

# NUKLEOFOSMIN S AKTIVITOU STIMULUJÍCÍ PROLIFERACI NEBO NAOPAK POTLAČUJÍCÍ RŮST NÁDORU

## NUKLEOPHOSMIN WITH PROLIFERATIVE OR GROWTH-SUPPRESSIVE ACTIVITY

FUCHS O.

ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

### Souhrn

**Východiska:** Nukleofosmin (NPM) je silně zastoupený multifunkční fosfoprotein s funkcí nádorového supresoru i onkogenu. NPM hraje klíčovou úlohu ve tvorbě ribozomů a podporuje tak růst buněk a jejich proliferaci. NPM udržuje stabilitu genomu řízením mechanismu opravy DNA a duplikace centrozomu. NPM ovlivňuje stabilitu a aktivitu nádorového supresoru p53 a účastní se i apoptotické odpovědi na stres a působení onkogenů a tím ovlivňuje dráhy nádorových supresorů. Chromozomální translokace zahrnující gen *NPM1* byly nalezeny u myeloidních i lymfoidních malignit. Fúzní proteiny inhibují aktivitu nízkých hladin divokého typu *NPM1* a to přispívá k tvorbě nádoru. NPM se však chová jako nádorový supresor v nádorech, když exprese NPM je snížena a je změněna i distribuce NPM v buňce. Ke zvýšené expresi *NPM1* dochází u solidních nádorů a lymfoidních malignit. Zvýšené množství *NPM1* stimuluje akumulaci nádorového supresoru ARF ("alternative reading frame") v inaktivním stavu v jádru buněk, inhibuje aktivaci p53 a stimuluje růst buněk. Dráha p53 je cílem protinádorové terapie. Heterozygotní mutace genu *NPM1* jsou nejčastějšími genetickými defekty u akutní myeloidní leukémie (AML) s normálním karyotypem. **Cíl:** Analýza současných znalostí o nukleofosminu a jeho úloze u maligních nádorů a pochopení jeho úlohy v ontogeneze je nezbytné pro vývoj nových cílených postupů v terapii těchto onemocnění. **Závěry:** Detekce mutací genu *NPM1* umožní rozčlenit heterogenní skupinu AML s normálním karyotypem do prognosticky rozdílných podskupin. Poznání mechanismu účinku mutovaného *NPM1* usnadní vývoj nových chemoterapeutik. Zvýšená exprese *NPM1* může být použita jako jeden z nádorových markerů u solidních nádorů a lymfoidních malignit. Metoda použití malých interferujících RNA (si RNA) je příslibem nové strategie v terapii anaplastického velkobuněčného lymfomu s chromozomální přestavbou t(2;5).

**Klíčová slova:** nukleofosmin, protein p (ARF), centrozom, apoptóza, fúzní proteiny, mutace

### Summary:

**Backgrounds:** Nucleophosmin (NPM) is an abundant multifunctional phosphoprotein with both tumor-suppressor and oncogenic functions. NPM plays a key role in ribosome biogenesis, supporting cell growth and proliferation. NPM maintains genomic stability by controlling DNA repair mechanisms and centrosome duplication. NPM modulates the stability and the activity of the tumor suppressor p53 and is involved in the apoptotic response to stress and oncogenes action, thus contributing to the modulation of growth-suppressive pathways. Chromosomal translocations involving the *NPM1* gene were found in myeloid and lymphoid cancers. The fusion proteins inhibit the activity of low levels of wild type *NPM1* and this event induces tumorigenesis. However, NPM behaves as a tumor suppressor in tumors when NPM expression is reduced and its subcellular distribution altered. *NPM1* is also frequently overexpressed in both solid tumors and lymphoid cancers. The increased levels of NPM promote increased accumulation of alternative reading frame (ARF) in an inactive nucleolar state, inhibit p53 activation and stimulate growth. The p53 pathway is a target of anti-cancer therapeutics. Heterozygous mutations of *NPM1* gene are the most frequent genetic lesions in acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Design:** The analysis of contemporary knowledge about nucleophosmin and its role in cancer and understanding of its significance in oncogenesis is necessary for the development of new target procedures in therapy of cancer. **Conclusions:** Detection of *NPM1* mutations allows to divide the heterogeneous group of AML with normal karyotype into prognostically different subgroups. Understanding of the mechanism how mutant *NPM1* effects leukemogenesis will facilitate the development of new chemotherapeutic agents. *NPM1* overexpression can be used as one of tumor markers in carcinomas and lymphoid malignancies. The method of small interfering RNA (siRNA) employment represents a promise of a new strategy in anaplastic large cell lymphoma with chromosomal translocation t(2;5) treatment.

**Key words:** nucleophosmin, p(ARF) protein, centrosome, apoptosis, fusion proteins, mutation

### Úvod

Nukleofosmin (*NPM1*, také známý pod označeními numatrin, B23 a NO38) je multifunkční protein, který je nezbytný pro normální embryonální vývoj savců. Inaktivace genu kódujícího mRNA pro tento protein vede u embrya myši k vývojovým poruchám, především předního mozku

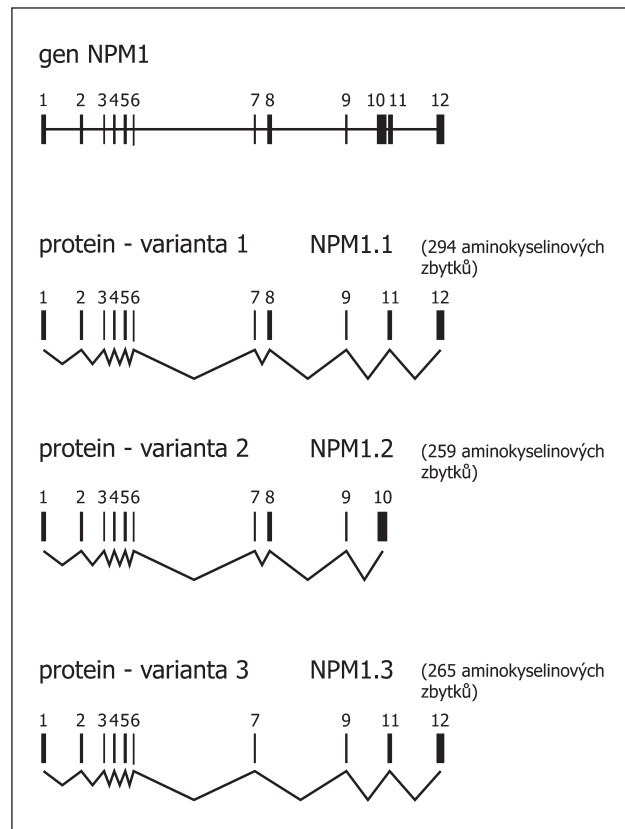
a hematopoézy (1). Uvedené poruchy v embryonálním vývoji jsou částečně způsobeny ztrátou funkce *NPM1* v regulaci duplikace centrozomu (2,3) během mitozy a tím vzniklé nestability genomu a také defekty v biogeneze ribozomů (4-6). Nukleofosmin patří do rodiny jaderných chaperonů zabraňujících agregaci proteinů a tvorbě

nespecifických nukleoproteinových komplexů (7). Řadí se sem společně s nukleoplazminem (NPM2) a proteinem NPM3 (7-9). NPM1 byl poprvé nalezen v jádru buněk jako silně zastoupený fosfoprotein (10,11). NPM1 má důležitou úlohu v již uvedené biogeneze ribozomů a to ve zpracování 47S pre-ribosomální RNA a tvorbě ribozomů (12) a účastní se i na remodelaci chromatinu, tedy změně jeho struktury z kondenzovaného do rozvolněného stavu. Tato změna struktury chromatinu silně ovlivňuje regulaci transkripce (13-15). NPM1 vykazuje často velmi zvýšenou expresi u nádorů (16), zvláště karcinomů žaludku (17), tlustého střeva a konečníku (18), vaječníků (19) a prostaty (20). Vysoká exprese NPM1 je považována za nádorový marker uvedených karcinomů. Četné mutace a translokace odpovídajícího genu *NPM1* byly nalezeny u hematologických malignit (21-29). Naopak, mutace genu *NPM1* nebyly nalezeny u karcinomů jater, plic, prsu, tlustého střeva a žaludku (30). Snížená exprese NPM1 je spojena s diferenciací buněk a s apoptozou (31,32). Inhibice exprese NPM1 pomocí uměle připravených oligonukleotidů komplementárních k určitému úseku mRNA pro NPM1 a inhibujících translaci této mRNA, ukázala, že NPM1 hraje klíčovou úlohu v rezistenci maligních buněk na indukci diferenciaci a apoptozu (31,32). NPM1 se váže na řadu buněčných a virových proteinů a má vliv na jejich umístění v buňce a fyziologickou funkci. Významná je například stabilizace a zvýšení transkripční aktivity nádorového supresoru p53 pomocí interakce NPM1 s ubikvitinligázou Hdm2, která je lidským homologem myši Mdm2 (“murine double minute”) a interakce NPM1 se samotným p53 (33,34).

### Gen *NPM1*, mRNA a protein

Lidský gen *NPM1* má velikost 25 kb, obsahuje 12 exonů (obr.1) a byl mapován na chromozomu 5q35 (7,35,36). Chan et al. (37) popsali sekvenci nukleotidů komplementární DNA (cDNA) pro NPM1, která odpovídala proteinu o 294 aminokyselinových zbytcích. Existují ještě další dvě izoformy tohoto proteinu, které vznikají alternativním sestřihem pre-mRNA pro NPM1. Izoforma NPM1.2 (obr.1) neobsahuje aminokyselinové zbytky kodované 11. a 12. exonem. Varianta NPM1.2 je tedy zkrácena na C-konci a obsahuje celkem 259 aminokyselinových zbytků. Zatím co izoforma NPM1 se nachází ve velké koncentraci hlavně v jádru buněk, izoforma NPM1.2 je přítomna v buňkách v malém množství a byla nalezena jak v cytoplasmě, tak v nukleoplasmě (38). Třetí izoforma NPM1.3 (obr.1) neobsahuje aminokyselinové zbytky odpovídající exonům 8 a 10 a její funkce není zatím objasněna.

Struktura proteinu NPM1 je schematicky znázorněna na obr.2. Dvě hydrofobní oblasti proteinu bohaté na leucinové zbytky umožňují transport NPM1 z jádra do cytoplazmy a jsou označeny NES (“nuclear export signal”). NPM1 divokého typu nese však slabý fyziologický NES a proto se nachází téměř výhradně v jádru. Toto umístění NPM1 je dále podpořeno fyziologickými signály NLS (“nuclear localization signal”) a NoLS (“nucleolus localization signal”) na C-konci proteinu NPM1. Mutace v oblasti NES způsobí, že NPM1 ztrácí schopnost exportu z jádra do cytoplazmy a hromadí se v jádru buněk. Tyto mutace

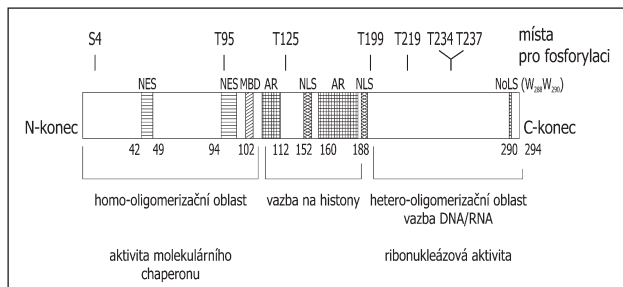


Obr.1.: Schema lidského genu *NPM1* a tří variant produktu jeho exprese.

se však nevyskytují a naopak běžné mutace NPM1 vytváří často další motiv NES na C-konci proteinu NPM1 a takto mutovaný NPM1 se vyskytuje v cytoplasmě. Pro motiv NoLS jsou charakteristické dva aromatické tryptofanové zbytky ( $W_{288}$  a  $W_{290}$ ) a mutace těchto W brání umístění NPM1 v jádru buněk. N-koncová oblast NPM1 je odpovědná za oligomerizaci NPM1 a za jeho aktivitu chaperonu (7). NPM1 se vyskytuje převážně jako oligomer o hmotnosti 230-250 kDa a to odpovídá hexameru (39,40). NPM1.2 existuje také ve formě oligomeru. N-koncová hydrofobní oblast NPM1 brání agregaci proteinů v jádru buněk a umožňuje acetylaci histonů, rozvolnění chromatinu a zvýšenou transkripční aktivitu (15). Aktivita NPM1 jako chaperonu závisí také na první ze dvou kyselých oblastí (AR, “acidic region”, obr.2), bohatých na zbytky kyseliny asparagové a kyseliny glutamové, které se nachází uprostřed proteinu NPM1 (37). Tato negativně nabitá oblast váže bazické ribosomální proteiny a tím brání nespecifickým interakcím mezi ribosomálními proteiny a rRNA během sestavování ribozomů v jádru buněk. Tato oblast AR také obsahuje Ser 125, hlavní cílové místo účinku kaseinkinázy II (CK2) (41). Oblast mezi oběma AR a oblast C-konce NPM1 vykazuje aktivitu ribonukleázy. Oblast na C-konci vykazuje také heterooligomerizační aktivitu a aktivitu vázat nukleové kyseliny (obr.2).

### Fosforylace NPM1

Protein NPM1 obsahuje několik míst, která jsou fosforylována během buněčného cyklu. Kromě již



**Obr.2:** Schematické znázornění jednotlivých funkčních oblastí proteinu NPM1 a míst pro jeho fosforylaci

zmíněné fosforylace Ser 125 jsou na obr. 2 znázorněny další cílová místa fosforylace. Na cyklinech B a E závislé protein kinázy cdk1 a cdk2 se podílejí na fosforylaci těchto míst. Treoninové zbytky T199, T219, T234 a T237 v C-koncové části proteinu NPM1 jsou cílovými místy fosforylace pomocí cdk1 (42). Fosforylace NPM1 pomocí CK2 v interfázi a pomocí cdk1 v mitóze snižuje afinitu NPM1 ke složkám jadérka a zvyšuje jeho pohyblivost a umístění v nukleoplazmě (42). Fosforylace NPM1 také mění strukturu NPM1 a zvyšuje jeho negativní náboj zvláště v C-koncové oblasti a tím i afinitu k nukleovým kyselinám, tedy k pre-rRNA v jadérku. Fosforylace NPM1 pomocí cdk2 hraje úlohu v iniciaci duplikace centrozomu (43). Cdk2 v komplexu s cyklinem E fosforyluje NPM1 na Thr 199 a způsobí disociaci NPM1 od centrozomu a jeho duplikaci. NPM1 asociuje specificky s neduplikovaným centrozomem a disociuje od něho po fosforylaci Thr 199 pomocí cdk2 v pozdní fázi G1 buněčného cyklu.

Mikroinjekce protilátky proti NPM1 brání fosforylaci pomocí komplexu cdk2 s cyklinem E a tím disociaci NPM1 od centrozomu a duplikaci centrozomu. Mutovaný NPM1 postrádající Thr 199 a tedy nefosforylovatelný pomocí komplexu cdk2 s cyklinem E brání též duplikaci centrozomu.

Plk1 ("Polo-like kinase") fosforyluje specificky během mitózy Ser 4 proteinu NPM1 a tato fosforylace je důležitá pro duplikaci centrozomu, segregaci a cytokinezu a to nepřímým mechanismem (44).

### Úloha NPM1 v duplikaci centrozomu

Pokud buňka vstupuje do mitózy, cytoplazmatické mikrotubuly se rozpadají a vytváří složitou strukturu, zvanou dělicí vřeténko. Dělicí vřeténko obsahuje nástroje, které slouží k rovnoměrnému rozdělení chromozomů mezi obě dceřinné buňky. Mikrotubuly v buňce vyrůstají ze specializovaného organizačního centra, centrozomu, který kontroluje jejich počet, umístění a orientaci v cytoplazmě. Před vznikem mitotického vřeténka na počátku M-fáze buněčného cyklu jsou nejprve zduplikovány centrozomy. Duplikace centrozomu začíná na hranici přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu. Během cytokineze každá dceřinná buňka zdědí jeden centrozom a tak duplikace centrozomu probíhá pouze jednou během každého buněčného cyklu (45). Dceřinné centrozomy se rozcházejí k opačným pólům jádra a dávají vznik pólům vřeténka. U maligních buněk dochází k nenormální duplikaci centrozomu a to může přispívat k nestabilitě genomu během tvorby multipolárních mitotických vřetének (46).

Mechanismus, který řídí duplikaci centrozomu nebyl zatím zcela objasněn. Jak již bylo uvedeno v předchozím odstavci o fosforylaci NPM1, komplexy cdk2 s cykliny hrají důležitou úlohu v duplikaci centrozomu (47-49). NPM1 byl nalezen na pólech mitotického vřeténka v buňkách HeLa (50). Imunofluorescenční analýza ukázala, že NPM1 je umístěn na neduplikovaných centrozomech v buňkách myších fibroblastů linie 3T3, ale nebyl nalezen na centrozomech po duplikaci. Nukleofosmin asociuje s centrozomem během mitózy a blokuje jeho duplikaci až do pozdní fáze G1 buněčného cyklu, kdy vzrůstá kinázová aktivita cdk2 v komplexu s cyklinem E na přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu. Specifická fosforylace NPM1 pomocí komplexu cdk2 s cyklinem E způsobí uvolnění NPM1 z centrozomu a tím umožní duplikaci centrozomu. Duplikace centrozomu je stimulována vzrůstem aktivity vápenatými ionty aktivované kinázy II závislé na kalmodulinu (CaMKII) na přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu (51).

Zatím není známo, zda cdk2 v komplexu s cyklinem A fosforyluje NPM1 na místech, kde by způsobila uvolnění NPM1 od centrozomu a tím umožnila duplikaci centrozomu. Přesto je jasné, že komplex cdk2 s cyklinem A a transkripční faktory E2F hrají důležitou úlohu v duplikaci centrozomu a v replikaci DNA (48). Oba druhy komplexů cdk2 (cdk2-cyklin A a cdk2-cyklin E) fosforylují protein retinoblastomu (pRb) a dovolují transkripčním faktorům E2F aktivně řídit expresi genů zahrnutých v duplikaci centrozomů. Maligní buňky jsou však schopné proliferovat i při inhibici cdk2 a vyřazení genu pro cdk2 u myši nebylo letální (52, 53). Cdk2 se proto nepovažuje za vhodný cíl pro terapii nádorových onemocnění.

Dvacet aminokyselinových zbytků proteinu cyklinu E tvoří signál pro umístění v centrozomu (CLS, "centrosomal localization signal") a tento signál umožňuje vstup buněk do fáze S buněčného cyklu nezávisle na cdk2. Uměle nasyntetizovaný signál CLS se váže v centrozomech a brání cyklinu A i cyklinu E ke vstupu do centrozomu (54).

Proteiny Crm1 ("chromosome region maintenance protein 1", exportin 1) a Ran ("Ras-related nuclear protein") se také podílejí na duplikaci centrozomu (55,56). Crm1 je vektor pro export proteinů bohatých na leucin a obsahujících signální sekvenci NES pro přesun proteinu z jádra do cytoplazmy (57-59). Malé množství Ran-GTP je asociováno s centrozomem během buněčného cyklu. Crm1 se váže na Ran-GTP a tato vazba je usnadněna pomocí výměného faktoru pro guanin-obsahující nukleotidy (RCC1) a naopak zeslabena proteinem s afinitou k Ran (RanBP1). Crm1 řídí přesnost duplikace centrozomu a zabraňuje neplánované duplikaci (55). Inaktivace Crm1 pomocí specifického inhibitoru, leptomycinu B nebo působením proteinu HBx viru hepatitidy B má za následek nenormální amplifikaci a multipolární dělicí vřeténka. Podobné důsledky mají změny v Ran a v RanBP1 (60). Přítomnost funkčního motivu NES v nukleofosminu umožňuje proteinům Crm1 a Ran v komplexu regulovat transport NPM1 a umístění NPM1 a tím i duplikaci centrozomu (61). NPM1 může být imunoprecipitován



společně s Crm1 využitím protilátky proti Crm1 a inhibice funkce Crm1 působením leptomycinu B nebo pomocí proteinu HBx viru hepatitidy B vede k uvolnění nukleofosminu z centrozomu a k iniciaci předčasné duplikace centrozomu. Vazba nukleofosminu k Crm1 je řízena fosforylací treoninového zbytku T95 v NPM1.

NPM1 je umístěn v jádru buněk během přechodu buněk z fáze S do fáze G2 buněčného cyklu. NPM1 zde řídí biogenezi ribozomů a proliferaci buněk. NPM1 se váže na mitotické centrozomy po rozpadu jaderné membrány na počátku mitózy. Vazba NPM1 je zprostředkována komplexem Crm1-Ran a zajišťuje prevenci před další duplikací centrozomu. Nově rozdělené buňky v G1 fázi buněčného cyklu obsahují NPM1 navázaný na centrozom. NPM1 je potom fosforylován a uvolní se z centrozomu a umožní duplikaci centrozomu a replikaci DNA.

### Úloha NPM1 v regulaci apoptózy

NPM1 je inhibítozem apoptózy a v tomto odstavci jsou popsány mechanismy, které se podílí na vlivu NPM1 na apoptózu buněk. Během apoptózy klesá množství NPM1 (32,62).

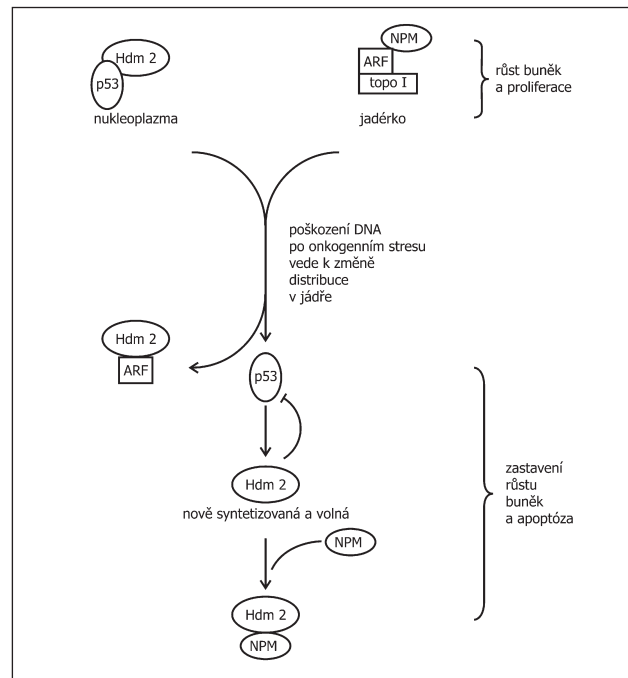
Aktivace nádorového supresoru p53 jako odpověď na poškození DNA slouží normálním buňkám jako prevence před maligním zvratem. NPM1 je důležitým regulátorem p53 a to hraje úlohu v regulaci buněčného cyklu i v regulaci apoptózy. NPM1 se váže na N-konec proteinu p53 a inhibuje jeho transkripční aktivitu. Hladina NPM1 v buňce je rozhodující pro dávku ultrafialového záření, které vede k fosforylaci Ser 15 nádorového supresoru p53. Fosforylace p53 na Ser-15 je rozhodující pro aktivaci funkce p53 během buněčného stresu. Tato fosforylace p53 umožňuje translokaci p53 do mitochondrií a interakci s antiapoptotickými proteiny Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub> a předchází uvolnění cytochromu c a snížení mitochondriálního membránového potenciálu. Předchází i aktivaci kaspáz a štěpení poly(ADP-riboza)polymerázy (PARP). NPM1 tedy rychle odpovídá na poškození DNA a brání předčasné aktivaci p53. NPM1 funguje jako přirozený represor nádorového supresoru p53 a určuje mezní hodnotu UV záření, kdy dojde k aktivaci p53 (63).

Zvýšené množství NPM1 brání apoptóze po transformaci buněk onkogeny hlavně u buněk s nestabilitou genomu (64). Primární buňky s porušeným mechanismem opravy DNA a zvýšenou expresí nukleofosminu a současnou expresí transformujících onkogenů myc a ras nepodléhají apoptóze a senescenci (64).

NPM1 inhibuje také fosforylaci p53 na Ser-15 při hypoxii. Promotor genu *NPM1* obsahuje sekvenci odpovídající na hypoxii a zvýšenou expresi HIF-1 ("hypoxia induced factor -1"). Snížení exprese NPM1 pomocí malé interferující RNA zvyšuje hypoxií indukovanou apoptózu. Naopak zvýšená exprese NPM1 brání apoptóze při hypoxii. Maligní hypoxické buňky vyžadují zvýšenou expresi NPM1 k potlačení aktivace p53 a tím i apoptózy (65). Toto však pouze platí pro buňky obsahující funkční p53.

NPM1 kromě přímé interakce s p53 (32) interaguje s proteiny, které asociují s p53 a regulují jeho stabilitu. Jedná se již o zmíněnou ubikvitinligázu Hdm2 a nádorový supresor ARF ("alternative reading frame"). Ubikvitinligá-

zy (E3) jsou heterogenní skupinou proteinů, které umožňují najít a specificky označit polyubikvitinem proteiny určené k proteolýze v proteazomech. Hdm2 takto označí polyubikvitinem p53 a podílí se na jeho proteolytickém štěpení v proteazomech. ARF je pozitivním regulátorem p53 a jeho pojmenování vychází z alternativního sestřihu odpovídajícího genu, kde druhý exon genu *ARF* je společný pro ARF a pro inhibitor cdk (p16/ink4A) (66). NPM1 v komplexu s ARF drží ARF v jádru buněk a brání mu aktivovat p53. Poškození DNA způsobí přemístění ARF do nukleoplazmy, kde interaguje s Hdm2, podporuje rychlou degradaci Hdm2 a aktivuje p53 (obr. 3).



**Obr.3:** Schema distribuce ARF a Hdm2 před a po poškození DNA např. ultrafialovým zářením. Schema ukazuje úlohu proteinů NPM1 a ARF v regulaci funkce nádorového supresoru p53.

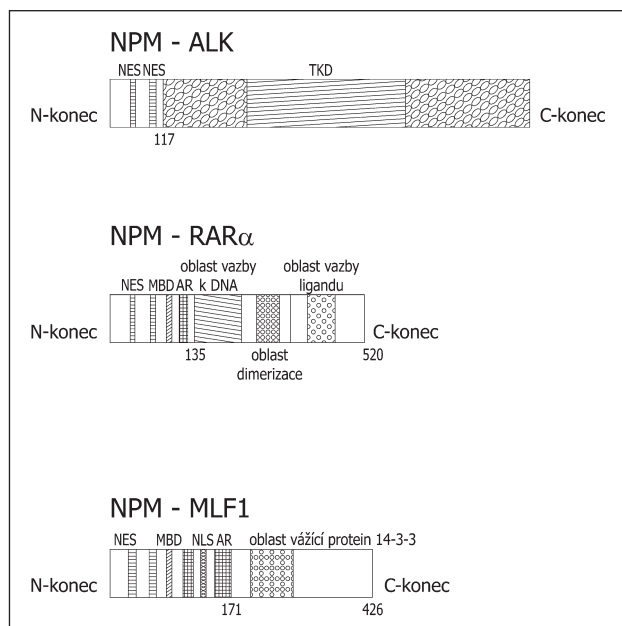
Deoxyribonukleáza, která se aktivuje kaspázou 3 (CAD, "caspase-activated deoxyribonuclease") hraje úlohu ve štěpení chromozomální DNA během apoptózy buněk. CAD je protein o 343 aminokyselinových zbytcích, který obsahuje signál pro umístění v jádře. CAD existuje v komplexu se svým inhibítozem (ICAD). Působením kaspázy 3 dochází ke štěpení ICAD a k aktivaci CAD (67). Komplex NPM1 s fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátem se váže k aktivní CAD a inhibuje štěpení chromozomální DNA během apoptózy (68).

### Chromozomální translokace a mutace genu *NPM1* u lymfomů a leukemií

Gen *NPM1* je translokován u anaplastického velkobuněčného lymfomu a v některých poměrně vzácných případech akutní myeloidní leukemie (AML) (69). Chromozomální přestavbou vznikají fuzní geny a jejich expresí fuzní proteiny NPM-ALK ("anaplastic lymphoma kinase"), NPM-RAR $\alpha$  ("retinoic acid receptor alpha") a NPM-MLF1 ("myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1") (obr.4).

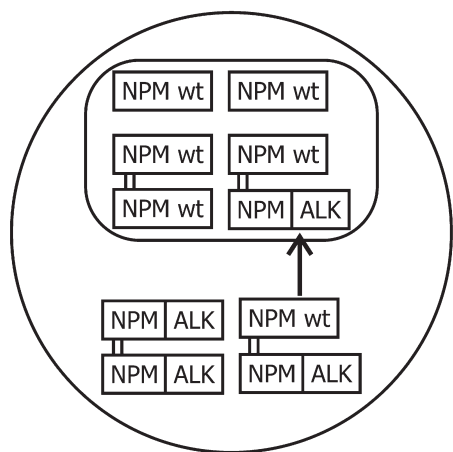
### Chimerní kináza NPM-ALK u anaplastického velkobuněčného lymfomu

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) patří do skupiny ne-Hodgkinských maligních lymfomů (NHL). Ve většině případů zde dochází k chromozomální přestavbě t(2;5)(p23;q35), kde gen *ALK* na chromozomu 2 fúzuje s genem *NPM1* na chromozomu 5 (70,71). Uvedená přestavba však nestačí k vyvolání maligního onemocnění, protože byla nalezena i u nemaligních buněk i když ve velmi malé koncentraci (72). Fúzní protein obsahuje N-koncovou část NPM1 obsahující oligomerizační oblast a celou cytoplazmatickou oblast ALK s aktivitou tyrozinkinázy (obr.4). Protein ALK se normálně nachází



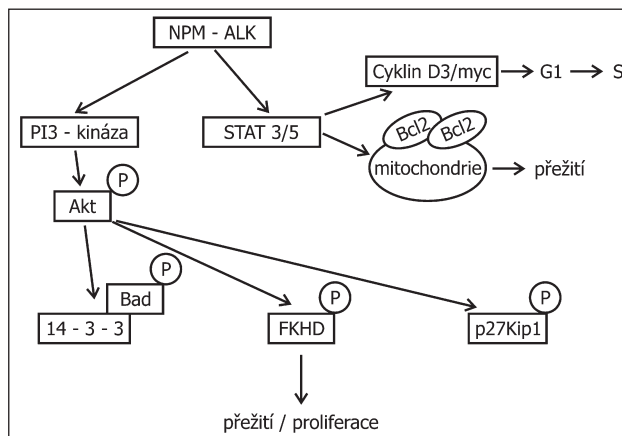
Obr.4: Schematické znázornění jednotlivých funkčních oblastí chimerních proteinů NPM-ALK, NPM-RAR $\alpha$  a NPM-MLF1.

v cytoplazmě buněk, ale fúzní protein NPM-ALK oligomerizuje s divokou formou NPM a putuje do jáderka buněk (obr.5). Za fyziologických podmínek dochází



Obr.5: Umístění divokého typu NPM a fúzního proteinu NPM-ALK v jádře a cytoplazmě buněk anaplastického velkobuněčného lymfomu s chromozomální přestavbou t(2;5)(p23;q35).

k expresi ALK pouze v nervovém systému a u lymfomů z T-buněk a dalších malignit dochází k její expresi právě ve formě fúzních proteinů a to nejen s NPM1. Homodimery fúzního proteinu NPM-ALK, vykazující konstitutivní tyrozinkinázovou aktivitu byly detekovány protilátkou proti N-konci NPM v cytoplazmě (obr.5). NPM1 tedy slouží hlavně pro oligomerizaci fúzního proteinu a pro určení jeho umístění v buňce. Fúzní protein NPM-ALK reguluje přežití buňky a proliferaci přes signální dráhu fosfatidylylinozitol 3-kinázy (PI3K) a proteinkinázy B (AKT), která způsobí fosforylaci transkripčního faktoru FOXO3a, člena lidské rodiny “forkhead (FKHD)” transkripčních faktorů (obr.6)



Obr.6.: Regulace signálních drah fúzním proteinem NPM-ALK s tyrozinkinázovou aktivitou.

(73). Uvedená fosforylace FOXO3a znamená jeho přemístění do cytoplazmy a asociaci s proteinem 14-3-3. FOXO3a ztrácí tak schopnost indukovat expresi řady proapoptotických a buněčný cyklus inhibujících cílových genů (72). Na obr.6 je ukázáno i ovlivnění signální dráhy transkripčních faktorů STAT 3/5 (“signal transducers and activators of transcription”) pomocí fúzního proteinu NPM-ALK. Onkogenní tyrozinkinázová aktivita fúzního proteinu NPM-ALK způsobí fosforylaci proteinkináz ERK 1/2 (“extracellular signal-regulated protein kinase”) a jejich přímého aktivátoru proteinkinázy MEK (“mitogen-induced extracellular kinase”). NPM-ALK tedy aktivuje signální dráhu MEK/ERK a tato signální dráha může být cílem terapeutického zásahu u malignit na nichž se podílí fúzní protein NPM-ALK (74).

Z klinického hlediska je důležité, že stanovení exprese fúzního genu *NPM-ALK* pomocí kvantitativní polymerázové reakce v reálném čase umožňuje stanovit prognózu u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem (75). Experimenty se snížením hladiny exprese fúzního genu *NPM-ALK* využitím mechanismu RNA interference byly již také provedeny na liniích buněk SUDHL-1 a Karpas 299 s chromozomální přestavbou t(2;5)(p23;q35) a pro srovnání i u linií buněk lymfomu bez uvedené přestavby (76). Výsledky ukázaly, že snížení exprese fúzního genu *NPM-ALK* vedlo k poklesu proliferace a ke zvýšené apoptóze u buněk s chromozomální přestavbou t(2;5). Také se zvýšila citlivost těchto buněk na chemoterapeutikum doxorubicin a tak tato metoda použití

malých interferujících RNA (siRNA) je příslibem nové strategie v terapii u těchto lymfomů.

### Fúzní transkripční faktor NPM1-RAR $\alpha$ u akutní promyelocytární leukemie

Chromozomální přestavba genů t(5,17) u akutní promyelocytární leukemie (APL) byla u tří dětských pacientů spojena s fúzí genu *NPM1* s genem *RAR $\alpha$*  (77-79). Fúzní protein NPM1-RAR $\alpha$  interaguje s proteinem NPM1 divokého typu a přemístí ho z jádérka nebo mění jeho funkci v jádérku buněk. Fúzní protein NPM1-RAR $\alpha$  nevykazuje interakci s proteinem promyelocytární leukemie (PML) (80). Fúzní protein NPM1-RAR $\alpha$  vykazuje interakce s korepresory a koaktivátory a ovlivňuje tak transkripci cílových genů kyseliny retinové (81). Fúzní protein NPM1-RAR $\alpha$  zvyšuje u transgenních myší proliferaci myeloidních buněk a tak modeluje myeloproliferativní onemocnění a po delší době vyvolává chorobu podobnou APL s blasty citlivými na kyselinu retinovou (ATRA) (82).

### Chimerní protein NPM-MLF1 u akutní myeloidní leukemie a myelodysplastického syndromu

Chromozomální přestavba genů t(3;5) (q25.1;q34) spojená s AML (nejčastěji typu FAB /French-American-British nomenclature/ M6) a MDS produkuje chimerní gen *NPM-MLF1* a po jeho expresi fúzní protein NPM-MLF1 (83). Fúzní protein NPM-MLF1 obsahuje N-koncovou část proteinu NPM a skoro celý protein MLF1 kromě 16 aminokyselinových zbytků z N-konce (obr.4). Expres MLF-1 mRNA byla nalezena ve varlatech, vaječnicích, svalu, srdci, ledvině a tlustém střevě, ale ne v hematopoetických buňkách. Fúzní protein NPM-MLF1 zřejmě vyvolá expresi MLF1 v hematopoetických buňkách a to vede k myelodysplazii a AML (84). Funkce MLF1 zatím nebyla plně objasněna. MLF1 inhibuje erytroidní diferenciaci indukovanou erytropoetinem (85). MLF1 je umístěn v cytoplazmě buněk, zatím co fúzní protein NPM-MLF1 se vyskytuje v jádře a hlavně v jádérku buněk (86). NPM1 je naopak zčásti přemístěn do cytoplazmy a tím ztrácí normální funkci v jádérku a to též přispívá k leukemogenezi. U NPM<sup>-/-</sup> heterozygotních myší dochází v souhlasu s uvedenými fakty k hematologickému onemocnění připomínajícímu MDS (16).

### Mutace genu pro nukleofosmin u myelodysplastického syndromu a akutní myeloidní leukemie s normálním karyotypem

Mutace genu *NPM1* byly téměř výhradně prokázány v exonu 12 u pacientů s MDS a AML s normálním karyotypem (21-29, 87-91). Normální karyotyp je asi u 40-50% dospělých pacientů s AML. Mutace *NPM1* je příznivým prognostickým faktorem a předpovědí dobré odpovědi na indukční terapii (21-29, 87-91). Mutace *NPM1* způsobí že produkt exprese je umístěn v cytoplazmě místo v jádérku buněk. Imunohistochemická detekce cytoplazmatického NPM1 je tedy předpovědí mutací v exonu 12 genu *NPM1* (92). Přibližně 86% pacientů s cytoplazmatickým NPM1 má normální karyotyp a zbylých 14% vykazuje většinou sekundární chromozomální změny. Mutace

*NPM1* jsou často nalezeny v případech AML, kde je též detekována mutace genu *FLT3* ("FMS-like tyrosine kinase 3"). Protoonkogen *c-fms* je buněčným protějškem transformujícího genu viru vyvolávajícího sarkom u koček ("Susan Mc Donough feline sarcoma virus"). Onkogenní *v-fms* je transmembránový receptor s vnitrobuněčnou tyrozinkinázovou oblastí. Nejčastější mutací genu *FLT3* je duplikace sekvencí exonu 11 a vyjimečně intronu 11 a exonu 12 tohoto genu označovaná ITD ("internal tandem duplication") (23,27). Samotné mutace *NPM1* znamenají pro pacienty lepší prognózu než současný výskyt mutací genu *FLT3* (22). U pacientů s MDS byly mutace *NPM1* nalezeny u 2/38 (5,2%) pacientů (86) a u AML asi u třetiny pacientů. Ojedinelé případy mutací *NPM1* u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) jsou spojeny s přechodem do AML a zřejmě reprezentují časná stadia AML s FAB M4 nebo M5 se značnou monocytární diferenciací (93, 94).

Mutace *NPM1* jsou heterozygotní a alela s divokým typem je zachována. Mutace *NPM1* se vyskytují jen velmi ojedinelé mimo exon 12 a to v exonu 9 (95) a exonu 11 (96). Asi 40 různých forem mutací *NPM1* bylo zatím identifikováno u pacientů s AML a u více než 95% se týkají pozice 960 (97).

Naopak, mutace v exonu 12 genu *NPM1* nebyly nalezeny u karcinomů jater, plic, prsu, tlustého střeva a žaludku (30). Tyto údaje, získané při analýze exonu 12 genu *NPM1* u 467 karcinomů, naznačují, že mutace nukleofosminu nehrají úlohu u solidních nádorů (30).

### Příčina umístění mutovaných forem proteinu NPM1 v cytoplazmě leukemických buněk

Mutace na C-konci NPM1 znamenají často ztrátu tryptofanových zbytků 288 a 290, které jsou nezbytné pro umístění NPM1 v jádérku buněk. Další častou změnou na C-konci NPM1 je vytvoření dalšího motivu NES bohatého na leucinové zbytky. Tento signál pro export NPM1 z jádérka do nukleoplazmy a z jádra do cytoplazmy buněk je další příčinou umístění takto mutovaného NPM1 v cytoplazmě leukemických buněk. Mutované formy NPM1 váží nemutovaný NPM1 a nádorový supresor ARF a způsobí jejich umístění v nukleoplazmě nebo cytoplazmě leukemických buněk (98-100).

### Závěr

NPM1 se chová jako nádorový supresor a snížení množství NPM1 divokého typu může proto přispívat k tvorbě nádoru inaktivací nádorového supresoru ARF. Společný výskyt mutací genu *NPM1* a genu *FLT3*, který byl často nalezen v klinické praxi nasvědčuje mechanismu kooperace obou těchto genetických defektů v leukemogenezi. Cytoplazmatická mutovaná forma NPM1 vystupuje jako dominantně recesivní a způsobí umístění endogenního NPM1 do cytoplazmy. Zatím však nebylo prokázáno, že by se tato mutovaná forma chovala jako onkogen. Onkogenní úloha cytoplazmatické formy NPM1 byla nedávno testována v agaru na primárních myších embryonálních fibroblastech s expresí cytoplazmatické formy NPM1 nebo divokého typu NPM1 v kombinaci s onkogenem E1A adenoviru (101). Pouze cytoplazmatická mutovaná



forma NPM1, ale ne divoká forma NPM1, kooperovala s onkogenem E1A v transformaci myších embryonálních fibroblastů v agaru. Výsledek souhlasí s předpokladem, že mutovaná cytoplazmatická forma NPM1 blokuje funkci nádorového supresoru ARF, indukovaného v odpovědi na působení onkogenu E1A.

Buněčný původ cytoplazmatické mutované formy NPM1 je zatím neznámý. Expres mutované formy NPM1 byla nalezena v myeloidních buňkách, monocytech, erythroidních buňkách a megakaryocytech, ale ne v lymfoidních buňkách. Původ cytoplazmatické mutované formy NPM1 je tedy ve společném prekursoru myeloidních buněk nebo ještě mladším progenitoru bez schopnosti diferenciaci do lymfoidní řady. Toto je v souhlasu s expresním znakem NPMc+ AML, který se vyznačuje zvýšenou expresí genů potřebných pro sebeobnovu kmenových buněk, např. většiny homeobox obsahujících genů (HOX). NPMc+

AML se vyznačují nedetekovatelným antigenem CD34. Je to způsobeno leukemickou transformací nebo původem z CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni (102).

Studium mutací genu *NPM1* přispěje také k lepší klasifikaci AML s normálním karyotypem, kam spadá až 50% případů AML. NPMc+ AML a NPMc+ myeloidní sarkom (103) by měly vytvořit samostatnou skupinu v klasifikaci AML.

Potlačení exprese chimerního genu *NPM-ALK* po chromozomální přestavbě t(2;5) u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem využitím principu RNA interference se zdá na základě pokusů na odpovídajících buněčných liniích nadějnou strategií do budoucnosti při terapii tohoto onemocnění (75).

#### Poděkování

Práce byla podpořena VZ MZ ČR 00023736.

#### Literatura:

- Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 2005; 437(7055): 147-153.
- Okuwaki M, Tsujimoto M, Nagata K. 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* 2002; 13(6): 2016-30.
- Itahana K, Bhat KP, Jin A, et al. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 2003; 12(5): 1151-64.
- Yung BY, Busch H, Chan PK. Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1985; 826(4): 167-173.
- Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(19): 4508-4515.
- Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 2002; 21(40): 6170-74.
- Frehlick LJ, Eirín-López JM, Ausió J. New insights into the nucleophosmin/ nucleoplasm family of nuclear chaperones. *BioEssays* 2007; 29(1): 49-59.
- Shackelford GM, Ganguly A, MacArthur CA. Cloning, expression and nuclear localization of human NPM3, a member of the nucleophosmin/ nucleoplasm family of nuclear chaperones. *BMC Genomics* 2001; 2(1): 8.
- Eirín-López JM, Frehlick LJ, Ausió J. Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/ nucleoplasm family of nuclear chaperones. *Genetics* 2006; 173(4): 1835-50.
- Kang YJ, Olson MO, Busch H. Phosphorylation of acid-soluble proteins in isolated nucleoli of Novikoff hepatoma ascites cells. Effect of divalent cations. *J Biol Chem* 1974; 249(17): 5580-85.
- Prestayko AW, Olson MO, Busch H. Phosphorylation of proteins of ribosomes and nucleolar preribosomal particles in vivo in Novikoff hepatoma ascites cells. *FEBS Lett* 1974; 44(2): 131-135.
- Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(19): 4508-15.
- Weng JJ, Yung BYM. Nucleophosmin/B23 regulates PCNA promoter through YY1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335(3): 826-831.
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, et al. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 2001; 506(3): 272-276.
- Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, et al. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* 2005; 25(17): 7534-45.
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 493-505.
- Tanaka M, Sasaki H, Kino I, et al. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res* 1992; 52(12): 3372-77.
- Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, et al. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol* 1996; 178(1): 48-52.
- Shields LB, Gercel-Taylor C, Yashar CM, et al. Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. *J Soc Gynecol Invest* 1997; 4(6): 298-304.
- Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, et al. Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO; 4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate* 1999; 39(4): 298-304.
- Boissel N, Renneville A, Biggio V, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of *NPM* mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; 106(10): 3618-20.
- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106(12): 3740-46.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352(3): 254-266.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106(12): 3733-39.
- Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, et al. 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* 2005; 106(12): 3747-54.
- Chou W-C, Tang J-L, Lin L-I, et al. *Nucleophosmin* mutations in *de novo* acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 2006; 66(6): 3310-16.
- Grimwade D. *NPM1* mutation in AML: who and why? *Blood* 2006; 108(13): 3965.
- Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: impact on WHO classification. *Blood* 2006; 108(13): 4146-55.
- Falini B, Nicoletti I, Bolli N, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (*NPM1*) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007; 92(4): 519-532.

30. Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ, et al. Absence of nucleophosmin 1 (*NPM1*) gene mutations in common solid cancers. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (APMIS)* 2007; 115(4): 341-346.
31. Hsu CY, Yung BYM. Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncogene* 1998; 16(7): 915-923.
32. Liu WH, Yung BYM. Mortalization of human promyelocytic leukemia HL-60 cells to be more susceptible to sodium butyrate-induced apoptosis and inhibition of telomerase activity by down-regulation of nucleophosmin/B23. *Oncogene* 1998; 17(23): 3055-64.
33. Colombo E, Marine JC, Danovi D, et al. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 2002; 4(7): 529-533.
34. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 2004; 5(5): 465-475.
35. Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prevent* 2006; 30(6): 481-490.
36. Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, et al. Nucleophosmin: A versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci* 2006; 97(10): 963-969.
37. Chan WY, Liu QR, Borjigin J, et al. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 1989; 28(3): 1033-39.
38. Wang D, Umekawa H, Olson MO. Expression and subcellular localization of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res* 1993; 39(1): 33-42.
39. Yung BY, Chan PK. Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochim Biophys Acta* 1987; 925(1): 74-82.
40. Umekawa H, Chang JH, Correia JJ, et al. Nucleolar protein B23: bacterial expression, purification, oligomerization and secondary structures of two isoforms. *Cell Mol Biol Res* 1993; 39(7): 635-645.
41. Chan PK, Aldrich M., Cook RG, et al. Amino acid sequence of protein B23 phosphorylation site. *J Biol Chem.* 1986; 261(30): 1868-72.
42. Negi SS, Olson MOJ. Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J Cell Sci* 2006; 119(17): 3676-85.
43. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 2000; 103(1): 127-140.
44. Zhang H, Shi X, Paddon H, et al. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase I. *J Biol Chem* 2004; 279(34): 35726-34.
45. Tsou M-FB, Stearns T. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* 2006; 442(7105): 947-951.
46. Lingle WL, Salisbury JL. The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol* 2000; 49: 313-329.
47. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(6): 2817-22.
48. Meraldi P, Lukas J, Fry AM, et al. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* 1999; 1(2): 88-93.
49. Hinchcliffe EH, Sluder G. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev* 2001; 15(10): 1167-81.
50. Zatssepina OV, Rousset A, Chan PK, et al. The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J Cell Sci* 1999; 112(4): 455-466.
51. Matsumoto Y, Maller JL. Calcium, calmodulin, and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in *Xenopus* egg extracts. *Science* 2002; 295(5554): 499-502.
52. Tetsu O, McCormick F. Proliferation of cancer cells despite cdk2 inhibition. *Cancer Cell* 2003; 3(3): 233-245.
53. Berthet C, Aleem E, Coppola V, et al. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 2003; 13(20): 1775-85.
54. Matsumoto Y, Maller JL. A centrosomal localization signal in cyclin E required for cdk2-independent S phase entry. *Science* 2004; 306(5697): 885-888.
55. Forgues M, Difilippantonio MJ, Linke SP, et al. Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol* 2003; 23(15): 5282-92.
56. Keryer G, Di Fiore B, Celati C, et al. Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. *Mol Biol Cell* 2003; 14(10): 4260-71.
57. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, et al. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997; 90(6): 1051-60.
58. Stade K, Ford CS, Guthrie C, et al. Exportin (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 1997; 90(6): 1041-50.
59. Arnaoutov A, Azuma Y, Ribbeck K, et al. Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol* 2005; 7(6): 626-632.
60. Di Fiore B., Ciciaarello M., Lavia P. Mitotic functions of Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle* 2004; 3(3): 305-313.
61. Wang W, Budhu A, Forgues M, et al. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* 2005; 7(8): 823-830.
62. Patterson SD, Grossman JS, D'Andrea P, et al. Reduced numatrin/B23/ nucleophosmin labeling in apoptotic Jurkat T-lymphoblasts. *J Biol Chem* 1995; 270(16): 9429-36.
63. Maignel DA, Jones L, Chakravarty D, et al. Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol* 2004; 24(9): 3703-11.
64. Li J, Sejas DP, Burma S, et al. Nucleophosmin suppresses oncogene-induced apoptosis and senescence and enhances oncogenic cooperation in cells with genomic instability. *Carcinogenesis* 2007; 28(6): 1163-70.
65. Li J, Zhang X, Sejas DP, et al. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 41275-79.
66. Gjerset RA. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23) and cancer. *J Mol Histol* 2006; 37(5-7): 239-251.
67. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391(6662): 96-99.
68. Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(9): 918-923.
69. Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002; 99(2): 409-426.
70. Bischof D, Pulford K, Masson DY, et al. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the Non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol* 1997; 17(4): 2312-25.
71. Drexler HG, Gignac SM, von Wasielewski R, et al. Pathobiology of *NPM-ALK* and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia* 2000; 14(9): 1533-59.
72. Maes B, Vanhentenrijk V, Wlodarska I, et al. The *NPM-ALK* and the *AT1C-ALK* fusion genes can be detected in non-neoplastic cells. *Am J Pathol* 2001; 158(6): 2185-93.
73. Gu T-L, Tothova Z, Scheijen B, et al. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood* 2004; 103(12): 4622-29.
74. Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene* 2007; 26(6): 813-821.
75. Li C, Takino H, Eimoto T, et al. Prognostic significance of NPM-ALK vision transcript overexpression in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2007; 20(6): 648-655.
76. Hsu FY, Zhao Y, Anderson WF, et al. Downregulation of NPM-ALK by siRNA causes anaplastic large cell lymphoma growth inhibition and augments the anti cancer effects of chemotherapy in vitro. *Cancer Incest* 2007; 25(4): 240-248.
77. Redner RL, Rush EA, Faas S, et al. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 1996; 87(3): 882-886.
78. Hummel JL, Wells RA, Dube ID, et al. Deregulation of NPM and PLZF in a variant t(5;17) case of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 1999; 18(3): 633-641.
79. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17). Concerted action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood* 2000; 96(4): 1297-308.
80. Rush EA, Schlesinger KW, Watkins SC, et al. The NPM-RAR fusion



- protein associated with the t(5;17) variant of APL does not interact with PML. *Leuk Res* 2006; 30(8): 979-986.
81. Redner RL, Chen JD, Rush EA, et al. The t(5;17) acute promyelocytic leukemia fusion protein NPM-RAR interacts with co-repressor and co-activator proteins and exhibits both positive and negative transcriptional properties. *Blood* 2000; 95(8): 2683-90.
  82. Cheng GX, Zhu XH, Men XQ, et al. Distinct leukemia phenotypes in transgenic mice and different corepressor interactions generated by promyelocytic leukemia variant fusion genes *PLZF-RARα* and *NPM-RARα*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(11): 6318-23.
  83. Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, et al. The t(3;5) (q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, *NPM-MLF1*. *Oncogene* 1996; 12(2): 265-275.
  84. Hitzler JK, Witte DP, Jenkins NA, et al. cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization of Mlf1, murine homologue of a gene involved in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Am J Pathol* 1999; 155(1): 53-59.
  85. Winteringham LN, Kobelke S, Williams JH, et al. Myeloid leukemia factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene* 2004; 23(29): 5105-09.
  86. Falini B, Bigerna B, Pucciarini A, et al. Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia* 2006; 20(2): 368-371.
  87. Zhang Y, Zhang M, Yang L, et al. *NPM1* mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leuk Res* 2007; 31(1): 109-111.
  88. Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005; 106(4): 1419-22.
  89. Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, et al. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(11): 1687-92.
  90. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106(8): 2854-61.
  91. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107(10): 4011-20.
  92. Falini B, Martelli MP, Bolli N, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108(6): 1999-2005.
  93. Caudill JS, Sternberg AJ, Li CY et al. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. *Br J Haematol* 2006; 133(6): 638-641.
  94. Oki Y, Jelinek J, Beran M, et al. Mutations and promoter methylation status of *NPM1* in myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2006; 91(8): 1147-48.
  95. Mariano AR, Colombo E, Luzi L, et al. Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene* 2006; 25(31): 4376-80.
  96. Albiero E, Madeo D, Bolli N, et al. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 *NPM1* mutation. *Leukemia* 2007; 21(5): 1099-103.
  97. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109(3): 874-885.
  98. Falini B, Bolli N, Shan J, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* 2006; 107(11): 4514-23.
  99. den Besten W, Kuo ML, Williams RT, et al. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle* 2005; 4(11): 1593-98.
  100. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, et al. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated *NPM* mutant. *Cancer Res* 2006; 66(6): 3044-50.
  101. Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, et al. Elucidating the oncogenic potential of *NPMc+* in vitro and in vivo. Abstract 12. ASH Annual Meeting Abstracts. *Blood* 2006; 108(11) Pt.1: 8a
  102. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997; 3(12): 1337-45.
  103. Falini B, Lenze D, Hasserjian R et al. Cytoplasmic mutated nucleophosmin (NPM) defines the molecular status of a significant fraction of myeloid sarcomas. *Leukemia* 2007; 21(7): 1566-70.

**Korespondenční adresa:**

Ing. Fuchs Ota  
Ústav hematologie a krevní transfuze  
U Nemocnice I, 128 20 Praha 2  
e-mail: [Ota.Fuchs@uhkt.cz](mailto:Ota.Fuchs@uhkt.cz)  
tel.: 221977313

Došlo / Submitted: 15. 5. 2007  
Přijato / Accepted: 3. 9. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.  
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.  
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.