPM v jadérku vzrostla. Lokalizace rekombinantních proteinů wtNPM a mutNPM typu A a E kotransfekovaných v poměru 1:1 byla pozorována u tří buněčných linií - HEK293T, HeLa a NIH 3T3. V porovnání s transfekcí těchto linií pouze konstruktem nesoucím mutNPM (viz předchozí kapitola, obr. 16, 18, 20) je podíl mutNPM lokalizovaného v jadérku mnohem vyšší (obr. 24–29). Mimo to můžeme u některých kotransfekovaných buněk pozorovat signál wtNPM i z cytoplazmy (obr. 24).

HEK293T

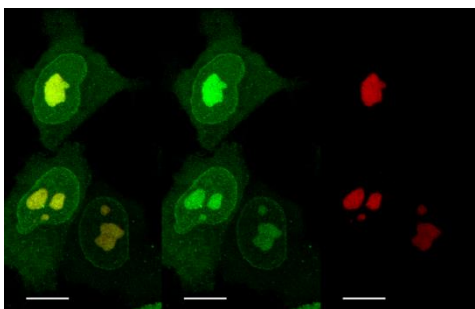


Obrázek č. 24. *Transfekce buněčné linie HEK293T eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A (zelená) a mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM (červená) v poměru 1:1* panely zleva doprava ukazují signály eGFP+mRFP1, eGFP, mRFP1
Měřítko představuje 10 μ m

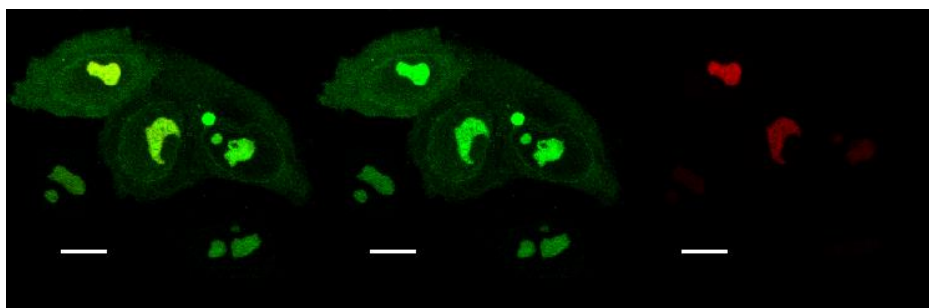


Obrázek č. 25. *Transfekce buněčné linie HEK293T eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace E (zelená) a mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM (červená) v poměru 1:1* panely zleva doprava ukazují signály eGFP+mRFP1, eGFP, mRFP1
Měřítko představuje 10 μ m

HeLa

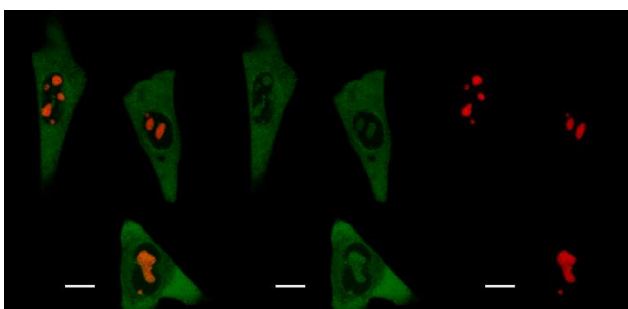


Obrázek č. 26. *Transfekce buněčné linie HeLa eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A (zelená) a mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM (červená) v poměru 1:1*
panely zleva doprava ukazují signály eGFP+mRFP1, eGFP, mRFP1
Měřítko představuje 10 μ m

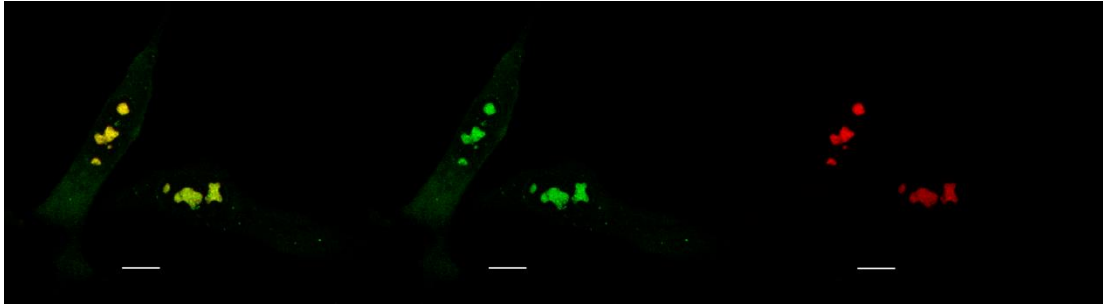


Obrázek č. 27. *Transfekce buněčné linie HeLa eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace E (zelená) a mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM (červená) v poměru 1:1*
panely zleva doprava ukazují signály eGFP+mRFP1, eGFP, mRFP1
Měřítko představuje 10 μ m

NIH 3T3



Obrázek č. 28. *Transfekce buněčné linie NIH 3T3 eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A (zelená) a mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM (červená) v poměru 1:1*
panely zleva doprava ukazují signály eGFP+mRFP1, eGFP, mRFP1
Měřítko představuje 10 μ m



Obrázek č. 29. *Transfekce buněčné linie NIH 3T3 eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace E (zelená) a mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM (červená) v poměru 1:1*
 panely zleva doprava ukazují signály eGFP+mRFP1, eGFP, mRFP1
 Měřítko představuje 10 μm

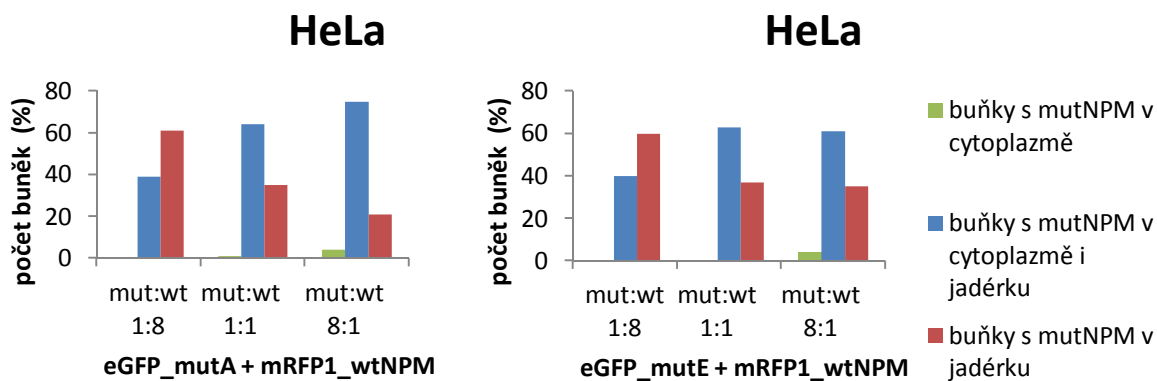
Lokalizace rekombinantních plazmidů u NIH 3T3 byla obdobná s lokalizací těchto konstruktů v HeLa buněčné linii, účinnost transfekce do NIH 3T3 byla ale nižší (viz kapitola Účinnost transfekce). Proto tyto buňky nebyly pro následující statistické vyhodnocování použity.

Abychom objasnili, jaký účinek má množství vnášených konstruktů na vnitrobuněčnou lokalizaci rekombinantních proteinů, transfekovali jsme buněčné linie HEK293T a HeLa plazmidy s wtNPM a mutNPM typu A a E v poměrech 1:8, 1:1 a 8:1. Následně byly pro jednotlivé poměry počítány buňky s mutantem lokalizovaným pouze v cytoplasmě, v cytoplasmě a zároveň v jadérku a jen v jadérku (tab. 8, obr. 30 a 31). Zjišťován byl také počet buněk s wild typem detekovaným i v cytoplasmě (tab. 8, obr. 32). Podíl buněk HEK293T s wtNPM lokalizovaným i v cytoplasmě je zřetelně vyšší než u linie HeLa, což je pravděpodobně důsledek vyšší exprese endogenního wtNPM v HeLa expresním systému (obr. 24, 26, 27)

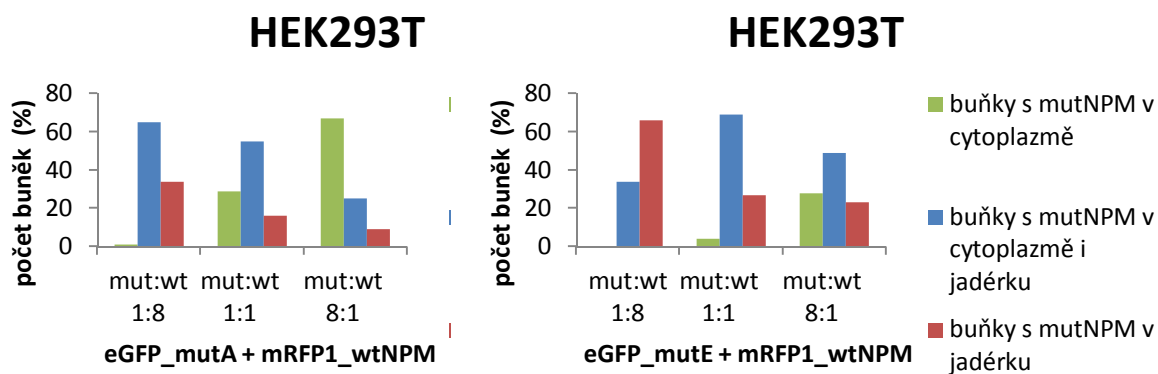
Tabulka č. 8. *Statistické vyhodnocení vnitrobuněčné lokalizace exogenních mutNPM a wtNPM kotransfekovaných v poměrech 1:8, 1:1 a 8:1*

Vždy se jednalo o kotransfekci v konkrétním poměru eGFP_mutNPM:mRFP1_wtNPM. Počet buněk exprimujících eGFP_mutNPM je v každém buněčném kompartmentu (cytoplazma, cytoplazma a jádérko zároveň, jádérko) vyjádřen procentuálně. Frakce buněk exprimujících mRFP1_wtNPM kromě jádérka také v cytoplasmě je též vyjádřena procentuálně. Pro tuto statistiku bylo analyzováno 260 – 400 buněk.

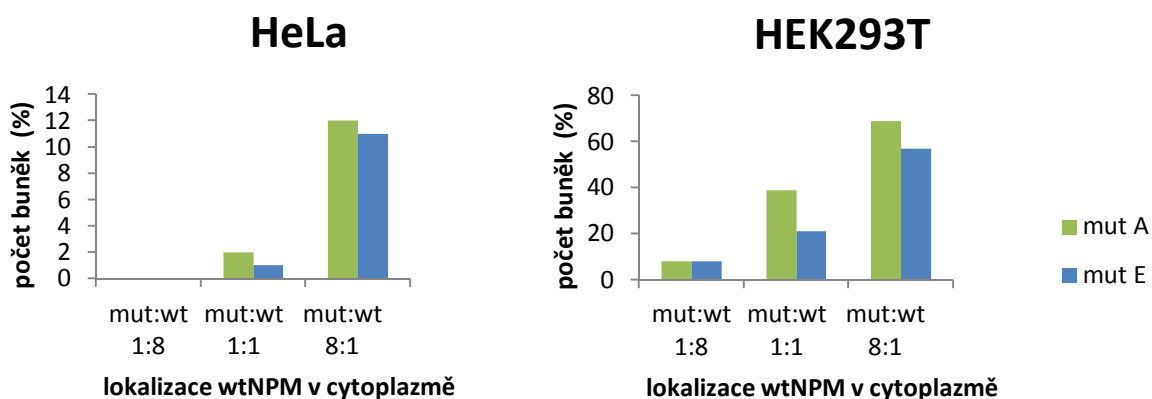
BUNĚČNÁ LINIE	KOMBINACE	POMĚR	MUT CYTOPLAZMA (%)	MUT CYTOPLAZMA A JADÉRKO (%)	MUT JADÉRKO (%)	WT CYTOPLAZMA (%)
HeLa	<i>eGFP_mutA + mRFP1_wtNPM</i>	1:8	0	39	61	0
	<i>eGFP_mutA + mRFP1_wtNPM</i>	1:1	1	64	35	2
	<i>eGFP_mutA + mRFP1_wtNPM</i>	8:1	4	75	21	12
	<i>eGFP_mutE + mRFP1_wtNPM</i>	1:8	0	40	60	0
	<i>eGFP_mutE + mRFP1_wtNPM</i>	1:1	0	63	37	1
	<i>eGFP_mutE + mRFP1_wtNPM</i>	8:1	4	61	35	11
HEK293T	<i>eGFP_mutA + mRFP1_wtNPM</i>	1:8	1	65	34	8
	<i>eGFP_mutA + mRFP1_wtNPM</i>	1:1	29	55	16	39
	<i>eGFP_mutA + mRFP1_wtNPM</i>	8:1	67	25	9	69
	<i>eGFP_mutE + mRFP1_wtNPM</i>	1:8	0	34	66	8
	<i>eGFP_mutE + mRFP1_wtNPM</i>	1:1	4	69	27	21
	<i>eGFP_mutE + mRFP1_wtNPM</i>	8:1	28	49	23	57



Obrázek č. 30. Různá vnitrobuněčná lokalizace mutNPM v závislosti na poměru vnášených konstruktů eGFP_mutNPM a mRFP1_wtNPM u buněčné linie HeLa



Obrázek č. 31. Různá vnitrobuněčná lokalizace mutNPM v závislosti na poměru vnášených konstruktů eGFP_mutNPM a mRFP1_wtNPM u buněčné linie HEK293T

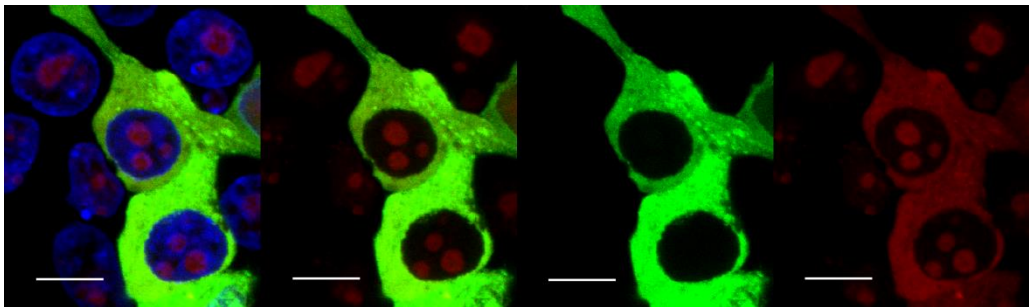


Obrázek č. 32. Cytoplazmatická lokalizace mRFP1_wtNPM v závislosti na poměru vnášených konstruktů eGFP_mutNPM a mRFP1_wtNPM u buněčné linie HEK293T a HeLa

5.4 Nepřímá imunodetekce

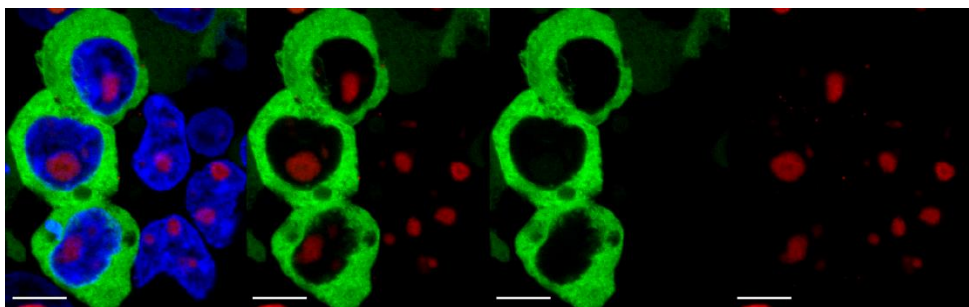
Nepřímá imunodetekce je dvoustupňová metoda založená na použití specifických protilátek. Pro imunoznačení byly použity buněčné linie HeLa a HEK293T transfekované konstruktem se zeleně značeným mutNPM typu A. Narostlé buňky byly fixovány 4% formaldehydem a permeabilizovány 0,5% Tritonem X-100. Poté byly inkubovány v příslušné neznačené myší primární protilátce – anti-GFP (B-2), anti-NPM (klon 3F291) či anti-NPM (klon 7H10B9) a následně v kozí anti-myší sekundární protilátce Alexa Fluor 647. Jádra byla obarvena barvivem Hoechst 33342. Tento postup byl použit pro ověření specifity jednotlivých protilátek pro jejich následné použití pro western blot analýzu.

HEK293T NPM (3F291)



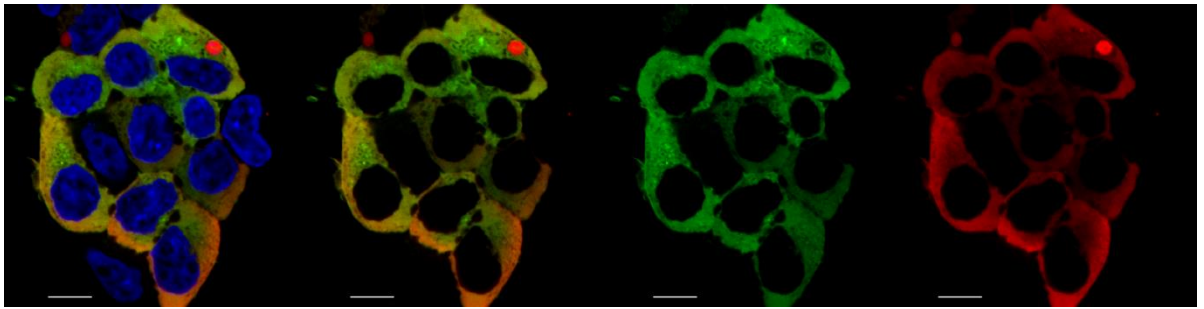
Obrázek č. 33. *Nepřímá imunodetekce NPM v HEK293T buněčné linii*
červeně značený wtNPM i mutNPM (primární protilátka klon 3F291); modře značená jádra (Hoechst 33342); zelený mutNPM (transfekovaný konstrukt)
Měřítko představuje 10 μ m

HEK293T NPM (7H10B9)



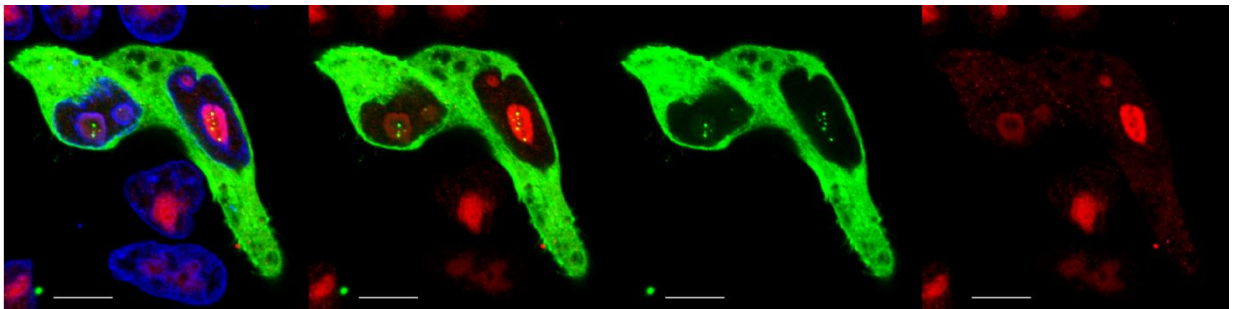
Obrázek č. 34. *Nepřímá imunodetekce NPM v HEK293T buněčné linii*
červeně značený wtNPM (primární protilátka 7H10B9); modře značená jádra (Hoechst 33342); zeleně značený mutNPM (transfekovaný konstrukt)
Měřítko představuje 10 μ m

HEK293T GFP (B-2)



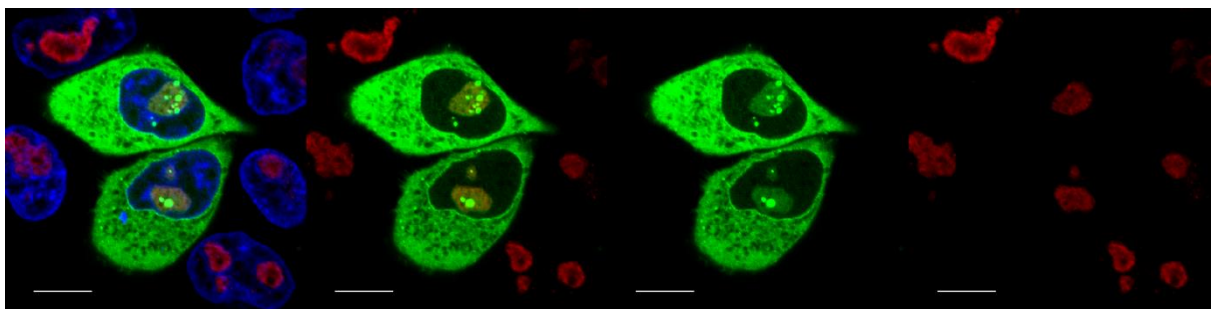
Obrázek č. 35. *Nepřímá imunodetekce GFP v HEK buněčné linii*
červeně značený eGFP_mutNPM (primární protilátka proti GFP); modře značená jádra (Hoechst 33342); zeleně značený mutNPM (transfekovaný konstrukt)
Měřítko představuje 10 μ m

HELA (3F291)



Obrázek č. 36. *Nepřímá imunodetekce NPM v HeLa buněčné linii*
červeně značený wtNPM i mutNPM (primární protilátka 3F291); modře značená jádra (Hoechst 33342); zeleně značený mutNPM (trasfekovaný konstrukt)
Měřítko představuje 10 μ m

HELA (7H10B9)

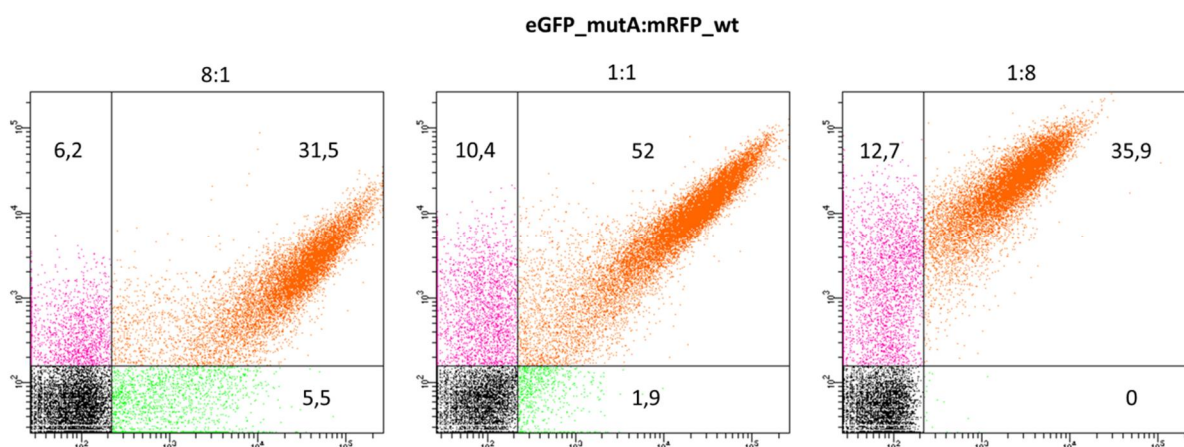


Obrázek č. 37. *Nepřímá imunodetekce NPM v HeLa buněčné linii*
červeně značený wtNPM (primární protilátka 7H10B9); modře značená jádra (Hoechst 33342); zeleně značený mutNPM (trasfekovaný konstrukt)
Měřítko představuje 10 μ m

5.5 Účinnost transfekce a hladina exprese vnášeného plazmidu

Účinnost transfekce a schopnost exprese exogenního proteinu je pro každou buněčnou linii individuální. Pro kvantitativní vyhodnocení celkové exprese genu pro NPM byla provedena western blot analýza, přičemž exprese NPM byla vztažena k expresi referenčního genu pro β -aktin. Pro western blot byly připraveny buněčné lyzáty, jež byly následně separovány pomocí SDS-PAGE. Poté byly proteiny z gelu přeneseny na PVDF membránu a inkubovány v příslušné primární protilátce. Následovala inkubace v sekundární kozí protilátce konjugované s peroxidázou a vystavení membrány roztoku luminolu a peroxidu. Imunodetekce proteinů na PVDF membráně byla umožněna přístrojem G:box Chemi XT4. Počet pozitivně transfekovaných buněk v populaci a míra intenzity fluorescence byla určena FACS, přičemž vzorky pro tuto analýzu byly odebrány během přípravy buněčných lyzátů pro SDS-PAGE.

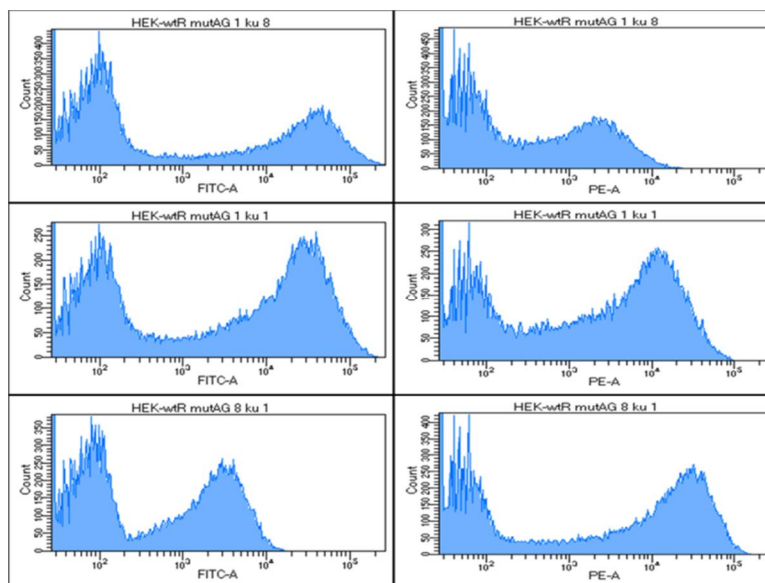
5.5.1 FACS



Obrázek č. 38. FACS Dot plot pro HEK buněčnou linii transfekovanou konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A a mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM v poměru 8:1, 1:1 a 1:8

osa y = míra intenzity fluorescence mRFP1; osa x = míra intenzity fluorescence eGFP; Q1 (růžová) = populace buněk transfekovaných mRFP1_wtNPM; Q2 (oranžová) = populace buněk kotransfekovaných mRFP1_wtNPM a eGFP_mutNPM typu A; Q3 (černá) = populace netransfekovaných buněk; Q4 (zelená) = populace buněk transfekovaných eGFP_mutNPM typu A

Čísla v jednotlivých kvadrantech udávají procentuální zastoupení jednotlivých populací v celkovém počtu buněk. Pro každý vzorek bylo analyzováno 50 000 buněk.

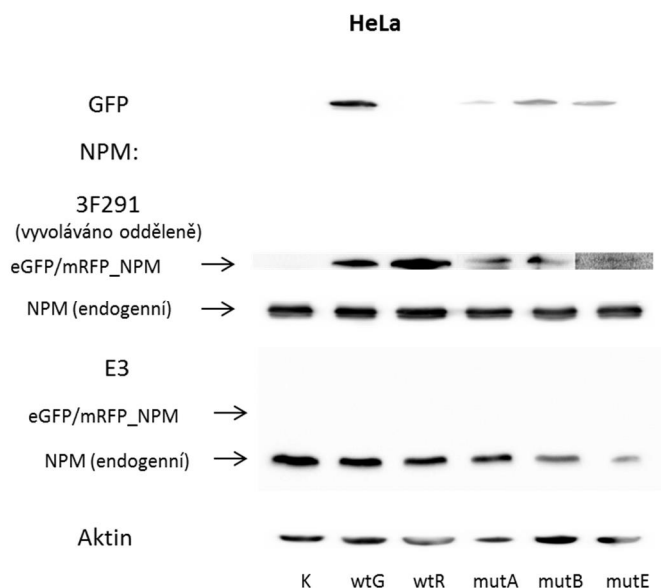


Obrázek č. 39. FACS histogramy pro buněčnou linii HEK293T transfekovanou mRFP1-značeným konstruktem nesoucím wtNPM a eGFP-značeným konstruktem nesoucím mutNPM s typem mutace A v poměru 1:8, 1:1 a 8:1. Na histogramech lze vidět posun populace buněk v intenzitách eGFP (kanál FITC) a mRFP1 (kanál PE) v závislosti na koncentraci značených plazmidů.

5.5.2 Western blot analýza

5.5.2.1 HeLa

Výsledky imunoblotu (obr. 40) potvrzují vysokou hladinu endogenního NPM a nižší expresi vnášeného konstruktů. Intenzita bandů naznačuje, že transfekované buňky exprimují ve vyšší míře eGFP-značený konstrukt s wtNPM než s mutNPM.



Obrázek č. 40. Hladina endogenního a exogenního NPM v buněčné linii HeLa

K = kontrola (netransfekované buňky); dále buňky transfekované jednotlivými konstrukty → wtG = eGFP_wtNPM; wtR = mRFP1_wtNPM; mutA = eGFP_mutNPM typu A; mutB = eGFP_mutNPM typu B; mutE = eGFP_mutNPM typu E; Aktin = referenční gen; GFP = primární protilátka proti eGFP; E3 = primární protilátka proti wtNPM; 3F291 = primární protilátka proti endogennímu i exogennímu NPM; pro detekci proteinů byla použita peroxidázou značená sekundární koží protilátka (ThermoFischer)

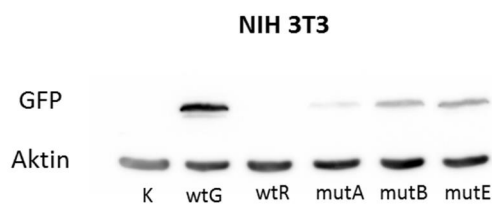
Tabulka č. 9. Účinnost transfekce v buněčné linii HeLa a intenzita fluorescence – zprůměrované hodnoty ze dvou měření

Účinnost transfekce se pohybovala okolo 17 ± 4 %. Po obarvení jader barvivem Hoechst 33342 činil počet mrtvých buněk zhruba 2%.

% buněk	neobarvené	eGFP	mRFP1	střední intenzita fluorescence obarvené populace
kontrola	99,6	0	0,1	75
eGFP_wtNPM	79,5	20,5	0,1	17555
mRFP1_wtNPM	86	0,9	13,1	23846
eGFP_mut A	81,1	18,8	0	15799
eGFP_mut B	80,2	19,7	0,1	12171
eGFP_mut E	81,8	18,1	0,1	8010

5.5.2.2 NIH 3T3

U buněk NIH 3T3 byla účinnost transfekce velmi nízká (okolo 10%). Měřitelná exprese byla pouze u primární protilátky B-2(GFP) proti wtNPM i mutNPM značenému eGFP (obr. 41). I zde je hladina exprese eGFP_wtNPM v transfekovaných buňkách vyšší než v případě buněk transfekovaných eGFP_mutNPM.



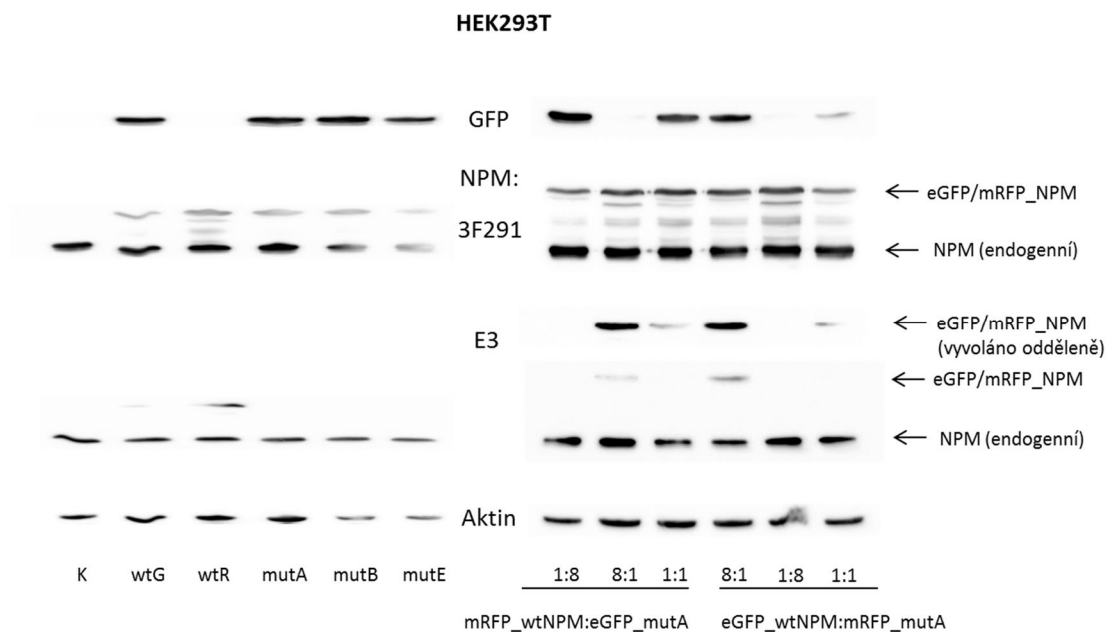
Obrázek č. 41. Hladina exogenního NPM značeného eGFP v buněčné linii NIH 3T3
Zkratky vysvětleny již u obrázku č. 40.

5.5.2.3 HEK293T

Ačkoli je tato buněčná linie uzpůsobená pro amplifikaci vnesených plazmidů (viz kapitola Expres mutovaných forem NPM a wtNPM), je intenzita bandů exogenních proteinů výrazně nižší než intenzita bandů endogenního NPM (obr. 42). Jelikož byl buněčný lyzát vytvořen ze všech buněk, včetně netransfekovaných, je informace na blotu týkající se exprese exogenních proteinů tímto jevem zkreslená. Ve skutečnosti tedy mají transfekované buňky větší podíl exprese vneseného proteinu, než naznačují výsledky imunoblotu.

U imunoblotu na obr. 42 je na rozdíl od předchozích dvou detekovatelná exprese exogenního wtNPM protilátkou E3. To nasvědčuje zvýšené expresi vnášeného NPM. Vzhledem ke specifitě protilátky byl získán signál pouze u buněk transfekovaných wtNPM u kotransfekovaných buněk v poměrech takových, v nichž je wtNPM zastoupen 8x více než mutant. Při použití dvakrát vyšší koncentrace primární protilátky (na obrázku s poznámkou „vyvoláno odděleně“) byl získán slabý signál i ze vzorků, v nichž byly wtNPM a mutNPM natransfekovány v poměru 1:1.

Pod signálem poskytnutým protilátkou 3F291 u buněk transfekovaných mRFP1- značeným konstruktem nesoucím wtNPM či mutNPM si lze všimnout nespecifit v podobě žebříčku (obr. 42). Pravděpodobně se jedná o částečně degradovaný fúzní protein mRFP1_NPM.



Obrázek č. 42. Hladina endogenního a exogenního NPM v buněčné linii HEK293T

Zkratky vysvětleny již u obrázku č. 40. V pravé části obrázku výsledky exprese NPM v buňkách kotransfekovaných eGFP-značeným konstrukt nesoucím mutNPM s typem mutace A a mRFP1-značeným konstrukt nesoucím wtNPM v různých poměrech.

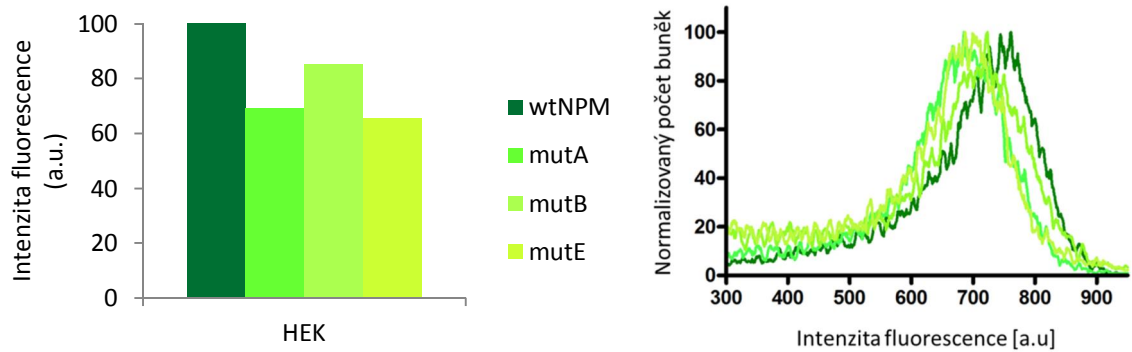
Tabulka č. 10. Účinnost transfekce v buněčné linii HEK 293T a intenzita fluorescence – zprůměrované hodnoty ze dvou měření

Účinnost transfekce se pohybovala okolo 40 %, účinnost kotransfekce okolo 55 %.

% buněk	neobarvené	eGFP	mRFP1	eGFP + mRFP1	střední intenzita fluorescence obarvené populace
kontrola	99,7	0,1	0,1	-	70
eGFP_wtNPM	54,3	45,5	0,2	-	37875
mRFP1_wtNPM	58,8	0,1	40,6	-	22888
eGFP_mut A	66,1	23,5	0,1	-	29635
eGFP_mut B	53,4	45,8	0,1	-	30457
eGFP_mut E	61,2	38,7	0,1	-	23242
eGFP_wtNPM:mRFP1_mutA 8:1	42,2	5,1	4,1	48,5	-
eGFP_wtNPM:mRFP1_mutA 1:1	50,3	0,6	12,9	36,3	-
eGFP_wtNPM:mRFP1_mutA 1:8	33,7	0	21,8	44,4	-
mRFP1_wtNPM:eGFP_mutA 8:1	50,5	0,1	13,2	36,3	-
mRFP1_wtNPM:eGFP_mutA 1:1	35,1	1,9	10,5	52,5	-
mRFP1_wtNPM:eGFP_mutA 1:8	56,2	5,4	6,4	32	-

5.5.3 Intenzita fluorescence eGFP

Měření intenzity fluorescence eGFP u buněk HEK293T transfekovaných eGFP-značenými konstrukty (obr. 43) koreluje s výsledky z imunoblotů - transfekované buňky exprimují ve vyšší míře eGFP-značený konstrukt s wtNPM ve srovnání s mutNPM.



Obrázek č. 43. Míra intenzity fluorescence u buněk HEK293T transfekovaných eGFP-značenými konstrukty s wtNPM a mutNPM

6 DISKUZE

Dosavadní výzkum zaměřený na určení vnitrobuněčné lokalizace mutovaného NPM ve vztahu k jeho mutaci přinesl nejednoznačné výsledky. Zatímco někteří autoři popsali stoprocentní korelaci mezi cytoplazmatickou lokalizací NPM a přítomností mutace v jeho exonu 12 (FALINI *et al.* 2005, FALINI *et al.* 2006b), výsledky Konopleva *et al.* tuto skutečnost zpochybňují (KONOPLEV *et al.* 2009). Nejčastěji se vyskytující, a proto také nejprostudovanější formou mutace NPM je majoritní mutace typu A charakterizovaná ztrátou NoLS a vytvořením NES. Má se za to, že právě změny signálních sekvencí v mutovaném proteinu jsou příčinou aberantní lokalizace mutovaného NPM, tj. jeho přesunu z jádérka do cytoplazmy. U některých minoritních mutací se cytoplazmatická přítomnost NPM předpokládá, ale experimentálně ověřena nebyla. Cílem diplomové práce bylo popsat vnitrobuněčný výskyt NPM v závislosti na přítomnosti mutací v C-terminální doméně charakteristických pro pacienty s AML.

Distribuce NPM v buňce byla studována pomocí plazmidů, v nichž byly jednotlivé geny pro různé formy lidského NPM fúzovány s geny pro fluorescenční protein (eGFP nebo mRFP1). Vedle wild-type formy NPM byly testovány mutace typu A, B a E. Červeně značený konstrukt nesoucí wtNPM byl dostupný, geny pro mutované varianty NPM jsme museli v laboratoři připravit pomocí PCR. Jelikož se mutace nacházejí ve vzdálenosti 30 párů bází, v případě mutace E 20 párů bází, od 3'konce NPM, bylo možné pro jejich vytvoření použít dlouhé reverse primery (o průměrné délce 75 nt) namísto nákladnější a náročnější metody (např. mutageneze pomocí mutagenních oligonukleotidů).

Zkonstruované plazmidy byly nejprve transfekovány do buněk široce používané linie HeLa s účinností transfekce okolo 20%. Zatímco wild-type forma byla dle předpokladu detekována konfokálním mikroskopem výhradně v jádérku, všechny mutované formy se vyskytovaly jak v cytoplazmě, tak v jádérku. V případě mutace typu A a B se u většiny buněk mutovaný protein nacházel v cytoplazmě a jádérku zároveň, přičemž jeho frakce v těchto kompartmentech byla u obou mutantů téměř identická. Mutant typu E byl též pozorován v cytoplazmě a jádérku současně, ale u některých buněk byl ve vysoké koncentraci detekován pouze v jádérku. V literatuře je popisována lokalizace mutované formy typu A

téměř výhradně v cytoplazmě, ostatní typy mutací dosud experimentálně charakterizovány nebyly. Předpokládá se ale, že mutace typu B působí stejnou relokací mutované formy proteinu jako mutace typu A. U proteinu s mutací typu E se předpokládá jak cytoplazmatická, tak jadérová lokalizace, přičemž cytoplazmatická přítomnost je odůvodňována vyšší exportní aktivitou nového NES signálu, který by měl vykompenzovat zachovaný W288 (BOLLI *et al.* 2007). Pro ověření našich výsledků jsme zvolili další dvě buněčné linie – HEK293T a NIH3T3 – do nichž jsme vnášeli eGFP-značený plazmid nesoucí mutNPM. Expresní systém HEK293T je charakteristický vysokou expresí rekombinantního proteinu, naopak NIH3T3 vykazuje standardní expresi plazmidové DNA a endogenního NPM. Výsledky analýzy exprese NPM v těchto alternativních liniích, zejména v linii HEK293T, ukázaly výraznější expresi mutNPM typů A a B v cytoplazmě než u linie HeLa. Zároveň potvrdily vyšší frakci buněk s mutNPM lokalizovaným v jadérku u mutace typu E. Výskyt tohoto mutantu zcela v cytoplazmě byl pozorován zřídka. Z našeho pozorování exprese mutantu typu E v různých buněčných liniích tedy vyplývá, že vyvážení přítomnosti W288 silným NES je jen částečné, neboť všechny linie exprimovaly mutovaný protein typu E v jadérku ve vyšší míře než mutant typu A.

Pro vysvětlení rozdílné lokalizace konkrétních mutantů v různých buněčných liniích nám bylo inspirací pozorování jiných autorů (BOLLI *et al.* 2009), kteří popsali, že fluorescenčně značené formy wild-type a mutovaného proteinu spolu interagují a v důsledku tvorby heterooligomerů přemísťují určitou frakci svého interakčního partnera do místa své lokalizace. Detekce proteinů pomocí imunoblotu ukázala, že z celkové exprese NPM v lyzátech transfekovaných HeLa buněk je více než 90 % proteinu endogenního původu. Toto zjištění nás přivedlo k domněnce, že heterooligomery NPM se tvoří také mezi endogenním a exogenním proteinem. Lze proto předpokládat, že množství endogenního wtNPM do značné míry ovlivňuje vnitrobuněčnou lokalizaci exogenního mutNPM. Z výsledků karyotypizace HeLa buněk publikovaných v MACVILLE *et al.* 1999 jsme zjistili, že chromozomální lokus příslušející genu pro NPM se v této buněčné linii vykytuje ve zvýšeném počtu kopií. Toto zjištění podporuje domněnku, že vysoká exprese endogenní formy proteinu určuje lokalizaci heterooligomerů endogenní a exogenní formy a že značený mutovaný protein je tedy detekován v jadérku díky interakci s molekulami endogenní wild-type formy.

Amplifikovaný lokus pro *NPM* vyskytující se u expresního systému HeLa se u nově testovaných linií neobjevuje. Relativní hladina endogenního *NPM* je tudíž v buněčných liniích HEK293T a NIH 3T3 nižší, což snižuje pravděpodobnost tvorby heterooligomerů s převahou molekul endogenní formy a tím také přesunu mutNPM z cytoplazmy do jadérka. Nicméně úspěšnost transfekce buněk linie NIH 3T3 byla nízká (okolo 10 %), a proto následná western blotová analýza exprese *NPM* v lyzátu těchto buněk, převážně netransfekovaných, nepřinesla příliš kvalitní data. Naopak u buněčné linie HEK293T transfekce dle očekávání dosahovala vysoké účinnosti (okolo 40%) a western blotová analýza exprese *NPM* v lyzátu těchto buněk prokázala vysokou amplifikaci vneseného plazmidu.

Rozhodli jsme se tedy ověřit i experimenty popisované Bolim *et al.* (BOLLI *et al.* 2009) u buněčné kultury NIH 3T3. Autoři kotransfekovali buňky linie NIH 3T3 plazmidy nesoucími wtNPM a mutNPM typu A v poměrech 1:8, 1:1 a 8:1. Výsledná lokalizace rekombinantních proteinů se v jejich experimentu výrazně lišila v závislosti na poměrech konstruktů v transfekční směsi – v případě přebytku mutanta byl téměř veškerý wtNPM relokalizován do nukleoplazmy a cytoplazmy, pokud se jednalo o transfekci s nadbytkem wtNPM, mutant se vyskytoval převážně v jadérku. Tento experiment, navíc i pro mutNPM typu E, jsme zopakovali v HeLa buněčné linii. Různá míra exprese obou forem v jednotlivých vzorcích byla ověřena pomocí průtokového cytometru a imunoblotu. Silný efekt relokalizace, jaký popisoval Boli, jsme v našem pokusu nepozorovali, částečné vzájemné ovlivnění jednotlivých forem jsme však zaznamenali. Proto jsme se rozhodli ověřit možnost interakce mezi wt a mutovanou formou proteinu u další buněčné linie – HEK293T. V tomto případě byly výsledky srovnatelnější s výsledky citované studie, ani tentokrát však nebyla detekována kompletní relokalizace wtNPM do cytoplazmy. Analýza dat z konfokálního mikroskopu nicméně prokázala souvislost mezi podílem wt formy a lokalizací mutNPM v jadérku i mezi podílem mutované formy a lokalizací wtNPM v cytoplazmě transfekovaných buněk. Naměřené výsledky dokazují, že exogenní a endogenní *NPM* spolu interagují a skrze oligomerizaci vzájemně ovlivňují svoji vnitrobuněčnou lokalizaci.

Zajímavé informace přineslo porovnání intenzit fluorescence transfekovaných buněk linie HEK293T a ostatních dvou linií. U expresního systému HEK293T intenzita fluorescence eGFP-značeného mutanta dosahovala zhruba 2x vyšších hodnot než intenzita pozorovaná u buněčné linie HeLa a NIH 3T3. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s vysokým počtem

kopii plazmidu v jednotlivých buňkách expresního systému HEK293T, který amplifikaci vnesené DNA podporuje. Odlišná intenzita fluorescence navíc koreluje s mírou exprese exogenního NPM určenou imunoblotem. Dále analýza fluorescenční intenzity transfekovaných buněk odhalila rozdíly také v závislosti na vnášené formě NPM. Buňky transfekované wild typem měly asi o 25 % vyšší intenzitu fluorescence než buňky transfekované mutantní formou. Z toho lze usuzovat, že hladina exprese mutNPM je v buňkách nižší než exprese nemutované formy.

Další námět k diskuzi přináší nestejné výsledky získané na základě použití různých variant fluorescenčních proteinů, kterými byly značeny plazmidy. U proteinu značeného mRFP1 byl konfokálním mikroskopem detekován fluorescenční signál o nižší intenzitě a menší specifitě. Je však třeba vzít v úvahu nižší výkon laseru budícího fluorescenci mRFP1, který zřejmě přispívá ke slabší intenzitě fluorescenčního signálu. Na imunoblotu buněčné linie HEK293T byla nižší exprese červeně značeného wtNPM a mutNPM doprovázena výskytem slabého nespecifického signálu v poloze mezi bandy pro endogenní NPM a pro NPM značený mRFP1, naznačující určitou míru degradace fúzního proteinu. Vzhledem k tomu, že na základě měření kolokalizace bylo rozhodnuto, že vnášené plazmidy s mutanty budou značeny eGFP (v případě kotransfekce plazmidů v různých poměrech však i mRFP1), předpokládáme, že analýza lokalizace konfokálním mikroskopem a výsledky imunoblotu tímto nálezem nebyly ovlivněny.

V dostupné literatuře je popsána souvislost mezi přítomností C-terminální mutace NPM a příznivou prognózou odpovědi na léčbu, není však jasné, zda příznivým prognostickým faktorem je samotná přítomnost mutace nebo spíše aberantní lokalizace mutované formy proteinu (FALINI *et al.* 2006b, KONOPLEV *et al.* 2009). Výsledky nedávné studie Kuželová *et al.* 2015 naznačují, že právě cytoplazmatická lokalizace mutovaného NPM umožňuje účinnou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám – peptidové fragmenty odvozené od mutovaného proteinu jsou lépe dosažitelné HLA systémem pro zprostředkování imunitní reakce (KUZELOVA *et al.* 2015). Naše výsledky ukázaly, že lokalizace mutované formy NPM závisí na typu C-terminální mutace. Domníváme se tedy, že specifikace typu mutace může přispět k upřesnění prognózy. Statistické studie na toto téma nejsou ale zatím k dispozici, pravděpodobně zejména proto, že mutace jiné než mutace typu A jsou málo časté a je tedy obtížné získat dostatečný soubor dat pro statistické vyhodnocení.

7 SOUHRN

- Byly zkonstruovány vektory, v nichž jednotlivé geny pro wtNPM a NPM nesoucí mutace typu A, B a E byly fúzovány s geny pro fluorescenční protein eGFP nebo mRFP1.
- Rekombinantní proteiny byly použity k transfekci buněčných linií HeLa, NIH 3T3 a HEK293T a následně byla konfokálním mikroskopem sledována a charakterizována jejich vnitrobuněčná lokalizace.
- Lokalizace rekombinantního proteinu byla ověřena nepřímou imunodetekcí.
- Hladina exprese NPM v lyzátech použitých buněčných linií byla určena pomocí western blotu.
- Účinnost transfekce a míra intenzity fluorescence eGFP u všech linií byla určena pomocí průtokové cytometrie.
- Pozorované rozdíly v intenzitě fluorescence korelovaly s mírou exprese exogenního proteinu (s ohledem na účinnost transfekce) a lišily se v závislosti na vnášené formě NPM.
- Bylo prokázáno, že exogenní a endogenní NPM spolu interagují a skrze oligomerizaci vzájemně ovlivňují svoji vnitrobuněčnou lokalizaci.

8 SEZNAM LITERATURY

- Adam, Z., Vorlíček, J. *et al.* (2001): Hematalogie II - Přehled maligních hematologických nemocí. Grada, Praha.
- Adam, Z., Vorlíček, J. *et al.* (2008): Hematalogie - Přehled Maligních Hematologických Nemocí 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Grada, Praha.
- Adachi, Y. a Yanagida, M. (1989): Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J.Cell Biol.* 108: 1195-1207
- Ahn, J.Y., Liu, X., Cheng, D., Peng, J., Chan, P.K., Wade, P.A., Ye, K. (2005): Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol.Cell* 18: 435-445
- Albiero, E., Madeo, D., Bolli, N., Giaretta, I., Bona, E.D., Martelli, M.F., Nicoletti, I., Rodeghiero, F., Falini, B. (2007): Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. *Leukemia* 21: 1099-1103
- Arregi, I., Falces, J., Olazabal-Herrero, A., Alonso-Marino, M., Taneva, S.G., Rodriguez, J.A., Urbaneja, M.A., Banuelos, S. (2015): Leukemia-Associated Mutations in Nucleophosmin Alter Recognition by CRM1: Molecular Basis of Aberrant Transport. *PLoS One* 10: e0130610
- Baldi, L., Hacker, D.L., Adam, M., Wurm, F.M. (2007): Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol.Lett.* 29: 677-684
- Bandaranayake, A.D. a Almo, S.C. (2014): Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett.* 588: 253-260
- Bates, S. a Vousden, K.H. (1999): Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol.Life Sci.* 55: 28-37
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br.J.Haematol.* 33: 451-458
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C. (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.* 103: 620-625
- Bernal, J.A. a Hernandez, A. (2007): p53 stabilization can be uncoupled from its role in transcriptional activation by loss of PTTG1/securin. *J.Biochem.* 141: 737-745
- Bertwistle, D., Sugimoto, M., Sherr, C.J. (2004): Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol.Cell.Biol.* 24: 985-996
- Bolli, N., De Marco, M.F., Martelli, M.P., Bigerna, B., Pucciarini, A., Rossi, R., Mannucci, R., Manes, N., Pettrossi, V., Pileri, S.A. *et al.* (2009): A dose-dependent tug of war involving the NPM1 leukaemic mutant, nucleophosmin, and ARF. *Leukemia* 23: 501-509
- Bolli, N., Nicoletti, I., De Marco, M.F., Bigerna, B., Pucciarini, A., Mannucci, R., Martelli, M.P., Liso, A., Mecucci, C., Fabbiano, F. *et al.* (2007): Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. *Cancer Res.* 67: 6230-6237

- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., Nigg, E.A. (1989): Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56: 379-390
- Brady, S.N., Yu, Y., Maggi, L.B., Jr, Weber, J.D. (2004): ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol.Cell.Biol.* 24: 9327-9338
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., Sigler, P.B. (1994): The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371: 578-586
- Brodská, B., Holoubek, A., Otevrellová, 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: 1319-1329
- Brown, P., McIntyre, E., Rau, R., Meshinchi, S., Lacayo, N., Dahl, G., Alonzo, T.A., Chang, M., Arceci, R.J., Small, D. (2007): The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood* 110: 979-985
- Bučková, P., Bulková, A., Cermanová, M., Cetkovský, P., Lánská, M., Novák, J., Mayer, J., Palacková, M., Procházková, J., Ráčil, Z. *et al.* (2013): Akutní myeloidní leukémie: informace pro pacienty a jejich blízké. Česká leukemická skupina - pro život (CELL), Brno.
- Burns, K.H., Viveiros, M.M., Ren, Y., Wang, P., DeMayo, F.J., Frail, D.E., Eppig, J.J., Matzuk, M.M. (2003): Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 300: 633-636
- Byrd, J.C., Mrozek, K., Dodge, R.K., Carroll, A.J., Edwards, C.G., Arthur, D.C., Pettenati, M.J., Patil, S.R., Rao, K.W., Watson, M.S. *et al.* (2002): Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100: 4325-4336
- Campregher, P.V., de Oliveira Pereira, W., Lisboa, B., Puga, R., Rodrigues Pereira Velloso, E.D., Helman, R., Cavalheiro Marti, L., Campos Guerra, J.C., Manola, K.N., Petroni, R.C. *et al.* (2016): A novel mechanism of NPM1 cytoplasmic localization in acute myeloid leukemia: the recurrent gene fusion NPM1-HAUS1. *Haematologica*
- Cazzaniga, G., Dell'Oro, M.G., Mecucci, C., Giarin, E., Masetti, R., Rossi, V., Locatelli, F., Martelli, M.F., Basso, G., Pession, A. *et al.* (2005): Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 106: 1419-1422
- Cetkovský, P., Vydra, J. *et al.* (2015): Hematologie v kostce. Mladá fronta, Praha.
- Colombo, E., Marine, J.C., Danovi, D., Falini, B., Pelicci, P.G. (2002): Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat.Cell Biol.* 4: 529-533
- Colombo, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Shing, D.C., Bonetti, P., Luzi, L., Volorio, S., Bernard, L., Pruneri, G., Alcalay, M. *et al.* (2006): Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res.* 66: 3044-3050
- Cordell, J.L., Pulford, K.A., Bigerna, B., Roncador, G., Banham, A., Colombo, E., Pelicci, P.G., Mason, D.Y., Falini, B. (1999): Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood* 93: 632-642
- Cox, L.S., Hupp, T., Midgley, C.A., Lane, D.P. (1995): A direct effect of activated human p53 on nuclear DNA replication. *EMBO J.* 14: 2099-2105

- Dalenc, F., Drouet, J., Ader, I., Delmas, C., Rochaix, P., Favre, G., Cohen-Jonathan, E., Toulas, C. (2002): Increased expression of a COOH-truncated nucleophosmin resulting from alternative splicing is associated with cellular resistance to ionizing radiation in HeLa cells. *Int.J.Cancer* 100: 662-668
- Ding, B., Zhou, L., Jiang, X., Li, X., Zhong, Q., Wang, Z., Yi, Z., Zheng, Z., Yin, C., Cao, R. *et al.* (2015): The relationship between clinical feature, complex immunophenotype, chromosome karyotype, and outcome of patients with acute myeloid leukemia in China. *Dis.Markers* 2015: 382186
- Dingwall, C., Dilworth, S.M., Black, S.J., Kearsley, S.E., Cox, L.S., Laskey, R.A. (1987): Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals. *EMBO J.* 6: 69-74
- Dohner, K., Schlenk, R.F., Habdank, M., Scholl, C., Rucker, F.G., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Frohling, S., Dohner, H. (2005): Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106: 3740-3746
- Dong, X., Biswas, A., Suel, K.E., Jackson, L.K., Martinez, R., Gu, H., Chook, Y.M. (2009): Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature* 458: 1136-1141
- Dumbar, T.S., Gentry, G.A., Olson, M.O. (1989): Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* 28: 9495-9501
- Dundr, M., Meier, U.T., Lewis, N., Rekosh, D., Hammarskjold, M.L., Olson, M.O. (1997): A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromosoma* 105: 407-417
- Dutta, A., Ruppert, J.M., Aster, J.C., Winchester, E. (1993): Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 365: 79-82
- Dutta, S., Akey, I.V., Dingwall, C., Hartman, K.L., Laue, T., Nolte, R.T., Head, J.F., Akey, C.W. (2001): The crystal structure of nucleoplasmin-core: implications for histone binding and nucleosome assembly. *Mol.Cell* 8: 841-853
- Earnshaw, W.C., Honda, B.M., Laskey, R.A., Thomas, J.O. (1980): Assembly of nucleosomes: the reaction involving *X. laevis* nucleoplasmin. *Cell* 21: 373-383
- Ehrensperger, M. *et al.* (1998): *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Eirin-Lopez, J.M., Frehlick, L.J., Ausio, J. (2006): Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Genetics* 173: 1835-1850
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825
- Ellison, R.R., Holland, J.F., Weil, M., Jacquillat, C., Boiron, M., Bernard, J., Sawitsky, A., Rosner, F., Gussoff, B., Silver, R.T. *et al.* (1968): Arabinosyl cytosine: a useful agent in the treatment of acute leukemia in adults. *Blood* 32: 507-523
- Enomoto, T., Lindstrom, M.S., Jin, A., Ke, H., Zhang, Y. (2006): Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability. *J.Biol.Chem.* 281: 18463-18472
- Estey, E.H. (2000): How I treat older patients with AML. *Blood* 96: 1670-1673

- Falini, B., Bolli, N., Liso, A., Martelli, M.P., Mannucci, R., Pileri, S., Nicoletti, I. (2009): Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 23: 1731-1743
- Falini, B., Bolli, N., Shan, J., Martelli, M.P., Liso, A., Pucciarini, A., Bigerna, B., Pasqualucci, L., Mannucci, R., Rosati, R. *et al.* (2006a): Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* 107: 4514-4523
- Falini, B., Martelli, M.P., Bolli, N., Bonasso, R., Ghia, E., Pallotta, M.T., Diverio, D., Nicoletti, I., Pacini, R., Tabarrini, A. *et al.* (2006b): Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 108: 1999-2005
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A. *et al.* (2005): Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N.Engl.J.Med.* 352: 254-266
- Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M.F., Mecucci, C. (2007): Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 109: 874-885
- Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P., Laemmli, U.K. (1991): Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol.Cell.Biol.* 11: 2567-2575
- Federici, L., Arcovito, A., Scaglione, G.L., Scaloni, F., Lo Sterzo, C., Di Matteo, A., Falini, B., Giardina, B., Brunori, M. (2010): Nucleophosmin C-terminal leukemia-associated domain interacts with G-rich quadruplex forming DNA. *J.Biol.Chem.* 285: 37138-37149
- Feuerstein, N. a Mond, J.J. (1987): "Numatrin," a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 262: 11389-11397
- Foley, K. M. *et al.* (1990): Cancer Pain Relief and Palliative Care, Report of a WHO Expert Committee.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I.W. (1997): CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90: 1051-1060
- Fredly, H., Gjertsen, B.T., Bruserud, O. (2013): Histone deacetylase inhibition in the treatment of acute myeloid leukemia: the effects of valproic acid on leukemic cells, and the clinical and experimental evidence for combining valproic acid with other antileukemic agents. *Clin.Epigenetics* 5: 12-7083-5-12
- Frehlick, L.J., Eirin-Lopez, J.M., Ausio, J. (2007): New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* 29: 49-59
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., Nishida, E. (1997): CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390: 308-311
- Grimwade, D. (2001): The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract.Res.Clin.Haematol.* 14: 497-529
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A. *et al.* (1998): The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92: 2322-2333
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., Pandolfi, P.P. (2005): Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437: 147-153

- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., Pandolfi, P.P. (2006): Nucleophosmin and cancer. *Nat.Rev.Cancer.* 6: 493-505
- Grummitt, C.G., Townsley, F.M., Johnson, C.M., Warren, A.J., Bycroft, M. (2008): Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J.Biol.Chem.* 283: 23326-23332
- Hall, G.W. (2001): Childhood myeloid leukaemias. *Best Pract.Res.Clin.Haematol.* 14: 573-591
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816
- Harris, A.L. (2002): Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat.Rev.Cancer.* 2: 38-47
- Hassan, S. a Smith, M. (2014): Acute myeloid leukaemia. *Hematology* 19: 493-494
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299
- Herrera, J.E., Correia, J.J., Jones, A.E., Olson, M.O. (1996): Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23. *Biochemistry* 35: 2668-2673
- Herrera, J.E., Savkur, R., Olson, M.O. (1995): The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res.* 23: 3974-3979
- Hingorani, K., Szebeni, A., Olson, M.O. (2000): Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J.Biol.Chem.* 275: 24451-24457
- Hollink, I.H., Zwaan, C.M., Zimmermann, M., Arentsen-Peters, T.C., Pieters, R., Cloos, J., Kaspers, G.J., de Graaf, S.S., Harbott, J., Creutzig, U. *et al.* (2009): Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia* 23: 262-270
- Honda, R. a Yasuda, H. (1999): Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* 18: 22-27
- Huang, M., Thomas, D., Li, M.X., Feng, W., Chan, S.M., Majeti, R., Mitchell, B.S. (2013): Role of cysteine 288 in nucleophosmin cytoplasmic mutations: sensitization to toxicity induced by arsenic trioxide and bortezomib. *Leukemia* 27: 1970-1980
- Huang, N., Negi, S., Szebeni, A., Olson, M.O. (2005): Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *J.Biol.Chem.* 280: 5496-5502
- Chan, P.K., Aldrich, M., Cook, R.G., Busch, H. (1986): Amino acid sequence of protein B23 phosphorylation site. *J.Biol.Chem.* 261: 1868-1872
- Chan, P.K. a Chan, F.Y. (1995): Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1262: 37-42
- Chan, W.Y., Liu, Q.R., Borjigin, J., Busch, H., Rennert, O.M., Tease, L.A., Chan, P.K. (1989): Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 28: 1033-1039
- Chang, J.H. a Olson, M.O. (1989): A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 mRNA. *J.Biol.Chem.* 264: 11732-11737

- Chang, J.H. a Olson, M.O. (1990): Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J.Biol.Chem.* 265: 18227-18233
- Chiarella, S., De Cola, A., Scaglione, G.L., Carletti, E., Graziano, V., Barcaroli, D., Lo Sterzo, C., Di Matteo, A., Di Ilio, C., Falini, B. *et al.* (2013): Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 41: 3228-3239
- Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., Zhang, Y. (2003): Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol.Cell* 12: 1151-1164
- Jeon, Y., Seo, S.W., Park, S., Park, S., Kim, S.Y., Ra, E.K., Park, S.S., Seong, M.W. (2013): Identification of two novel NPM1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann.Lab.Med.* 33: 60-64
- Kerr, L.E., Birse-Archbold, J.L., Short, D.M., McGregor, A.L., Heron, I., Macdonald, D.C., Thompson, J., Carlson, G.J., Kelly, J.S., McCulloch, J. *et al.* (2007): Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene* 26: 2554-2562
- Kimby, E., Nygren, P., Glimelius, B., SBU-group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. (2001): A systematic overview of chemotherapy effects in acute myeloid leukaemia. *Acta Oncol.* 40: 231-252
- Koh, Y., Park, J., Bae, E.K., Ahn, K.S., Kim, I., Bang, S.M., Lee, J.H., Yoon, S.S., Lee, D.S., Lee, Y.Y. *et al.* (2009): Non-A type nucleophosmin 1 gene mutation predicts poor clinical outcome in de novo adult acute myeloid leukemia: differential clinical importance of NPM1 mutation according to subtype. *Int.J.Hematol.* 90: 1-5
- Konoplev, S., Huang, X., Drabkin, H.A., Koeppen, H., Jones, D., Kantarjian, H.M., Garcia-Manero, G., Chen, W., Medeiros, L.J., Bueso-Ramos, C.E. (2009): Cytoplasmic localization of nucleophosmin in bone marrow blasts of acute myeloid leukemia patients is not completely concordant with NPM1 mutation and is not predictive of prognosis. *Cancer* 115: 4737-4744
- Kuo, M.L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (2004): N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev.* 18: 1862-1874
- Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T.M., Ojala, P.M., Meek, D., Laiho, M. (2004): Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer.Cell.* 5: 465-475
- Kuzelova, K., Brodska, B., Fuchs, O., Dobrovolna, M., Soukup, P., Cetkovsky, P. (2015): Altered HLA Class I Profile Associated with Type A/D Nucleophosmin Mutation Points to Possible Anti-Nucleophosmin Immune Response in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One* 10: e0127637
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., Finch, J.T. (1978): Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275: 416-420
- Latagliata, R., Bongarzone, V., Carmosino, I., Mengarelli, A., Breccia, M., Borza, P.A., D'Andrea, M., D'Elia, G.M., Mecarocci, S., Morano, S.G. *et al.* (2006): Acute myelogenous leukemia in elderly patients not eligible for intensive chemotherapy: the dark side of the moon. *Ann.Oncol.* 17: 281-285
- Lee, H.H., Kim, H.S., Kang, J.Y., Lee, B.I., Ha, J.Y., Yoon, H.J., Lim, S.O., Jung, G., Suh, S.W. (2007): Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer-pentamer interface. *Proteins* 69: 672-678
- Li, J., Zhang, X., Sejas, D.P., Bagby, G.C., Pang, Q. (2004): Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J.Biol.Chem.* 279: 41275-41279

- Li, Y.P., Busch, R.K., Valdez, B.C., Busch, H. (1996): C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur.J.Biochem.* 237: 153-158
- Li, Z., Boone, D., Hann, S.R. (2008): Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105: 18794-18799
- Lim, M.J. a Wang, X.W. (2006): Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect.Prev.* 30: 481-490
- Lindstrom, M.S. (2011): NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem.Res.Int.* 2011: 195209
- Lindstrom, M.S. a Zhang, Y. (2008): Ribosomal protein S9 is a novel B23/NPM-binding protein required for normal cell proliferation. *J.Biol.Chem.* 283: 15568-15576
- Liu, Y., He, P., Liu, F., Shi, L., Zhu, H., Zhao, J., Wang, Y., Cheng, X., Zhang, M. (2014): Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol.Clin.Oncol.* 2: 275-281
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T. (1993): P53 is Required for Radiation-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. *Nature* 362: 847-849
- Lowenberg, B., Downing, J.R., Burnett, A. (1999): Acute myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.* 341: 1051-1062
- MacArthur, C.A. a Shackleford, G.M. (1997): Npm3: a novel, widely expressed gene encoding a protein related to the molecular chaperones nucleoplasm and nucleophosmin. *Genomics* 42: 137-140
- Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B.M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T. (1999): Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* 59: 141-150
- Maiguel, D.A., Jones, L., Chakravarty, D., Yang, C., Carrier, F. (2004): Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol.Cell.Biol.* 24: 3703-3711
- Mariano, A.R., Colombo, E., Luzi, L., Martinelli, P., Volorio, S., Bernard, L., Meani, N., Bergomas, R., Alcalay, M., Pelicci, P.G. (2006): Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene* 25: 4376-4380
- Mayer, J., Starý, J. *et al.* (2002): *Leukemie.* Grada, Praha.
- McLay, D.W. a Clarke, H.J. (2003): Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125: 625-633
- Meek, D.W. (1994): Post-translational modification of p53. *Semin.Cancer Biol.* 5: 203-210
- Mercer, W.E., Shields, M.T., Amin, M., Sauve, G.J., Appella, E., Romano, J.W., Ullrich, S.J. (1990): Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 6166-6170
- Michalik, J., Yeoman, L.C., Busch, H. (1981): Nucleolar localization of protein B23 (37/5.1) by immunocytochemical techniques. *Life Sci.* 28: 1371-1379
- Miller, S.D., Farmer, G., Prives, C. (1995): p53 inhibits DNA replication in vitro in a DNA-binding-dependent manner. *Mol.Cell.Biol.* 15: 6554-6560

- Mills, A.D., Laskey, R.A., Black, P., De Robertis, E.M. (1980): An acidic protein which assembles nucleosomes in vitro is the most abundant protein in *Xenopus* oocyte nuclei. *J.Mol.Biol.* 139: 561-568
- Mitreá, D.M., Grace, C.R., Buljan, M., Yun, M.K., Pytel, N.J., Satumba, J., Nourse, A., Park, C.G., Madan Babu, M., White, S.W. *et al.* (2014): Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 111: 4466-4471
- Mitreá, D.M. a Kriwacki, R.W. (2012): Cryptic disorder: an order-disorder transformation regulates the function of nucleophosmin. *Pac.Symp.Biocomput.* 152-163
- Miyashita, T. a Reed, J.C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299
- Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.L., Look, A.T. (1994): Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263: 1281-1284
- Mrozek, K., Heerema, N.A., Bloomfield, C.D. (2004): Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 18: 115-136
- Mrozek, K., Marcucci, G., Nicolet, D., Maharry, K.S., Becker, H., Whitman, S.P., Metzeler, K.H., Schwind, S., Wu, Y.Z., Kohlschmidt, J. *et al.* (2012): Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J.Clin.Oncol.* 30: 4515-4523
- Mullighan, C.G., Kennedy, A., Zhou, X., Radtke, I., Phillips, L.A., Shurtleff, S.A., Downing, J.R. (2007): Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia* 21: 2000-2009
- Namboodiri, V.M., Akey, I.V., Schmidt-Zachmann, M.S., Head, J.F., Akey, C.W. (2004): The structure and function of *Xenopus* NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. *Structure* 12: 2149-2160
- Namboodiri, V.M., Dutta, S., Akey, I.V., Head, J.F., Akey, C.W. (2003): The crystal structure of *Drosophila* NLP-core provides insight into pentamer formation and histone binding. *Structure* 11: 175-186
- Negi, S.S. a Olson, M.O. (2006): Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J.Cell.Sci.* 119: 3676-3685
- Nishimura, Y., Ohkubo, T., Furuichi, Y., Umekawa, H. (2002): Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 66: 2239-2242
- Nozawa, Y., Van Belzen, N., Van der Made, A.C., Dinjens, W.N., Bosman, F.T. (1996): Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J.Pathol.* 178: 48-52
- Ochs, R., Lischwe, M., O'Leary, P., Busch, H. (1983): Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Exp.Cell Res.* 146: 139-149
- Ohsumi, K. a Katagiri, C. (1991): Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplasmin. *Dev.Biol.* 148: 295-305
- Okuda, M. (2002): The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 21: 6170-6174
- Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E. *et al.* (2000): Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103: 127-140

- Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., Nagata, K. (2001): Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett.* 506: 272-276
- Okuwaki, M., Tsujimoto, M., Nagata, K. (2002): The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol.Biol.Cell* 13: 2016-2030
- Orrick, L.R., Olson, M.O., Busch, H. (1973): Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 70: 1316-1320
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., Nigg, E.A. (1990): Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 60: 791-801
- Philpott, A., Leno, G.H., Laskey, R.A. (1991): Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell* 65: 569-578
- Pippard, M.J., Callender, S.T., Sheldon, P.W. (1979): Infiltration of central nervous system in adult acute myeloid leukaemia. *Br.Med.J.* 1: 227-229
- Pitiot, A.S., Santamaria, I., Garcia-Suarez, O., Centeno, I., Astudillo, A., Rayon, C., Balbin, M. (2007): A new type of NPM1 gene mutation in AML leading to a C-terminal truncated protein. *Leukemia* 21: 1564-1566
- Pokharel, M. (2012): Leukemia: A Review Article. *International journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Bio Sciences* 2: 397-407
- Poletto, M., Lirussi, L., Wilson, D.M., 3rd, Tell, G. (2014): Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins. *Mol.Biol.Cell* 25: 1641-1652
- Porcu, P., Cripe, L.D., Ng, E.W., Bhatia, S., Danielson, C.M., Orazi, A., McCarthy, L.J. (2000): Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leuk.Lymphoma* 39: 1-18
- Prinos, P., Lacoste, M.C., Wong, J., Bonneau, A.M., Georges, E. (2011): Mutation of cysteine 21 inhibits nucleophosmin/B23 oligomerization and chaperone activity. *Int.J.Biochem.Mol.Biol.* 2: 24-30
- Raimondi, S.C., Dube, I.D., Valentine, M.B., Mirro, J., Jr, Watt, H.J., Larson, R.A., Bitter, M.A., Le Beau, M.M., Rowley, J.D. (1989): Clinicopathologic manifestations and breakpoints of the t(3;5) in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Leukemia* 3: 42-47
- Ramos-Echazabal, G., Chinae, G., Garcia-Fernandez, R., Pons, T. (2012): In silico studies of potential phosphoresidues in the human nucleophosmin/B23: its kinases and related biological processes. *J.Cell.Biochem.* 113: 2364-2374
- Rau, R. a Brown, P. (2009): Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol.Oncol.* 27: 171-181
- Redner, R.L., Rush, E.A., Faas, S., Rudert, W.A., Corey, S.J. (1996): The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 87: 882-886
- Richards, S.A., Carey, K.L., Macara, I.G. (1997): Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science* 276: 1842-1844
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

- Schmidt-Zachmann, M.S., Hugle-Dorr, B., Franke, W.W. (1987): A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO J.* 6: 1881-1890
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M.F., Haferlach, T., Hiddemann, W., Falini, B. (2005): Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106: 3733-3739
- Semenza, G.L. (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer.* 3: 721-732
- Semenza, G.L. a Wang, G.L. (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol.Cell.Biol.* 12: 5447-5454
- Shackleford, G.M., Ganguly, A., MacArthur, C.A. (2001): Cloning, expression and nuclear localization of human NPM3, a member of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *BMC Genomics* 2: 8
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., Costa, J. (1992): Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 4495-4499
- Sherr, C.J. (2001): The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2: 731-737
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. (1997): DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-334
- Shields, L.B., Gercel-Taylor, C., Yashar, C.M., Wan, T.C., Katsanis, W.A., Spinnato, J.A., Taylor, D.D. (1997): Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. *J.Soc.Gynecol.Investig.* 4: 298-304
- Shinmura, K., Tarapore, P., Tokuyama, Y., George, K.R., Fukasawa, K. (2005): Characterization of centrosomal association of nucleophosmin/B23 linked to Crm1 activity. *FEBS Lett.* 579: 6621-6634
- Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. (1997): DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* 11: 3471-3481
- Sionov, R.V. a Haupt, Y. (1999): The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18: 6145-6157
- Slovak, M.L., Kopecky, K.J., Cassileth, P.A., Harrington, D.H., Theil, K.S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C.L., Head, D.R., Rowe, J.M. *et al.* (2000): Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96: 4075-4083
- Spector, D.L., Ochs, R.L., Busch, H. (1984): Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma* 90: 139-148
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C., Weis, K. (1997): Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90: 1041-1050
- Stefanidakis, M., Karjalainen, K., Jaalouk, D.E., Gahmberg, C.G., O'Brien, S., Pasqualini, R., Arap, W., Koivunen, E. (2009): Role of leukemia cell invadosome in extramedullary infiltration. *Blood* 114: 3008-3017
- Subong, E.N., Shue, M.J., Epstein, J.I., Briggman, J.V., Chan, P.K., Partin, A.W. (1999): Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate* 39: 298-304

- Sugimoto, M., Kuo, M.L., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (2003): Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol.Cell* 11: 415-424
- Suzuki, T., Kiyoi, H., Ozeki, K., Tomita, A., Yamaji, S., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K. *et al.* (2005): Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 2854-2861
- Swaminathan, V., Kishore, A.H., Febitha, K.K., Kundu, T.K. (2005): Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol.Cell.Biol.* 25: 7534-7545
- Szebeni, A., Herrera, J.E., Olson, M.O. (1995): Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* 34: 8037-8042
- Szebeni, A. a Olson, M.O. (1999): Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci.* 8: 905-912
- Tanaka, M., Sasaki, H., Kino, I., Sugimura, T., Terada, M. (1992): Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res.* 52: 3372-3377
- Thiede, C., Creutzig, E., Reinhardt, D., Ehninger, G., Creutzig, U. (2007): Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. *Leukemia* 21: 366-367
- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., Ehninger, G. (2006): Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107: 4011-4020
- Umekawa, H., Chang, J.H., Correia, J.J., Wang, D., Wingfield, P.T., Olson, M.O. (1993): Nucleolar protein B23: bacterial expression, purification, oligomerization and secondary structures of two isoforms. *Cell.Mol.Biol.Res.* 39: 635-645
- Valdez, B.C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y., Chan, P.K., Busch, H. (1994): Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23. *J.Biol.Chem.* 269: 23776-23783
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A. *et al.* (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114: 937-951
- Verhaak, R.G., Goudswaard, C.S., van Putten, W., Bijl, M.A., Sanders, M.A., Hagens, W., Uitterlinden, A.G., Erpelinck, C.A., Delwel, R., Lowenberg, B. *et al.* (2005): Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106: 3747-3754
- Villela, L. a Bolanos-Meade, J. (2011): Acute myeloid leukaemia: optimal management and recent developments. *Drugs* 71: 1537-1550
- Vorlíček, J. *et al.* (2012): *Klinická Onkologie pro Sestry, 2., přepracované a doplněné vydání.* Grada, Praha.
- Wang, D., Baumann, A., Szebeni, A., Olson, M.O. (1994): The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J.Biol.Chem.* 269: 30994-30998
- Wang, D., Umekawa, H., Olson, M.O. (1993): Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell.Mol.Biol.Res.* 39: 33-42

- Wang, W., Budhu, A., Forgues, M., Wang, X.W. (2005): Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat.Cell Biol.* 7: 823-830
- Wanzel, M., Russ, A.C., Kleine-Kohlbrecher, D., Colombo, E., Pelicci, P.G., Eilers, M. (2008): A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat.Cell Biol.* 10: 1051-1061
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Bar-Sagi, D. (1999): Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat.Cell Biol.* 1: 20-26
- Wu, M.H., Chang, J.H., Yung, B.Y. (2002): Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis* 23: 93-100
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993): P21 is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases. *Nature* 366: 701-704
- Yoneda-Kato, N., Look, A.T., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Raimondi, S.C., Cohen, K.J., Carroll, A.J., Morris, S.W. (1996): The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* 12: 265-275
- Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J.J., May, P., Oren, M. (1993): P53-Mediated Cell Death: Relationship to Cell Cycle Control. *Mol.Cell.Biol.* 13: 1415-1423
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., Oren, M. (1991): Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347
- Yu, Y., Maggi, L.B., Jr, Brady, S.N., Apicelli, A.J., Dai, M.S., Lu, H., Weber, J.D. (2006): Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol.Cell.Biol.* 26: 3798-3809
- Yung, B.Y., Busch, H., Chan, P.K. (1985): Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *Biochim.Biophys.Acta* 826: 167-173
- Zhang, H., Shi, X., Paddon, H., Hampong, M., Dai, W., Pelech, S. (2004): B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J.Biol.Chem.* 279: 35726-35734
- Zirwes, R.F., Schmidt-Zachmann, M.S., Franke, W.W. (1997): Identification of a small, very acidic constitutive nucleolar protein (NO29) as a member of the nucleoplasmin family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 11387-11392