

# Otkrivanje mutacije eksona 12 NPM1 gena u akutnim mijeloičnim leukemijama

---

**Crnčec, Ilija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2010**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:904093>

*Rights / Prava:* [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Ilija Crnec**

**“Otkrivanje mutacije eksona 12 NPM1 gena u akutnim mijeloidnim leukemijama”**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2010. godina**

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca s Odjela za molekularnu dijagnostiku i genetiku Klinike bolnice Dubrava i suvoditeljice prof. dr. sc. Nade Oršolić sa Zavoda za animalnu fiziologiju, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja diplomirani inženjer, smjer molekularna biologija.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveu ilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matemati ki fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **“Otkrivanje mutacije eksona 12 NPM1 gena u akutnim mijeloi nim leukemijama”**

**Ilija Crnec**

Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matemati ki fakultet, Sveu ilište u Zagrebu

### **SAŽETAK**

Mutacije eksona 12 gena *NPM1* naj eš a su geneti ka aberacija u akutnim mijeloi nim leukemijama s normalnim kariotipom, ine i 50 – 60% slu ajeva. Do sada je identificirano 40-tak tipova mutacija. Fragmentalnom analizom ispitali smo 60 uzoraka primarne i sekundarne akutne mijeloi ne leukemije na ovu mutaciju. Dvanaest pozitivnih uzoraka (20%) nakon druge lan ane reakcije polimerazom direktno smo sekvencirali i utvrdili 4 tipa mutacija – 8 tipa A, 2 tipa D i po 1 tipa H i Nm. Uzorke smo lan anom reakcijom polimerazom ispitali i na postojanje mutacije *FLT3* ITD i utvrdili da se ova mutacija javlja više nego dvostruko eš e u uzorcima pozitivnim na mutaciju eksona 12 gena *NPM1*.

(stranica: 42, slika: 7, tablica: 12, literaturnih navoda: 70, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Klju ne rije i: nukleofozmin, fragmentalna analiza, sekvenciranje, *FLT3* ITD

Voditelj: dr. sc. Rajko Kušec, red. prof.

Suvoditeljica: dr. sc. Nada Oršoli , red. prof.

Ocenitelji: dr. sc. Vlatka Zoldoš, doc.

dr. sc. Domagoj iki , doc.

Rad prihva en: 15. 9. 2010.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

## **“Detection of mutation in exon 12 of the NPM1 gene in acute myelogenous leukemias”**

**Ilija Crnec**

Department for Animal Physiology, Faculty of Science, University of Zagreb

### **ABSTRACT**

Mutations in exon 12 of the *NPM1* gene are the most frequent genetic aberration in acute myelogenous leukemias with a normal karyotype, representing 50 – 60% of the cases. So far around 40 types of mutations have been identified. We screened 60 cases of primary and secondary acute myelogenous leukemia for mutation using Genescan analysis. Twelve samples (20%) proved to be positive so we further examined them by amplifying them with a second polymerase chain reaction and directly sequencing them, detecting 4 types of mutations – 8 type A, 2 type D and H and Nm. We also screened the samples for the *FLT3* ITD mutation, using polymerase chain reaction, determining that this mutation is detectable more than twice as often in samples positive for mutations in exon 12 of the *NPM1* gene.

(pages: 42, figures: 7, tables: 12, references: 70, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: nucleophosmin, Genescan analysis, sequencing, *FLT3* ITD

Supervisor: Dr. Rajko Kušec, Prof.

Co-supervisor: Dr. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: Dr. Vlatka Zoldoš, Asst. Prof.

Dr. Domagoj Šikić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 15<sup>th</sup> September 2010.

## KRATICE

**AML** – akutna mijeloi na leukemija

**ARF** – protein alternativnog okvira itanja (eng. alternative reading frame) – u ljudi p14<sup>ARF</sup> tumor supresor

**CD13** – oznaka za odre eni skup receptora na površini stanice (epitopa) koji su eksprimirani u odre enom stupnju diferencijacije, a puni naziv im je definiran brojem – u ovom slu aju 13 (eng. cluster of differentiation 13)

**CD33** - oznaka za odre eni skup receptora na površini stanice (epitopa) koji su eksprimirani u odre enom stupnju diferencijacije, a puni naziv im je definiran brojem – u ovom slu aju 33 (eng. cluster of differentiation 33)

**CDK2** - kinaza ovisna o ciklinu 2 (eng. cyclin dependent kinase 2)

**CK2** – kazein kinaza 2 (eng. casein kinase 2)

**CRM1** – ime proteina, skra enica od eng. Chromosome Region maintenance protein 1

**DEPC** – dietil pirokarbonat

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid)

**FAB KLASIFIKACIJA** – francusko/ameri ko/britanska (eng. French-American-British) klasifikacija akutnih mijeloi nih leukemija

**FLT3 ITD** – duplikacija dijela gena FMS-u sli nog receptora, tirozin kinaze (klasa III) – (eng. FMS-like tyrosine kinase (III) internal tandem duplication)

**HDM2** – ime proteina, skra enica od eng. Human MDM2 – p53 vezuju a E3-ubikvitin ligaza

**HLA-DR** – ljudski leukocitni antigen DR (eng. human leukocyte antigen DR)

**ITS2** – unutarnji transkribirani razmak 2 (eng. internal transcribed spacer 2) – dio nefunkcionalne RNA u pre-rRNA transkriptima

**MDM2** – ime proteina, skraćenica od eng. Murine Double Minute Gene 2

**mTOR** – skraćenica imena serin/treonin proteinske kinaze (eng. Mammalian target of rapamycin)

**NEK2A** – proteinska kinaza (eng. Never in mitosis A (NIMA) kinase 2)

**NES** – signal za transport iz jezgre (eng. Nuclear export signal)

**NLS** – signal za transport u jezgru (eng. Nuclear localization signal)

**NoLS** – signal za transport u jezgricu (eng. Nucleolar localization signal)

**NPM** – nukleofozmin

**NPMc+ AML** – akutna mijeloi na leukemija s mutacijom u eksonu 12 *NPM1* gena i citoplazmatskom lokalizacijom nukleofozmina

**NPM/ALK** – translokacija i fuzijski protein nukleofozmin/kinaza anaplasti nog limfoma (eng. nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase) - t(2;5)

**NPM/RAR** – translokacija i fuzijski protein nukleofozmin/ receptor retinoi ne kiseline (eng. nucleophosmin/retinoic acid receptor ) - t(5;17)

**NPM/MLF1** – translokacija i fuzijski protein nukleofozmin/faktor mijeloi ne leukemije 1 (eng. nucleophosmin/myelogenous leukemia factor 1) – t(3;5)

**nt** – nukleotid(i)

**PAS** – perjodna kiselina – Schiffov reagens (eng. periodic acid Schiff)

**PCR** – lančana reakcija polimerazom (eng. polymerase chain reaction)

**PLK1** – POLO-u slična kinaza 1 (eng. POLO-like kinase 1)

**PLK2** – POLO-u slična kinaza 2 (eng. POLO-like kinase 2)

**RAN** – ime proteina, skraćena od eng. RAS-related nuclear protein

**RNA** – ribonukleinska kiselina (eng. ribonucleic acid)

**rRNA** – ribosomska ribonukleinska kiselina (eng. ribosomal ribonucleic acid)

**ROCK II KINAZA** – o Rho-u ovisna kinaza II (eng. Rho-dependent kinase II)

**TSC1** – alternativno ime proteina hamartina, skraćena od eng. Tuberous sclerosis 1 protein

# SADRŽAJ

1	UVOD .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1	Akutna mijeloi na leukemija.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1.1	FAB klasifikacija akutnih mijeloi nih leukemija.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2	Nukleofozmin.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.1	Struktura proteina NPM1 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.2	Funkcije nukleofozmina .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2.3	Mutacije eksona 12 gena <i>NPM1</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3	MATERIJALI I METODE .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1	Uzorci, izoliranje ukupne RNA iz periferne krvi i koštane srži, te reverzna transkripcija .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2	Lan ana reakcija polimerazom (PCR 1) i fragmentalna analiza (“gene scan” analiza) eksona 12 gena <i>NPM1</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.1	Lan ana reakcija polimerazom (PCR 1) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.2	Fragmentalna analiza.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3	Lan ana reakcija polimerazom (PCR 2) i odreivanje slijeda nukleotida eksona 12 gena <i>NPM1</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.1	Lan ana reakcija polimerazom (PCR 2) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.2	Odreivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje) .	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4	Ispitivanje na <i>FLT3</i> ITD mutaciju upotrebom lanane reakcije polimerazom	
	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	
3.5	Statističke metode.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4	REZULTATI.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5	RASPRAVA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6	ZAKLJUČAK .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7	LITERATURA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

# 1 UVOD

## 1.1 Akutna mijeloi na leukemija

Leukemija je neoplasti na proliferacija stanica hematopoetskog porijekla nastala iz somatske mutacije u jednoj hematopoetskoj stanici, iji klonovi ine leukemijske stanice. Naj eš e je za pojavu leukemije potrebno više geneti kih promjena u nekoliko koraka (Bain 1990). Transformirana mati na stanica odlikuje se pove anom sposobnoš u samoobnavljanja i povezana je s poreme enom ili odsutnom diferencijacijom (Gilliland i Tallman 2003). Mijeloi ne leukemije nastaju proliferacijom multipotentne mijeloi ne stanice sposobne za diferenciranje u eritroidnu, granulocitnu, monocitnu i megakariocitnu stani nu liniju ili iz mati ne stanice ve odre ene stani ne linije, a naziv su doble prema fenotipskim karakteristikama nakupina stanica u koštanoj srži koje sli e onima nezrelih fagocita (Bain 1990; Gilliland i Tallman 2003). Proliferacija i nakupljanje leukemijskih stanica u koštanoj srži u kona nici vode supresiji normalne hematopoeze i uzrokuju klini ke simptome indikativne za prestanak normalnog rada koštane srži (Gilliland i Tallman 2003).

Leukemiju je kao zasebnu bolest prvi prepoznao Virchow 1845. godine i vrlo je vjerojatno u pitanju bio jedan od kroni nih oblika limfocitne ili mijeloi ne leukemije. Akutni oblik leukemije prvi put opisao je Friedrich 1857. godine. Op enito se smatralo da leukemije imaju limfocitno porijeklo sve dok Naegeli 1900. nije opisao mijeloblast kao prete u neutrofilnih granulocita. Tim otkri em postalo je jasno da mnogi slu ajevi leukemije potje u od mijeloi nih stanica, pa su takvi slu ajevi, kroni ni i akutni, klasificirani kao mijeloi na leukemija. Prvi podtip akutne mijeloi ne leukemije opisan je 1913. godine evidentiranjem slu aja koji je nosio obilježja akutne monocitne leukemije (Gilliland i Tallman 2003).

Akutna mijeloi na leukemija naj eš i je oblik akutne leukemije u odraslih, ine i 80 – 85% svih leukemija u ljudi starijih od 20 godina. U Sjedinjenim Ameri kim Državama javlja se u prosjeku 14 000 novih slu ajeva godišnje (Holland i Frei 2003) s incidencijom od

približno 2,3 oboljela na 100 000 stanovnika. Medijan dobi oboljelih je prema Hollandu i Freiu (2003) 55, dok je prema Gillilandu i Tallmanu (2003) 63 godine. Incidencija bolesti raste sa staroš u i to od 1 slu aja na 100 000 ljudi za mla e od 30 godina do 15 slu ajeva na 100 000 ljudi za starije od 80 godina (Gilliland i Tallman 2003). S druge strane, iako su leukemije naj eš e maligne bolesti u djece, ine i ak 31% svih malignih oboljenja, samo 20% njih odnosi se na akutnu mijeloi nu leukemiju. Kod djece puno je eš a akutna limfocitna leukemija (Holland i Frei 2003).

Uzroci nastanka i potencijalni faktori rizika za nastanak akutne mijeloi ne leukemije još su uvelike nepoznati, no izloženost ioniziraju em zra enju, benzenu ili prijašnje podvrgavanje kemoterapiji u sklopu lije enja malignih ili benignih tumora dokumentirani su kao takvi (Gilliland i Tallman 2003). Razlikujemo *de novo* nastanak akutne mijeloi ne leukemije (primarna AML) za koji se smatra da do razvoja iste naj eš e dolazi iz mati ne stanice odre ene stani ne linije i sekundarnu akutnu mijeloi nu leukemiju nastalu iz mijelodisplasti nog sindroma, aplasti ne anemije, Falconi anemije, te kao posljedicu ve spomenute kemoterapije ili nemalignih poreme aja, gdje, smatra se, do geneti ke abnormalnosti dolazi u multipotentnoj mati noj stanici (Holland i Frei 2003).

Kod pacijenata oboljelih od akutne mijeloi ne leukemije javljaju se simptomi povezani s pancitopenijom, a mogu uklju ivati: op u slabost organizma, laki zamor, infekcije razli itih težina, krvarenje desni, pojavu subkutanih hematoma, krvarenje iz nosa, no no znojenje, menoragiju, rijetko bol u kostima. Naravno da su ovi simptomi prili no op eniti pa se dijagnoza i klasifikacija postavlja na temelju odgovaraju e evaluacije periferne krvi i koštane srži, tj. na temelju morfoloških, citokemijskih, imunofenotipskih, citogeneti kih, a posljednjih desetlje a i molekularnih analiza. Razvojem kemoterapeutske i transplantacijske medicine postiglo se da 80% mlađih i 60% svih pacijenata u e u potpunu remisiju (kod djece rezultati su nešto slabiji), a 15 – 50% njih, ovisno o dobi i nizu drugih faktora, postiže dugotrajno preživljjenje ili potpuno izlje enje (Holland i Frei 2003).

### **1.1.1 FAB klasifikacija akutnih mijeloičnih leukemija**

Prva francusko/američko/britanska klasifikacija (FAB klasifikacija) leukemija objavljena je 1976., nakon dvije godine sastanaka međunarodnog kooperativnog tima sastavljenog s ciljem izrade prihvatljivog sustava klasifikacije ove grupe bolesti (Bain 1990). Otada se redovito modificira kako bi uskladila razlike u opažanja i uklopila nova imunološka i citogenetska otkrića (Holland i Frei 2003), te je do danas ostala najprihvatljivija klasifikacija (Gilliland i Tallman 2003). Oslanja se na identifikaciju stanične linije u inske populacije blasta (nezrelih krvnih stanica) i stupnja njihove diferencijacije. U tu svrhu koriste se citokemijske reakcije s mijeloperoksidazom, specifičnim i nespecifičnim esterazama, Sudan Black B i perjodnom kiselinom – Schiffovim reagensom (PAS) (Gilliland i Tallman 2003). Za postavljanje dijagnoze potrebna je pretraga periferne krvi i koštane srži, te diferencijalno prebrojavanje stanica. Akutna leukemia dijagnosticira se ako:

- a) blasti su barem 30% svih stanica s jezgrom u koštanoj srži, ili
- b) ako koštana srž pokazuje eritroidnu predominaciju (eritroblasti su barem 50% svih stanica s jezgrom), barem 30% neeritroidnih stanica su blasti (limfociti, plazma stanice i makrofazi takođe nisu uključeni), ili
- c) ako postoje morfološke karakteristike hipergranularne promijelocitne leukemije

Daljnji kriterij za dijagnozu akutne *mijeloi ne* leukemije traži da barem 3% blasta promatrano svjetlosnim mikroskopom daje pozitivnu citokemijsku reakciju na mijeloperoksidazu ili Sudan Black B. Manjinski dio slučajeva koji su negativni na ove reakcije, a trebaju biti uključeni u skupinu akutnih mijeloidnih leukemija su:

1. akutna mijeloblasti na leukemia s minimalnim dokazima mijeloi ne diferencijacije
2. neke akutne monoblasti ne leukemia (M5a) s minimalnom maturacijom

3. akutne leukemije kod kojih blasti ne stanice posjeduju markere nezrelih eritroidnih stanica (M6 s minimalnom maturacijom)
4. akutna megakarioblasti na leukemia (M7)
5. akutna bazofilna ili mastocitna leukemia bez maturacije (Bain 1990)

U 5 – 20% slučajeva klasifikacija prema FAB sustavu je teška, a taj problem posebno je est kod leukemia koje su se razvile iz predleukemijskih poremećaja. Tako da, još nisu razvijeni zadovoljavajući i klasifikacijski sustavi za hibridne i bifenotipske leukemia, hipoplastične leukemia, bazofilne leukemia i leukemia primitivnih eritroblasti. No, usprkos toj injenici, FAB sustav još uvek je nezamjenjiv kod usporedbe pacijenata iz različitih studijskih grupa i u pružanju prognostičkih informacija (Gilliland i Tallman 2003). U Tablici 1. dan je pregled akutnih mijeloidnih leukemia prema FAB klasifikaciji.

Tablica 1. Francusko/američko/britanska (FAB) klasifikacija akutnih mijeloičnih leukemija (preuzeto od Gillilanda i Tallmana 2003)

FAB podtip	Morfološke i citokemijske karakteristike	Ustalost %
M0	veliki, agranularni mijeloblasti, ponekad slični limfoblastima akutne limfocitne leukemije FAB podtipa L2; negativni na bojenje mijeloperoksidazom i Sudan Black B; CD13 ili CD33 antigeni na površini stanice	2-3
M1	akutna mijeloblastična leukemija bez maturacije do najmanje promijelocitnog stupnja; veliki, slabo diferencirani mijeloblasti čine 90% ili više neeritroidnih stanica; najmanje 3% mijeloblasta pozitivno je na mijeloperoksidazu	20
M2	akutna mijeloblastična leukemija s maturacijom; između 30% i 89% neeritroidnih stanica su mijeloblasti s obilnom citoplazmom i umjerenom puno ili puno granula; često vidljivi Auerovi štapići; mijeloblasti pozitivni na mijeloperoksidazu	25-30
M3	hipergranularna promijelocitna leukemija; leukemijske stanice odlikuju se obično jakom azurofilnom granulacijom; veličina jezgre uvelike varira; jezgre često imaju 2 režnja ili su oblika bubrega; neke sadrže nakupine Auerovih štapića; leukemijske stanice izrazito pozitivne na mijeloperoksidazu; mikrogranularna varijanta (M3V); obično HLA-DR negativni	8-15
M4	akutna mijelomonocitna leukemija; mijeloblasti, promijelociti, mijelociti i ostali garnulocitni prekursori čine više od 30%, ali manje od 80% neeritroidnih stanica; monocitne stanice čine do 20% neeritroidnih stanica; pozitivne citokemijske reakcije na nespecifičnu esterazu i kloracetat esterazu; moguća prisutnost Auerovih štapića	20-25
M4eo	akutna mijelomonocitna leukemija s eozinofiljom; mijelomonoblasti s citokemijski i morfološki abnormalnim eozinofilima	5
M5	akutna monocitna/monoblastična leukemija; monoblasti, promonociti ili monociti čine 80% ili više svih neeritroidnih stanica; u M5a (akutna monoblastična leukemija), 80% ili više svih monocitnih stanica su monoblasti negativni na mijeloperoksidazu i obično pozitivni na nespecifičnu esterazu; u dobro diferenciranom podtipu M5b (akutna monocitna leukemija), manje od 80% stanica su monoblasti, pozitivna reakcija na nespecifičnu esterazu gubi se primjenom NaF	10
M6	akutna eritroleukemija; više od 50% svih stanica s jezgrom u srži su eritroidne stanice; eritroblasti su obično jako pozitivni na perjodnu kiselinu (PAS); mijeloblasti čine 30% ili više svih neeritroidnih stanica	5
M7	akutna megakarioblastična leukemija; veliki i mali megakarioblasti s visokim nukleocitoplazmatskim omjerom; citoplazma je blijeda i agranularna; standardna citokemijska bojenja ne daju definitivnu dijagnozu; potrebna potvrda dijagnoze pomoću histokemije ultrastruktura i imunofenotipskih analiza	1-2

## *1.2 Nukleofozmin*

Nukleofozmin, poznat i pod nazivima NO38, numatin i B23 (Schmidt-Zachmann i sur. 1987; Feuerstein i sur., 1988) fosfoprotein je koji se u obilnim koli inama nalazi u gustoj fibrilarnoj i granularnoj komponenti jezgrice, gdje stupa u interakciju s ostalim nukleolarnim proteinima poput nukleolina i fibrilarina, (Schmidt-Zachmann i sur. 1987; Herrera i sur. 1995), ali i konstantno prelazi iz jezgrice u nukleoplazmu i citoplazmu (Szebeni i Olson 1999). Pripada nukleoplazminske/nukleofozminske porodici proteina jezgrenih šaperona, ija je struktura evolucijski sa uvana (Eirin-Lopez i sur. 2006). Uzimajući u obzir injenicu da je povezan s receptorski posredovanom indukcijom mitogeneze, te da je porast sinteze ovog proteina rani signal u G<sub>1</sub> fazi koji prethodi sintezi DNA, rano se došlo do zaključka da nukleofozmin ima ulogu u regulaciji stani nog rasta, proliferacije i transformacije (Feuerstein i sur. 1988). Danas je jasno da nukleofozmin sudjeluje u nizu stani nih aktivnosti, obavljujući razne zadeve, te da je mreža njegovih interakcija prilično široka i kompleksna, a njegov esencijalan karakter je nepobitno dokazan (Grisendi i sur. 2006).

Zanimanje za ovaj protein uglavnom je potaknuto spoznajom da je nukleofozmin direktno upleten u nastanak i razvoj solidnih tumora različitog histološkog porijekla koji se odlikuju povećanom ekspresijom ovog proteina (Bernard i sur. 2003; Nozawa i sur. 1996) – predložen je kao marker za rak želuca, debelog crijeva, jajnika i prostate (Grisendi i sur. 2006). Nukleofozmin je također prepoznat kao faktor u nastanku hematoloških malignih bolesti kod kojih je genski lokus NPM-a dio translokacija koje u koncu nici vode stvaranju onkogenih fuzijskih proteina. Neki od tih fuzijskih proteina su NPM/ALK – t(2;5) u anaplastičnom limfomu velikih stanica, NPM/RAR – t(5;17) u akutnoj promijelocitnoj leukemiji, te NPM/MLF1 – t(3;5) u mijelodisplastičnom sindromu i svim podtipovima akutne mijeloične leukemije, a najčešće M6 (Falini i sur. 2007). Falini i suradnici (2005) prvi su puta objavili i dokaze da veliku skupinu akutnih mijeloičnih leukemija bez citogenetskih abnormalnosti, tj. normalnog kariotipa imaju ajevi kod kojih je vidljiv gotovo isključivo citoplazmatski smještaj nukleofozmina jer je došlo do mutacije u eksonu

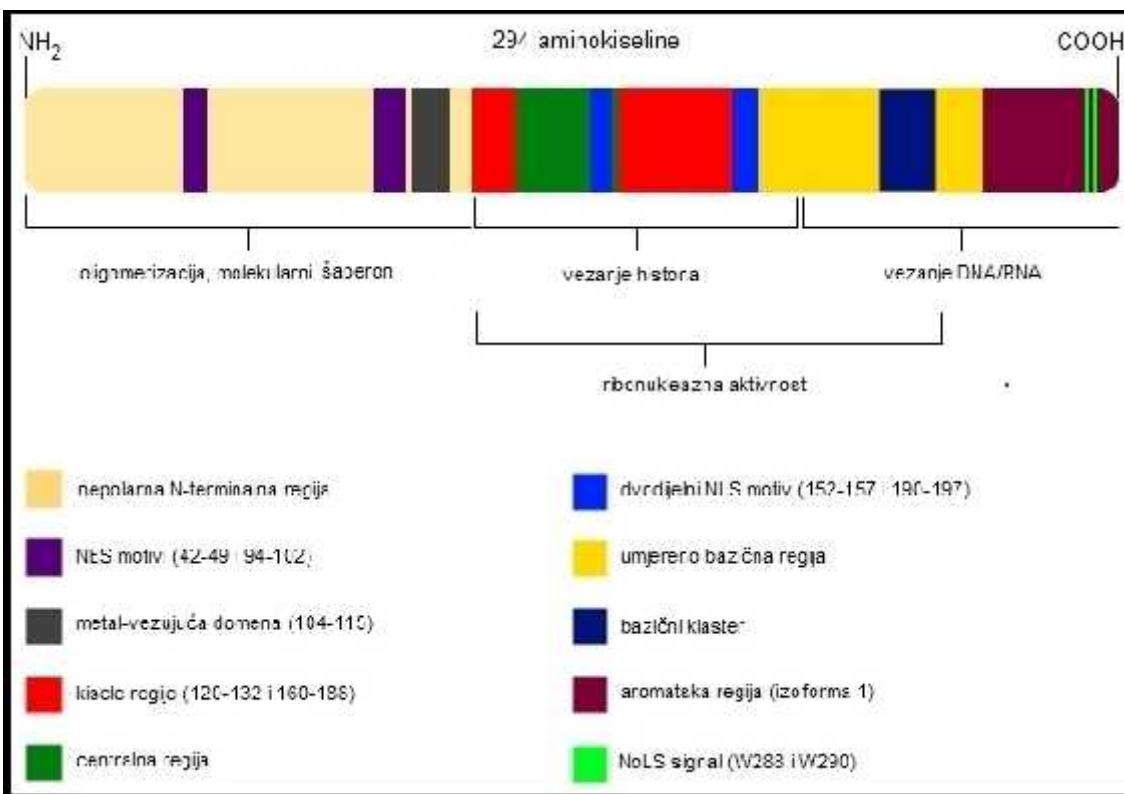
12 gena *NPM1*, te da je on mutiran u otprilike trećine pacijenata s *de novo* (primarnom) akutnom mijeloidnom leukemijom i 60% onih s normalnim kariotipom.

Daljnjim istraživanjima došlo se do indicija da nukleofozmin pripada novoj skupini proteina koji mogu imati onkogene i tumor-supresorske funkcije, ovisno o njihovoj količini i razini ekspresije, te substanci noj distribuciji (Grisendi i sur. 2006).

### **1.2.1 Struktura proteina NPM1**

Gen koji kodira za nukleofozmin nalazi se na dužem kraku petog kromosoma, pozicija 5q35 ljudskog genoma. Ukupno je veličina 23 kilobaze, od čega većina intronu (NCBI 2010e) i ima 12 eksona. Eksoni su veličine od 58 (ekson 7) do 358 parova baza (ekson 12). Mjesto inicijacije transkripcije nalazi se 96 parova baza uzvodno od prvog ATG, TATA box na poziciji -25 nt, a GC box na -66 nt promotorske regije. Kompjuterska analiza slijeda prepoznala je i četiri potencijalna *cis* elementa uzvodno od promotorske regije (Chan i sur. 1997). Alternativnim izrezivanjem iz ovog gena dobivaju se tri transkripta različite dužine koji se zatim translatiraju u tri poznate izoforme NPM-a, ponekad nazivane B23.1, B23.2 i B23.3. Prvi transkript (NM\_002520.6) koji kodira za dominantnu izoformu (Falini i sur. 2007b) dugačak je 1449 nukleotida, sastoji se od eksona 1-9, i 11-12, te se translatira u protein od 294 aminokiselina, izračunate mase od 32,4 kDa i pI 5,1 (NP\_002511.1) (NCBI 2010a; NCBI 2010c). Drugi transkript (NM\_199185.3) dugačak je 1362 nukleotida i, sastoji se od eksona 1-7, 9 i 11-12, a translatira se u protein od 265 aminokiselina (NP\_954654.1) mase 29,3 kDa (NCBI 2010b; NCBI 2010f). Treći transkript (NM\_001037738.2) najkratči je, sadrži 1347 nukleotida, sastoji se od eksona 1-10 i translatira se u protein od 259 aminokiselina (NP\_001032827.1) mase 28,3 kDa (NCBI 2010g; NCBI 2010d).

Kao što je vidljivo dominantna izoforma u svim tkivima je izoforma 1, paemo njezinu strukturu i pobliže opisati. Iz slike 1. vidljivo je da se NPM sastoji od niza domena koje se djelomično preklapaju i obavljaju niz biokemijskih funkcija. N-terminalni dio bogat je hidrofobnim, nepolarnim aminokiselinama i odgovoran je za oligomerizacijske, a zajedno s kiselim regijama (120-132 i 160-188), koje bi moglo biti mjesto vezivanja za bazi ne



Slika 1. Funkcionalne domene i motivi divljeg tipa NPM1 (izoforma 1): Počevši od N-terminalne strane, protein se sastoji od: nepolarne regije važne za oligomerizaciju i aktivnost molekularnog šaperona; ovdje se nalaze i 2 NES motiva – signali za izlazak iz jezgre (aminokiselinski ostaci 42-49 i 94-102) i metal vezujuća domena (aminokiselinski ostaci 104-115); dvije kisele regije (aminokiselinski ostaci 120-132 i 160-188) koje su zajedno s centralnom regijom i dvodijeljnim NLS motivom – signali za ulazak u jezgru (aminokiselinski ostaci 152-157 i 190-197) važne za vezanje i transport histona, a s većim dijelom umjereno bazične regije u kojoj se nalazi bazični klaster i za ribonukleaznu aktivnost; umjereno bazična regija zajedno s aromatskom regijom svojstvenom izoformi 1 stvara domenu za vezanje nukleinskih kiselina; i na C-terminalnom kraju NoLS signal – signal za ulazak u jezgricu (W288 i W290). Shema je izrađena prema podacima koje su izložili Wang i sur. 1994; Hingorani i sur. 2000; Okuwaki i sur. 2001; Grisendi i sur.

ribosomske proteine, i za karakteristike molekularnog šaperona (Hingorani i sur. 2000). ak 95% nukleofozmina u fiziološkim uvjetima postoji kao pentamer, a interakcijama dvaju pentamera i kao dekamer (Lee i sur. 2007; Grisendi i sur. 2006). Ovdje se nalazi metal vezujuća domena (Falini i sur. 2007a) i 2 funkcionalna NES (eng. nuclear export signal) motiva (42-49 i 94-102) – slijedovi koji omogu uju transport ovog proteina iz jezgre. (Wang i sur. 2005; Yu i sur. 2006; Falini i sur. 2007a) Pri tome treba naglasiti da su u prvom motivu od iznimne važnosti leucini na pozicijama 42 i 44, a i drugi motiv predstavlja standardni NES signal – hidrofobnu regiju bogatu leucinima ( $IxxPxxLxL$  – gdje x predstavlja bilo koju aminokiselinu) (Wang i sur. 2005; Yu i sur. 2006). Centralni dio molekule izme u 2 kisele regije, presudne za vezivanje histona (Szebeni i Olson 1999), u suradnji s C-terminalnim dijelom izvršava endoribonukleaznu aktivnost (Wang i sur. 1994).

U središnjem dijelu molekule nalazi se i dvodijelni NLS (eng. nuclear localization signal) motiv (152-157 i 190-197) – signal potreban za transport proteina u jezgru (Falini i sur. 2007a). C-polovica molekule prije posljednjih 35 aminokiselina važna je regija s ulogom u heterodimerizaciji NPM-a s ostalim proteinima (Hingorani i sur. 2000). C-terminalni dio molekule neto je pozitivno nabijen, a ta je odlika uz injenicu da se u ovom dijelu molekule NPM sastoji od bazi nog klastera i umjereno bazi nih aminokiselina me u kojima su raspršene aromatske aminokiseline (što je zajedni ko svim RNA vezuju im proteinima, iako je homologija slijeda izme u nukleofozmina i ostalih vrlo mala) vjerojatno odgovorna za vezivanje DNA odnosno RNA (Wang i sur. 1994). Na krajnjem C-terminalnom dijelu izoforme 1 nukleofozmina nalazi se aromatska regija jedinstvena za ovu izoformu unutar koje je i NoLS (eng. nucleolar localization signal) signal za transport u jezgricu. Radi se o triptofanima na pozicijama 288 i 290 do ije zamjene drugim aminokiselinama upravo i dolazi prilikom mutacije u eksonu 12 (Nishimura i sur. 2002).

Izoforma 3 nalazi se u malim koli inama u svim tkivima, a uglavnom se smješta u nukleoplazmi. Ovoj krnjoj izoformi od 259 aminokiselina nedostaje posljednjih 35 aminokiselina izoforme 1, tj. aromatska regija i signal za ulazak u jezgricu (Hingorani i sur. 2000), a ribonukleazna aktivnost joj je pet puta slabija (Herrera i sur. 1995). S obzirom da je N-terminalni dio molekule u ovoj, a i u izoformi 2 o uvan, za pretpostaviti je da imaju sposobnost oligomerizacije. O ulogama i funkcijama izoforme 2 malo je informacija. (Falini i sur. 2007b)

### **1.2.2 Funkcije nukleofozmina**

Nukleofozmin je multifunkcionalan protein koji svojim prelaženjem izme u stani nih odjeljaka sudjeluje u raznim stani nim procesima. Ti procesi uklju uju transport preribosomskih podjedinica i biogenezu ribosoma, odgovore na stani ni stres poput izloženosti ultraljubi astom (UV) zra enju, hipoksiji, embrionalni razvoj, održavanje genomske stabilnosti kontrolom stani ne ploidnosti, sudjelovanje u procesima popravka DNA i regulaciju transkripcije DNA putem modulacije kondenzacije i dekondenzacije

kromatina. NPM je tako er uklju en u regulaciju aktivnosti i stabilnosti tumor supresora poput p14<sup>ARF</sup> i p53 (Grisendi i sur. 2006).

Prva od niza prepoznatih funkcija NPM-a bila je ona u biogenezi ribosoma. Ve sama injenica da se nukleofozmin u najve oj mjeri nalazi u granularnoj komponenti jezgrice, mjestu kasnije faze biogeneze ribosoma dala je naslutiti da je NPM uklju en u ovaj proces (Chang i Olson 1990). Kasnije je utvr eno da NPM svakako ima ulogu u i utjecaja na stani ni rast i proliferaciju. NPM može vezati DNA i RNA molekule te destabilizirati njihove zavojnice (Wang i sur. 1994), a veže se s ve im afinitetom na jednolan ane nukleinske kiseline. Fosfodiesteraza je i odgovoran je za endonukleazno izrezivanja pre-rRNA u *in vitro* uvjetima. Preferira izrezivanje u ITS2 regiji 250 nukleotida nizvodno od 3' kraja pre-5,8S rRNA. Iako ne pokazuje baznu specifi nost, enzimatska aktivnost ovisi o konformaciji RNA i odre enom slijedu baza (Rajesh i Olson 1998). Posreduje u transportu ribosomskog proteina L5 iz jezgre, kroz CRM1 – ovisan mehanizam, a vezan je i na 40S podjedinicu ribosoma, s kojom ostaje vezan i u citoplazmi, pa postoji mogu nost da izvršava još neku ulogu osim samog prijenosa. (Yu i sur. 2006). Isto tako stabilizira i lokalizira ribosomalni protein S9 u jezgrici (Lindström i Zhang 2008). Dokazana je i veza izme u TSC1/mTOR signalnog puta, koji barem djelomi no regulira stani ni rast koordiniraju i biosintezu proteina, i prijenosa ribosomalnih podjedinica iz jezgre u citoplazmu koji vrši nukleofozmin, te razine sinteze proteina i stani nog rasta. Naime, indukcija nukleofozmina ovisi o mTOR-u, te prilikom ablacji *TSC1* koji je jaki inhibitor *mTOR*-a, dolazi do pove ane razine nukleofozmina u stanici, putem translacije ve postoje ih NPM mRNA, što rezultira ve im brojem aktivno translatiraju ih ribosoma u citoplazmi, višom razinom sinteze proteina i proliferacijom stanice. Svi ovi procesi ovise o aktivnosti nukleofozmina kao molekule koja posreduje u transportu molekula iz jezgre u citoplazmu (Pelletier i sur. 2007).

Sinteza ribosoma u jezgrici složen je proces koji se odvija pri visokim koncentracijama makromolekula, pri emu proteini nailaze na potencijalne probleme denaturacije, agregacije i imobilizacije (Szebeni i sur. 2003). Biološki sustavi ove probleme rješavaju djelovanjem molekularnih šaperona, a jedan od njih je i nukleofozmin. NPM se u *in vitro* uvjetima veže na proteine koji posjeduju NLS signal, transportiraju i ih,

sprje avaju i agregaciju, te ih štiti tijekom termalne denaturacije. Poput svih molekularnih šaperona ve im afinitetom veže se na denaturirane proteine, potpomaže njihovo pravilno smatanje, olakšava renaturaciju kemijski denaturiranih proteina i sveukupno poveća mobilnost svojih supstrata (Szebeni i Olson 1999). Kod regulacije šaperonske aktivnosti ulogu igra fosforilacija NPM-a od strane kazein kinaze II (CK2) na poziciji serin 125 unutar prve kisele regije koja promiče disocijaciju NPM-a i supstrata. Fosforilacijska aktivnost CK2 dva do tri puta je jača u prisutnosti vezanog supstrata na NPM, a događa se tijekom interfaze i vjerojatno je mehanizam regulacije aktivnosti NPM-a (Szebeni i sur. 2003).

Nukleofozmin je i histonski šaperon. S najvećim afinitetom veže se na H3, a uz njega veže i H2B i H4 posredujući u formaciji nukleosoma i dekondenzaciji kromatina (Okuwaki i sur. 2001). Sama interakcija između NPM-a i histona nije dovoljna za uspostavu šaperonske aktivnosti. Izgleda da je za povećanu sposobnost transfera histona potrebna acetilacija kako NPM-a tako i histona, nakon koje NPM pokazuje veću afinitet za histone i remeti strukturu nukleosoma što u koncu nici vodi do pojačane transkripcije (Swaminathan i sur. 2005).

Nukleofozmin održava genomsku stabilnost stanice putem kontrole popravka DNA i duplikacije centrosoma. Podaci sugeriraju da je povećanje ekspresije NPM-a u UV tretiranim stanicama rani odgovor na oštećenje DNA, te da on sprječava prvu aktivaciju p53 (Maiguel i sur. 2004) i pojačava transkripcijsku aktivnost elemenata uključujućih u popravak DNA (Wu i sur. 2002). Tijekom interfaze, nukleofozmin je vezan specifično na neudvostručene centrosome. Sredinom G<sub>1</sub> faze CDK2/ciklin E kompleks fosforilira ga na poziciji treonin 95 (Falini i sur. 2007a) i 199 (Okuda i sur. 2000; Tokuyama i sur. 2001), a PLK2 na poziciji serin 4 u kasnoj G<sub>1</sub>/S fazi (Krause i Hoffmann 2010) čime dolazi do disocijacije NPM-a s centrosoma koji se potom udvostruči. Kroz S fazu stanice NPM ne veže se na duplicirani centrosom (Okuda i sur. 2000; Tokuyama i sur. 2001), već se to događa u mitozi nakon raspada jekrinskih membrane posredovanjem PLK1 i NEK2A koji ga opet fosforiliraju na poziciji serin 4. Ovom reasocijacijom onemogućava se hiperamplifikacija centrosoma, osigurava se da je amplifikacija centrosoma uskladjena sa udvostručenjem DNA, te da svaka stanica u prilikom citokineze dobije po jednu kopiju centrosoma (Okuda i sur. 2000; Zhang i sur. 2004). Ma i suradnici (2006) predložili su i da

bi efektorska molekula u CDK2/ciklin E – NPM regulatornom putu duplikacije centrosoma mogla biti ROCK II kinaza, ija se aktivnost poja ava vezanjem s fosforiliranim oblikom nukleofozmina i poti e udvostru enje centrosoma. Treba naglasiti da se, iako su provedene studije vrlo elegantne u predlaganju uloge koju fosforilacija treonina 199 ima u kontroli interakcija NPM-a i duplikaciji centrosoma, s predloženim mehanizmom ne slažu Brady i suradnici (2009) ije istraživanje pokazuje da fosforilacija ne igra ulogu u napretku stani nog ciklusa, ve sveukupna razina stani nog nukleofozmina. Još jedan mehanizam kojim bi NPM mogao regulirati genomsu stabilnost uzima u obzir razne studije koje indiciraju da stani ne komponente uklju ene u nukleocitoplazmatski transport, neovisno o toj funkciji, igraju važnu ulogu i u regulaciji duplikacije centrosoma (Grisendi i sur. 2006). Kao supstrat jedne takve mreže, RAN-CRM1, predložen je NPM koji bi u interakciju s centrosomom stupio preko svog NES motiva uz posredstvo CRM1. Na taj na in bi RAN-CRM1 kompleks poticao lokalno oboga enje centrosoma NPM-om i sprije io reduplikaciju centrosoma. Ova interakcija RAN-CRM1 mreže i NPM-a mogla bi biti negativno regulirana fosforilacijom nukleofozminskog serina na poziciji 95. Predloženi mehanizam djelovanja RAN-CRM1-NPM1 kompleksa prepoznaće NPM kao kontrolnu to ku – po tom mehanizmu: za vrijeme stani ne progresije iz S u G<sub>2</sub> fazu, ve i dio NPM nalazi se u jezgrici, gdje uglavnom funkcionira kao regulator biogeneze ribosoma i stani nog rasta. Nakon raspada jezgrine membrane i po etka mitoze RAN-CRM1 kompleks služi kao „pristanište“ za NPM kako bi osigurao da se NPM reasocira s centrosomom u pravo vrijeme i sprije i reduplikaciju. Nakon citokineze stanice k eri sadrže centrosome s vezanim NPM-om do sredine G<sub>1</sub> faze kada dolazi do fosforilacije od strane CDK2/ciklin E i ciklus kre e iznova (Wang i sur. 2005; Budhu i Wang 2005 ; Grisendi i sur. 2006).

Razina nukleofozmina ima funkcionalnu ulogu u kontroli stani ne apoptoze i odgovoru na stres i onkogene stimulanse. Svojom lokalizacijom i razinom ekspresije nukleofozmin regulira aktivaciju i stabilizaciju p53 tumor supresora (Colombo i sur. 2002). Integritet jezgrice, te stabilnost NPM-a i p53 funkcionalno su povezane. Prilikom npr. UV – induciranoj stani nog ošte enja, hipoksije ili primjenom citotoksika NPM naglo prelazi iz jezgrice u nukleoplazmu i stupa u interakciju s p53 i HDM2/MDM2 (negativni regulator p53). Pri tome se veže na HDM2/MDM2 inhibiraju i njegovu funkciju E3-ubikvitin ligaze,

sprje ava degradaciju ime omogu uje nakupljanje p53 u ve im koli inama i poti e p53-ovisno zaustavljanje stani nog ciklusa (Kurki i sur. 2004; Maiguel i sur. 2004).

Uz stabiliziranje p53, nukleofozmin pridonosi i stabilizaciji p14<sup>ARF</sup>/p19<sup>ARF</sup> tumor supresora. NPM i ARF koegzistiraju u jezgrici, stvaraju i zajedno s ostalim proteinima komplekse velike molekulske mase (Bertwistle i sur. 2004). NPM usporava degradaciju ARF-a i održava bazalnu razinu ovog proteina, vjerojatno zato što je ARF samo u kompleksima s NPM-om sposoban poprimiti stabilan strukturirani oblik (Kuo i sur. 2004), ime izbjegava proteasomalnu razgradnju kojoj podliježu nestrukturirani proteini. Funkcionalna zna ajnost interakcija izme u ova dva proteina još uvijek je predmet istraživanja i rasprava. Dosadašnja istraživanja ukazuju da; kao odgovor na hiperproliferativne signale, dolazi do stvaranja ve e koli ine ARF tumor supresora, posljedi no zadržavanja NPM-a unutar jezgrice, ime se sprje ava njegovo izmjenjivanje izme u stani nih odjeljaka, dovode i do zaustavljanja stani nog ciklusa na p53 – neovisan na in (Brady i sur. 2004) i poticanja degradacije NPM-a poliubikvitinacijom (Itahana i sur. 2003); ARF-NPM kompleksi odjeljuju HDM2/MDM2 u jezgricu ime aktiviraju p53 u nukleoplazmi (Zhang 2004); NPM odjeljuje ARF u jezgricu, ime sprje ava njegovu interakciju s HDM2/MDM2, te p53 aktivaciju (Korgaonkar i sur. 2005). Pod uvjetima stani nog stresa NPM i ARF relokализiraju u nukleoplazmu gdje dolazi do kompeticije izme u HDM2/MDM2 i NPM-a za vezanje ARF-a što uzrokuje stvaranje ARF-HDM2/MDM2 i NPM-HDM2/MDM2 binarnih kompleksa koji izrazito stimuliraju p53 (Lee i sur. 2005). Iz navedenog je vidljivo da ARF putem NPM-a izvršava svoju ulogu tumor supresora na 2 na ina i u 2 razli ita stani na odjeljka – u jezgrici preko NPM-a ima direktni pristup rRNA i procesu njezinog stvaranja koji ometa na p53-neovisan na in sprje avaju i transport rRNA (Sugimoto i sur. 2003), a u nukleoplazmi regulira p53 interakcijom s NPM-om, HDM2/MDM2 i drugim proteinima.

### **1.2.3 Mutacije eksona 12 gena *NPM1***

Izuzmu li se 2 slu aja kod kojih je do mutacije došlo u eksonima 9 i 11, mutacije gena *NPM1* nalaze se isklju ivo u eksonu 12. Do danas je prepoznato otprilike 40 razli itih

tipova, od kojih se više od 95% nalazi na poziciji 1109 nukleotida referentnog slijeda (NM\_002520.6) (Falini i sur. 2007a). Kod naj eš e, A mutacije, dolazi do duplikacije TCTG tetranukleotida na pozicijama 1105 – 1108 nukleotida. Ova mutacija javlja se u 75% do 80% slu ajeva. Od drugih tipova svakako treba izdvojiti tip B, gdje se javlja insercija od 4 nukleotida, CATG, na poziciji 1109, a opažen je u oko 10% slu ajeva, te tip D kod kojeg tako er postoji insercija od 4 nukleotida, CCTG, na istoj poziciji. Ostali tipovi javljaju se u iznimno malim postocima, esto i ispod 1%. Mutacije gena *NPM1* su heterozigotne, što zna i da zadržavaju alel divljeg tipa i uglavnom su stabilne (Falini i sur. 2007b).

Bez obzira na tip sve mutacije uzrokuju promjene C-terminalnog kraja proteina koje uklju uju gubitak jednog ili oba NoLS signala, tj. triptofana na pozicijama 288 i 290 i stvaranje novog NES motiva - **L-xxx-V-xx-V-x-L** (x je bilo koja aminokiselina) - što dovodi do aberantne citoplazmatske lokalizacije mutacijskog tipa proteina (Nishimura i sur. 2002; Nakagawa i sur. 2005). U 15 tipova mutacija triptofan na poziciji 288 ostaje nepromijenjen, ali valin na drugoj poziciji NES signala biva zamijenjen leucinom, fenilalaninom, cisteinom ili metioninom. Prepostavlja se da je ta zamjena posljedica „potrebe“ da se uravnoteži djelovanje preostalog triptofana kao signala za transport u jezgricu (Falini i sur. 2006). Pregled svih do sada identificiranih mutacija u eksonu 12 gena *NPM1* u pacijenata oboljelih od akutne mijeloi ne leukemije nalazi se u Tablici 2.

**Tablica 2. Pregled svih do sada identificiranih mutacija u eksonu 12 gena *NPM1* kod pacijenata oboljelih od akutne mijeloične leukemije (preuzeto iz Falini i sur. 2007b)**

eng. wild type – divlji tip, eng. mutation – mutacija; crvenom bojom označeni su insertirani nukleotidi; zeleno – NES motivi bogati leucinom; ljubičasto – triptofanski aminokiselinski ostaci; L, leucin; C, cistein; V, valin; M, metionin; F, fenilalanin. Mutacije A do F prve su prepoznali Falini i sur. 2005. Mutacije E do H označavaju mutacije prepoznate kod AML u djece (Cazzaniga i sur. 2005). Mutacije J do Q naknadno su prepoznali Falini i sur. 2005. Mutacije Gm do Qm identificirane su iz protokola 99 njemačke AML kooperativne grupe (Schnittger i sur. 2005). Mutacije 1, 3, 4, 6, 7, 12, 13, 10, 14 su prema Döhneru i sur. 2005. Mutacija I<sup>\*</sup> je prema Verhaaku i sur., 2005. <sup>†</sup>Mutacije G, H, I i J su prema Suzuki i sur. 2005.

## **2 CILJ ISTRAŽIVANJA**

Akutna mijeloi na leukemija naj eš i je oblik leukemije koji se javlja u odraslih ljudi (Holland i Frei 2003). Izlje iva je u otprilike 30% slu ajeva. Na temelju citogeneti kih analiza oboljeli se svrstavaju u razli ite prognosti ke skupine. Naj eš e kromosomske preuredbe u akutnoj mijeloi noj leukemiji su: t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13;q22) i t(9;11)(p21-22;q23). Zajedno sa injavaju otprilike 40% slu ajeva. Ostale kromosomske abnormalnosti ine svega 10% akutnih mijeloi nih leukemija. Preostalih 50% slu ajeva normalnog su kariotipa, ili rje e, imaju neke nasumi ne kromosomske aberacije, te geneti ku podlogu njihove bolesti tek treba utvrditi (Alcalay i sur. 2005).

Kasnih 1980-tih Falini i suradnici, žele i ispitati može li se substani na lokalizacija nukleofozmina koristiti u dijagnosti ke svrhe, stvorili su antitijela za epitope NPM proteina koji su bili otporni na fiksativ, kako bi istražili substani nu ekspresiju NPM-a i fuzijskog proteina NPM - ALK u anaplasti nom limfomu velikih stanica i usporedili je s onom normalnih tkiva. Uo ili su da se nukleofozmin, zbog toga jer je dio kimeri nog proteina, nalazi u citoplazmi umjesto u jezgrici i pretpostavili da bi ova imunohistokemijska metoda mogla pružiti jednostavan na in rutinskog pretraživanja potencijalnih promjena u genu *NPM1*. Uskoro su je primjenili na niz ljudskih tumora uklju uju i akutne mijeloi ne leukemije. 1999. prvi put su primjetili slu ajeve akutne mijeloi ne leukemije s citoplazmatskom lokalizacijom nukleofozmina, ali normalnog kariotipa, te su ih nazvali NPMc+ AML (Falini i sur. 2007b). U studiji objavljenoj 2005. godine Falini i suradnici otkrili su da ak 35% svih *de novo* slu ajeva AML i 50 – 60% svih slu ajeva AML normalnog kariotipa nosi citoplazmatski lokaliziran NPM, te da je aberantni smještaj ovog proteina posljedica mutacije u eksonu 12 gena *NPM1*. U istoj studiji identificirali su prvih 6 tipova (A-F) mutacija.

Cilj našeg istraživanja bio je:

1. Upotrebom fragmentalne analize cDNA, utvrditi postoje li uzorci s mutacijom u eksonu 12 gena *NPM1* me u ukupno sakupljenim uzorcima akutnih mijeloi nih leukemija.
2. Utvrditi koliki je postotak mutiranih uzoraka me u svim akutnim mijeloi nim leukemijama, a koliki je njihov postotak me u slu ajevima primarne akutne mijeloi ne leukemije.
3. Nakon probira, sekvenciranjem odrediti o kojem se tipu mutacije radi.
4. Utvrditi kojom se u estaloš u javlja neki od tipova mutacija.
5. U kona nici cilj nam je bio utvrditi i postoji li statisti ki zna ajna razlika u pojavnosti mutacije *FLT3* ITD izme u populacije uzoraka koji su pozitivni na mutaciju eksona 12 gena *NPM1* i populacije uzoraka koji ne sadrže ovu mutaciju.

### **3 MATERIJALI I METODE**

#### *3.1 Uzorci, izoliranje ukupne RNA iz periferne krvi i koštane srži, te reverzna transkripcija*

Ukupno su sakupljeni uzorci 60 ispitanika u rasponu dobi od 19 do 91 godine oboljelih od različitih podtipova akutne mijeloi ne leukemije. Medijan dobi bio je 66 godina. Uzorci su bili stanice citološkog aspirata koštane srži/periferne krvi pacijenata s novodijagnosticiranim AML, ljevenih u vremenu od 2005. do 2010. god. na Odjelu Hematologije KB Dubrava, Zagreb. Radilo se o 46 (77%) slučajeva primarne AML i 14 (23%) sekundarne AML. Muških ispitanika bilo je 29 (48%, 29 – 81 god., medijan dobi 63 god.), a ženskih 31 (52%, 19 -91 god., medijan dobi 68 god.). Kod primarnih AML svrstavanje po podtipovima bilo je: 2 M0 (4,3%), 7 M1 (15,2%), 17 M2 (37%), 4 M3 (8,7%), 11 M4 (23,9%), 3 M5 (6,5%), 1 M6 (2,2%) i 1 M7 (2,2%). Kariotip je bio poznat za 19 (32%) ispitanika – njih 17 imalo je kromosomalne abnormalnosti.

Izolirana je ukupna RNA upotrebom "QIAamp RNA Blood Mini Kit-a" prema uputama proizvođača (Qiagen, Chatsworth, CA, SAD) uz optimiziranje ukupne koncentracije leukocita na 7 000 000/mL.

Analiza kakvoće RNA provedena je na 1% agaroznom gelu. 0.3 g agaroze (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) otopljeno je u 30 mL 1xTBE na mješalici u vodenoj kupelji dok gel ne postane proziran. Kad se gel ohladio na 50 °C, dodano je 1.8 µL etidijevog bromida (Sigma, Saint Louis, MO, SAD), gel je promiješan i izliven u kalup.

3 µL otopine RNA pomiješano je s 2 µL vode tretirane DEPC-om i stavljeno na 70° C 10 minuta. 5 µL uzorka pomiješano je s 1 µL pufera za nanošenje uzorka i naneseno u gel.

Elektroforeza se provodila 25 min na 120 V u 1xTBE puferu. Gel je nakon završene elektroforeze izvaden iz pufera i fotografiran pod UV svjetлом.

Prepisivanje RNA u cDNA izvršeno je korištenjem reakcijske smjese iz Tablice 3. uz dodatak 5 µL RNA (2 µg RNA) prema programu: 5 µL RNA stavljeno je na 65 °C 10 minuta, zatim na -20 °C 2 minute, potom na 25 °C 5 minuta, dodano je 15 µL reakcijske smjese na 5 µL RNA i sve stavljeno na 37 °C 60 minuta. Svi korišteni reagensi osim DEPC-a (Sigma, Saint Louis, MO, SAD) proizvod su tvrtke Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD.

**Tablica 3. Reakcijska smjesa za prepisivanje RNA u cDNA**

reagens	volumen (µL)
10 x PCR pufer II	2
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4
nukleotidi (10 mM)	4
inhibitor RNaza (20 U/µL)	1
heksameri (50 µM)	1
transkriptaza – MuLV (50U/µL)	1
voda tretirana DEPCom	2
<b>UKUPNO</b>	<b>15</b>

### 3.2 Lan ana reakcija polimerazom (PCR 1) i fragmentalna analiza (“gene scan” analiza) eksona 12 gena NPM1

#### 3.2.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR 1)

Lan ana reakcija polimerazom korištena je kako bi umnožili ciljni odsje ak cDNA. Po etnici za lan anu reakciju polimerazom (PCR) konstruirane su korištenjem dostupne baze podataka za nukleotidni slijed mRNA izoforme 1 nukleofozmina (NM\_002520.6) (NCBI 2010) i programa Primer3 Output (Rozen i Skaletsky 2000) tako da amplificiraju podru je eksona 12 gena *NPM1* u kojem se nalaze mutacije:

NPM F: 5' - ATT GCT TCC GGA TGA CTG AC - 3' – obilježena 6 - FAM bojom

**NPM R: 5'- CAC GGT AGG GAA AGT TCT CA - 3'**

Obje zatražene po etnici i reagense proizveo je Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD prijeđenu je po etnici NPM F obilježena fluorescentnom 6 - FAM bojom kako bi bilo moguće provesti fragmentalnu analizu produkata. cDNA je amplificirana korištenjem reakcijske smjese u Tablici 4. i prema programu PCR reakcije koji se nalazi u Tablici 5.

**Tablica 4. Reakcijska smjesa za PCR 1**

<b>reagens</b>	<b>volume (<math>\mu</math>L)</b>
10 X PCR pufer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
nukleotidi (10 mM)	2
početnica NPM F (10 $\mu$ M)	0,5
početnica NPM R (10 $\mu$ M)	0,5
Taq DNA polimeraza 5U/ $\mu$ L	0,25
destilirana H <sub>2</sub> O	16
cDNA	2
<b>UKUPNO</b>	<b>25,25</b>

**Tablica 5. Uvjeti reakcije za PCR 1**

<b>uvjeti PCR reakcije</b>	<b>temperatura</b>	<b>vrijeme</b>
početna denaturacija	95° C	10 min
25 ciklusa:		
denaturacija	95° C	30 s
sparivanje početnica	55° C	45 s
produljivanje lanca DNA	72° C	1 min
završno produljivanje lanca DNA	72° C	30 min

Produkti lančane reakcije polimerazom (PCR 1) provjereni su elektroforezom na 2% agaroznom gelu prije provođenja fragmentalne analize kako bi se potvrdila uspješnost amplifikacije:

0.6 g agaroze (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) otopljeno je u 30 mL 1xTBE na mješalici u vodenoj kupelji dok gel nije postao proziran. Kad se gel ohladio na 50 °C, dodano je 1.8 µL etidijevog bromida (Sigma, Saint Louis, MO, SAD), gel je promiješan i izliven u kalup.

7 µL uzorka pomiješano je s 2.5 µL pufera za nanošenje uzorka (Sigma, Saint Louis, MO, SAD) i naneseno u gel.

Elektroforeza se provodila 30 min na 120 V u 1xTBE puferu. Gel je nakon završene elektroforeze izvaden iz pufera i fotografiran pod UV svjetлом.

### **3.2.2 Fragmentalna analiza**

Fragmentalna analiza služila je za određivanje dužine fragmenata DNA umnoženih PCR reakcijom. U tu svrhu korištena je fluorescentno 6 - FAM obilježena po etnica NPM1 i sekvencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Ovom analizom ispitivano je postojanje mutacije u eksonu 12 gena *NPM1* – divlji tip produkta PCR1 reakcije dugačak je 176 parova baza, a mutacijski 180 parova baza.

Nakon reakcije PCR 1 po 1 µl svakog PCR produkta pomiješano je s 12 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i 0,35 µl molekularnog markera LIZ-500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) te denaturirano 2 minute na 95°C. Uzorci su zatim naneseni na 1 kapilarni sekvencer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) i nakon elektroforeze analizirani programom GeneMapper v. 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) (Musani 2008).

### *3.3 Lančana reakcija polimerazom (PCR 2) i određivanje slijeda nukleotida eksona 12 gena NPM1*

#### **3.3.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR 2)**

Fragmentalnom analizom napravljen je probir uzoraka i određeno je koji su pozitivni na mutaciju. cDNA tih uzoraka još jednom je amplificirana lančanom reakcijom polimerazom (PCR 2), ovog puta klasičnim po etnicama, kako bi se odredio nukleotidni slijed ciljnog segmenta. Po etnici NPMc+ F i ovaj put je konstruirana upotrebom Primer3 Output programa (Rozen i Skaletsky 2000):

NPMc+ F: 5' – CCA AAG TGG AAG CCA AAT T – 3'

NPM R: 5'- CAC GGT AGG GAA AGT TCT CA - 3'

Reakcijska smjesa za PCR 2 bila je jednaka onoj za PCR 1, osim što je umjesto po etnici NPM F, upotrijebljena po etnici NPMc+ F (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) (v. Tablica 4.) Uvjeti PCR 2 reakcije (Tablica 6.) također su slični – razlika je u broju ciklusa (35 umjesto 25) i duljini trajanja završnog produljivanja DNA lanca (7 minuta umjesto 30 minuta).

**Tablica 6. Uvjeti reakcije za PCR 2**

<b>uvjeti PCR reakcije</b>	<b>temperatura</b>	<b>vrijeme</b>
početna denaturacija	95° C	10 min
35 ciklusa:		
denaturacija	95° C	30 s
sparivanje početnica	55° C	45 s
produljivanje lanca DNA	72° C	1 min
završno produljivanje lanca DNA	72° C	7 min

Produkti ove lanane reakcije također su provjereni na agaroznom gelu identičnom onome na kojem su provjeravani produkti PCR 1 reakcije.

### **3.3.2 Određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje)**

Sekvenciranje je postupak kojim se određuje slijed baza u fragmentu DNA. Nakon što je na agaroznom gelu provjereno da je došlo do adekvatne amplifikacije pristupljeno je direktnom sekvenciranju kako bi se utvrdilo o kojem tipu mutacije se radi u pojedinom slučaju.

Prije same reakcije sekvenciranja, PCR produkti morali su se prostirati od cDNA i po etnica. To je ura eno kitom ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH, SAD): 0,4 µl enzima dodano je na 10 µl PCR produkta i zatim inkubirano 30 minuta na 37°C, zagrijano 15 minuta na 85°C i one su pripremljeni za sekvenciranje.

Reakcija sekvenciranja je ena u volumenu od 10 µl koji sadrži 1 µl kita za sekvenciranje (BigDye Terminator v1.1 Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), jednu od po etnica – NPMc+ F ili NPM R, 2 µl PCR produkta i QH<sub>2</sub>O. Uvjeti reakcije su slijedeći: 1 minuta na 96°C i zatim 25 ciklusa od 10 sekundi na 96°C, 5 sekundi na 50°C i 4 minute na 60°C.

Uzorci su zatim precipitirani upotrebom 25 µl apsolutnog etanola, s dodatkom 1 µl 0,125 M EDTA i 1 µl 3 M Na-acetata 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga centrifugirani su 50 minuta na 3000 rpm (Universal 320, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka), supernatant je odliven, isprani su s 125 µl 70% etanola, ponovno centrifugirani 50 minuta na 3000 rpm i osušeni.

U sljedećem koraku uzorci su otopljeni u 20 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), denaturirani 2 minute na 95°C i ohlađeni u ledenom stalku. Uzorci su naneseni na sekvencer i nakon toga analizirani programom Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), te zatim uspoređivani s referentnom sekvencom programom BioEdit (Musani 2008).

### *3.4 Ispitivanje na *FLT3* ITD mutaciju upotrebom lančane reakcije polimerazom*

Svi su uzorci, osim uzorka 39 i 40 zbog nedostatka RNA, tako da su ispitani na postojanje ITD (internal tandem duplication) mutacije u genu *FLT3*. U tu svrhu korištena je amplifikacija cDNA lan anom reakcijom polimerazom i vizualizacija na agaroznom gelu (Nakao i sur. 1996). Slijed po etnici:

FLT3 F: 5' - CAA TTT AGG TAT GAA AGC C – 3'

FLT3 R: 5' – CAA ACT CTA AAT TTT CTC T – 3' (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)

Reakcijska smjesa za ovu PCR reakciju navedena je u Tablici 7., a uvjeti reakcije u Tablici 8).

**Tablica 7. Reakcijska smjesa PCR-a za ispitivanje *FLT3* ITD mutacije**

reagens	volume ( $\mu$ L)
10 X PCR pufer	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5
nukleotidi (10 mM)	0,5
početnica FLT3F (10 $\mu$ M)	0,5
početnica FLT3R (10 $\mu$ M)	0,5
Taq DNA polimeraza 5U/ $\mu$ L	0,25
destilirana H <sub>2</sub> O	13,75
cDNA	2
<b>UKUPNO</b>	<b>25,25</b>

**Tablica 8. Uvjeti PCR reakcije za ispitivanje *FLT3* ITD mutacije**

uvjeti PCR reakcije	temperatura	vrijeme
početna denaturacija	95° C	5 min
38 ciklusa:		
denaturacija	94° C	30 s
sparivanje početnica	55° C	1 min
produljivanje lanca DNA	72° C	1 min
završno produljivanje lanca DNA	72° C	7 min

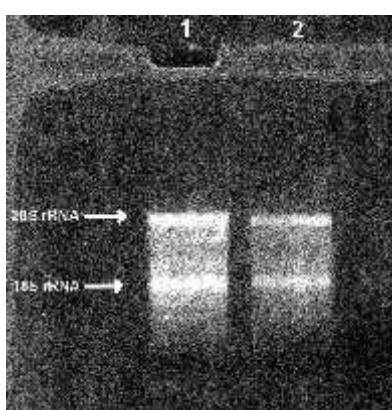
Produkti PCR reakcije analizirani su na agaroznom gelu koji je istovjetan dvama prethodnima.

### *3.5 Statisti ke metode*

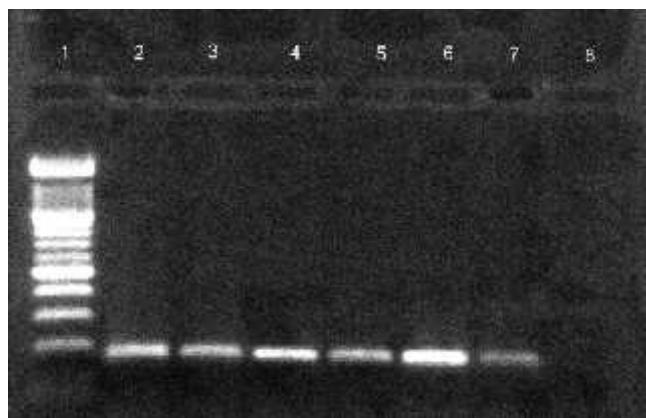
Statisti ka obrada podataka izvršena je kako bi se korelirala pojavnost mutacije u eksonu 12 gena *NPM1* i mutacije *FLT3* ITD, te kako bi se izra unalo kojim se postotkom odre eni tip mutacije javlja. Svi izra uni obavljeni su pomo u programa MedCalc for Windows, version 11.3 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

## 4 REZULTATI

Analizom na 1% agaroznom gelu utvrđeno je da su izolirane RNA zadovoljavajuće kakvoće (Slika 2.). Elektroforezom produkata lančane reakcije polimerazom (PCR1) na 2% agaroznom gelu pokazano je da je amplifikacija bila uspješna – dobiveni su produkti od 176 ili 180 pb (Slika 3.).

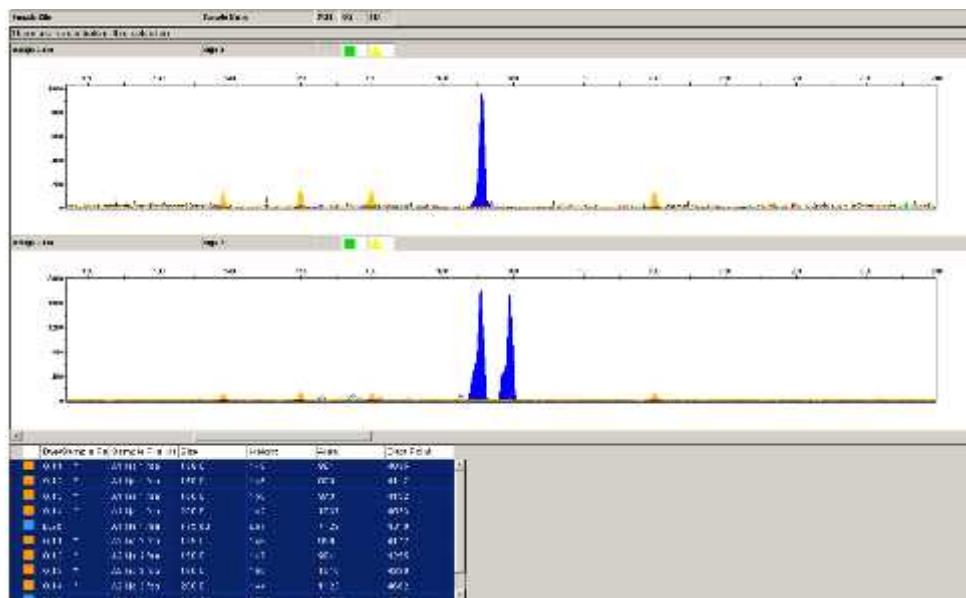


Slika 2. Analiza kakvoće izoliranih RNA:  
stupac 1. uzorak br. 1  
stupac 2. uzorak br. 2.



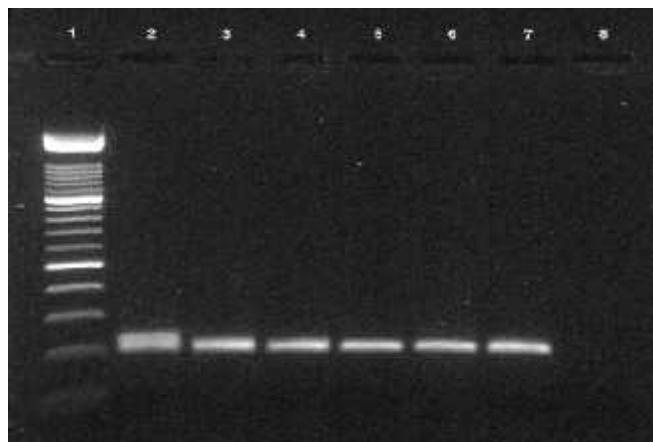
Slika 3. Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom (PCR1) elektroforezom na 2% agaroznom gelu: stupac 1. molekularni marker XIV (Roche, Basel, Švicarska); stupci 2.-7. redom uzorci br. 7, 8, 12, 16, 18, 19 – vidljivi produkti od 176 ili 180 pb; stupac 8. negativna kontrola

Fragmentalnom analizom utvrđeno je da je ukupno 12 uzoraka pozitivno na mutacije unutar eksona 12 gena *NPM1* (Slika 4.) To znači 20% svih akutnih mijeloidnih leukemija i 26% primarnih AML. Nijedan slučaj mutacije u genu *NPM1* nije otkriven među sekundarnim akutnim mijeloidnim leukemijama. Pozitivni uzorci bili su pod brojevima 1, 6, 8, 18, 23, 24, 32, 36, 51, 54, 57 i 60. Raspon godina pozitivnih na ovu mutaciju bio je od 51 do 81, a medijan dobi 64 godine. Među njima bilo je 7 muških uzoraka i 5 ženskih. Nažalost samo za dvoje od njih, br. 8 i 32, bio je dostupan i kariotip – oba dva uzorka bila su normalnog kariotipa (Tablica 9.). Po podtipovima: 7 pozitivnih AML M2 uzoraka, sva 3 AML M5 uzorka i 2 AML M1..

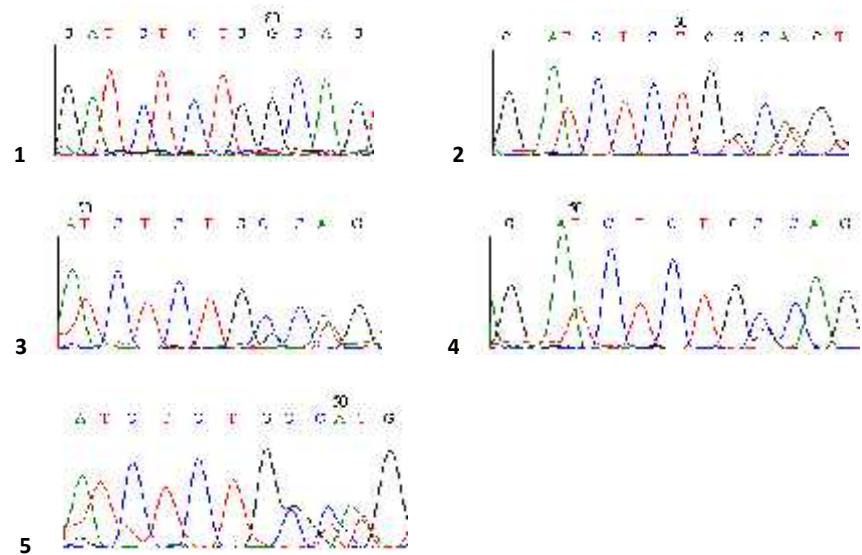


Slika 4. Fragmentalna analiza odsječka eksona 12 gena *NPM1*: plavo, signali segmenta cDNA amplificiranog reakcijom PCR1; narančasto, markeri. Na gornjem dijagramu nalazi se signal divljeg tipa *NPM1* koji daje amplikon od 176 pb; na donjem dijagramu u pitanju je heterozigotna mutacija (insercija 4 pb) u eksonu 12 gena *NPM1*, te stoga imamo signal od 176 pb i od 180 pb.

Amplifikacija cDNA pozitvnih uzoraka lan anom reakcijom polimerazom s drugim setom po etnica (PCR2) tako er je bila uspješna – dobiveni su produkti od 216 pb (Slika 5.). Kasnjim odreivanjem slijeda nukleotida utvrđeno je da se u 8 slučajeva radilo o mutaciji tipa A (br. 1, 6, 18, 23, 32, 36, 51, 54), u 2 slučaja o tipu D (8 i 57) i po jednom o tipu H (60) prema Suzuki i suradnicima (2005) i tipu Nm (24) prema Schnittger i suradnicima (2005) (Slika 6.) (Tablica 9.).



Slika 5. Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom (PCR2) elektroforezom na 2% agaroznom gelu: stupac 1. molekularni marker XIV (Roche, Basel, Švicarska); stupci 2.-7. redom uzorci br. 1, 6, 8, 18, 23, 24 – vidljivi produkti od 216 pb; stupac 8. negativna kontrola



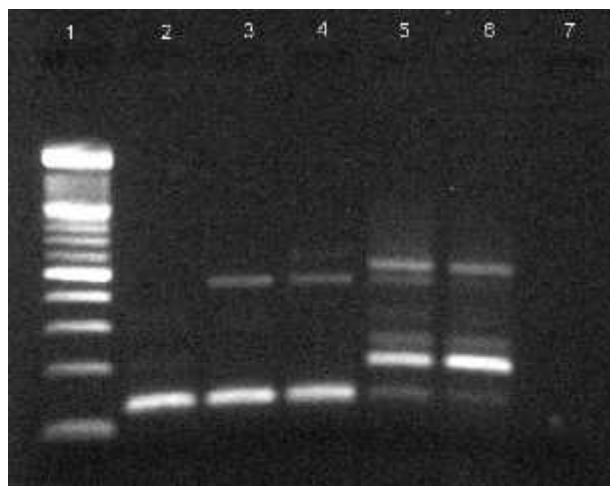
Slika 6. Slijed nukleotida analiziranih uzoraka: 1. divlji tip (sekvenciranje početnicom NPM R); 2. – 5. vidljiva pojava dvostrukog signala na poziciji 1109 referentnog slijeda (NM\_002520.6) iz kojeg se mogu iščitati tipovi mutacija; 2. mutacija tipa A – duplikacija tetranukleotida TCTG na poziciji 1105-1108 (sekvenciranje početnicom NPMc+ F) – uzorak br. 1; 3. mutacija tipa D – insercija CCTG na poziciji 1109 (sekvenciranje početnicom NPMc+ F) - uzorak br. 8; 4. mutacija tipa Nm – insercija CCAG na poziciji 1109 (sekvenciranje početnicom NPMc+ F) – uzorak br. 24; 5. mutacija tipa H – insercija CTTG na poziciji 1109 (sekvenciranje početnicom NPMc+ F) – uzorak br. 60

Tablica 9. Pregled karakteristika 12 pozitivnih uzoraka

br. uzorka	spol	dob	FAB klas.	tip mutacije	C-terminalni dio NPM-a	FLT3 ITD	kariotip
1	M	57	M2	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	+	ND <sup>°</sup>
6	Ž	64	M2	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	-	ND
8	M	55	M1	D (CCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	+	46 xy
18	Ž	74	M5	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	-	ND
23	Ž	64	M1	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	+	ND
24	M	56	M2	†Nm (CCAG)	286 - DLCQAV <sup>EEV</sup> SLRK	+	ND
32	Ž	63	M2	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	+	46 xx
36	M	81	M2	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	-	ND
51	M	58	M5	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	-	ND
54	M	77	M5b	A (TCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	-	ND
57	M	51	M2	D (CCTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	+	ND
60	Ž	69	M2	*H (CTTG)	286 - DLCLAV <sup>EEV</sup> SLRK	+	ND

zeleno – dodatni NES motiv – usporediti s divljim tipom u Tablici 2.; † prema Schnittger i sur. (2005); \* prema Suzuki i sur. (2005); ° not done – nije rađeno

Dakle, u estalost mutacije A bila je 67%, mutacije D 17%, a mutacija H i Nm po 8%. Na kraju istraživanja utvrđivanje je i ukupni broj *FLT3* ITD pozitivnih uzoraka (Slika 7.). Od 58 analizirana uzorka njih 15 (26%) je bilo pozitivno na ovu mutaciju (Tablica 10.). Od 44 primarnih AML 12 (27%) ih je bilo pozitivno na mutaciju *FLT3* ITD. Međutim u tih 12 bilo je i 7 uzoraka koji su takođe bili pozitivni na mutaciju eksona 12 gena *NPM1* (Tablica 11.).



Slika 7. Fotografija elektroforeze produkata lančane reakcije polimerazom kod ispitivanja na *FLT3* ITD mutaciju (2% agarozni gel): stupac 1. molekularni marker XIV (Roche, Basel, Švicarska); stupci 2. – 4. redom uzorci br. 20, 21, 22 – produkt od 133 pb; stupci 5. i 6. uzorci br. 23 i 24 – jači signal produkta od 266 pb; stupac 7. negativna kontrola

Da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u frekvenciji *FLT3* ITD mutacija kod

**Tablica 10.** Broj pozitivnih i negativnih uzoraka svih AML na pretrage *NPM1ex12* i *FLT3* ITD

	<b>NPM1ex12+</b>	<b>NPM1ex12-</b>	
<b>FLT3 ITD +</b>	7	8	15
<b>FLT3 ITD -</b>	5	38	43
	12	46	58

$$\chi^2 = 6,322; D_f = 1; P = 0,012$$

**Tablica 11.** Broj pozitivnih i negativnih uzoraka primarnih AML na pretrage *NPM1ex12* i *FLT3* ITD

	<b>NPM1ex12+</b>	<b>NPM1ex12-</b>	
<b>FLT3 ITD +</b>	7	6	13
<b>FLT3 ITD -</b>	5	26	31
	12	32	44

$$\chi^2 = 4,805; D_f = 1; P = 0,028$$

uzoraka koji su bili pozitivni na mutaciju gena *NPM1* i onih negativnih proveden je  $\chi^2$  – test koji rezultati govore kako razlike imaju, kako u ukupnom broju uzoraka ( $\chi^2 = 6,322; D_f = 1; P = 0,012$ ), tako i među uzorcima primarnih AML ( $\chi^2 = 4,805; D_f = 1; P = 0,028$ ). *FLT3* ITD mutacija javlja se više nego dvostruko češće u pozitivnim uzorcima.

## 5 RASPRAVA

Mutacija u eksonu 12 gena *NPM1* naj eš a je geneti ka aberacija u akutnim mijeloi nim leukemijama s normalnim kariotipom, ine i 50 – 60% slu ajeva. Posljedica mutacije je trajno premještanje nukleofozmina iz jezgrice u citoplazmu. (Falini i sur. 2005). Ova mutacija do sada je opisana u svim podtipovima FAB klasifikacije osim podtipa M3. eš e se javlja u podtipovima M4 i M5, a izražena je i u akutnoj mijeloi noj leukemiji s invaginacijama jezgre. Njezina povezanost s *de novo* nastankom AML-a u kontradikciji je s injenicom da se mutacija pojavljuje u nekoliko stani nih linija, što se redovito povezuje sa sekundarnim leukemijama (Falini i sur. 2007). Mutacije pokazuju dobnu ovisnost, pa se tako rijetko mogu na i u pedijatrijskih pacijenata i ljudi mla ih od etrdeset godina ( Brown i sur. 2007; Chou i sur. 2006).

Mutacije u genu *NPM1* snažno koreliraju s mutacijom *FLT3* ITD, jer se *FLT3* ITD javlja dvostruko eš e u slu ajevima gdje je mutiran gen za nukleofozmin. ini se da su ove dvije mutacije mehanisti ki povezane, pri emu je mutacija gena *NPM1* vjerojatno raniji doga aj. Mutacijski NPM, kada ne dolazi u kombinaciji s mutacijom gena *FLT3*, dobar je prognosti ki faktor, dok slu ajevi koji nose mutaciju oba gena pokazuju lošu reaktivnost na terapiju (Verhaak i sur. 2005).

Prema našim saznanjima ovo je prvi puta da je cDNA ispitivana fragmentalnom analizom na mutacije eksona 12 gena *NPM1*. Ova metoda ve je korištena u svrhu probira uzorka pozitivnih na ovu mutaciju na genomskoj DNA (Thiede i sur. 2006; Boissel i sur. 2005). Povode i se rezultatima ranijih istraživanja koji su pokazali da prilikom mutacije ne dolazi do promjene ekspresije ovog gena (Alcalay i sur. 2005), te uzimaju i u obzir injenicu da je mutacija redovito heterozigotna, zaklju eno je da bi se ista metoda mogla primijeniti na cDNA s jednakim uspjehom pri emu bi pojava sekundarnog signala na 180 parova baza bila indikativna za postojanje mutacije. Na odabir fragmentalne analize kao dobre metode za prvotni probir uzorka utjecala je i injenica da se radi o relativno jednostavnoj tehničkoj koja bi istodobno mogla utvrditi postojanje bilo kojeg od 40-tak tipova

mutacija i dati rezultate u kratkom roku, što je u dijagnostici važno. U ovom istraživanju nije ispitivana osjetljivost metode, te bi to pitanje u svakom slučaju trebalo adresirati prije eventualnog uvođenja ovih postupaka u redovitu dijagnostiku praksu. Takođe, u našim su uzorcima identificirani tipovi mutacija upotrebom direktnog sekvenciranja, što možda neće uvijek biti moguće. Eventualna dvosmislenost rezultata direktnog sekvenciranja upućuje na oprez i primjenu dodatnih metoda.

Rezultati našeg istraživanja u nekoliko se segmenta podudaraju s dosada objavljenim podacima. NPM1+ AML ima 26% primarnih AML među našim uzorcima, što je unutar dosada opaženih 25-35% (Falini i sur. 2005; Thiede i sur. 2006). Konzistentna s dosadašnjim rezultatima ostalih studija je i injenica da se mutacija gena *NPM1* nije pojavila ni u jednom slučaju sekundarne leukemije. Nažalost, podatke o kariotipovima većine naših ispitanih nemamo, no valja primijetiti da se mutacija u genu *NPM1* javlja u dva ispitana uzorka normalnog kariotipa (8 i 32) dok s druge strane ista nije identificirana kod uzoraka s otprije poznatim citogenetičkim abnormalnostima.

Iako u estalosti mutacija po odredenom FAB podtipu nije izrađena, zbog malog broja uzoraka, prijevremeno su neki podtipovi bili zastupljeni sa tek jednim uzorkom, važno je skrenuti pažnju na injenicu da su u našem istraživanju bila mutirana sva tri uzorka podtipa M5 kod kojeg se aberrantni oblik nukleofozmina može sresti u dobro 90% slučajeva. Pomoćno je iznenađujuće da injenica da nijedan od 11 uzoraka okvalificiranih kao podtip M4 nije bio pozitivan na ovu mutaciju, uzimajući u obzir ranija izvješća (Schnittger i sur. 2005; (Döhner i sur., 2005).

Podaci koji svakako iskaču iz okvira do sada objavljenih studija tiče se u estalosti pojedinog tipa mutacija među našim uzorcima. Mutacija A je u našem istraživanju je najčešća, čineći 67% slučajeva što je blizu ostalih 70-80%. No, s druge strane ostala tri tipa identificiranih mutacija (D, H i Nm) javljaju se u postocima koji znatno odskaču od ekivanog, pa tako tip D među našim uzorcima ima u dobro 17% mutiranih, dok se kod do sada objavljenih istraživanja njegova u estalosti krećala između 3 i 6%, tj. redovito ispod 10%. Isto opažanje vrijedi i za tipove H i Nm koji svaki predstavljaju u dobro 8% mutiranih uzoraka u sklopu naše studije, a za ostale tipove je bilo da se tip H javi u 0,9 do 2%, a tip Nm u 0,4% odnosno u manje od 1% (Tablica 12.) (Falini i sur. 2005; Thiede i sur. 2006; Schnittger i

sur. 2009). Takvo odstupanje treba pripisati malom broju mutiranih uzoraka, što otežava statisti ke analize i njihovu vjerodostojnost. Za relevantnije podatke trebalo bi provesti istraživanje na puno ve em broju uzoraka.

**Tablica 12. Učestalost pojedinih tipova mutacije u NPMc+ pozitivnim uzorcima**

tip mutacije	N	% (95% GP)	<sup>‡</sup> o ekivani %
A	8	67 (35-90)	70-80
D	2	17 (2-48)	cca 3 - 6, < 10
H	1	8 (0-27)	0,9 – 2,0
Nm	1	8 (0-27)	cca 0,4 < 1
	12	-	-

95% GP – 95% granice pouzdanosti; <sup>‡</sup> A prema Falini i sur. (2005) i Thiede i sur. (2006), D, H i Nm prema Thiede i sur. (2006) i Schnittger i sur. (2009)

Statisti ki zna ajna povezanost *FLT3* ITD mutacije me u uzorcima pozitivnim na mutaciju u genu *NPM1* još je jednom potvr ena i našim istraživanjem, pružaju i još jedan dokaz da je daljnje rasvjetljavanje interakcija ovih dvaju protein, kako me usobnih, tako i s drugim proteinima važno za budu e bolje razumijevanje hematoloških poreme aja.

## **6 ZAKLJUČAK**

Iz provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. NPMc+ akutna mijeloi na leukemija predstavlja zasebnu podgrupu unutar već imenovanih podtipova FAB leukemija, te na nju otpada oko trećina *de novo* AML.
2. Mutacije su ograničene na ekson 12 gena *NPM1*, a najčešći tip mutacije je tip A. Opetno do mutacije najčešće dolazi duplikacijom TCTG tetranukleotida (1105-1108) ili insercijom 4 parabaza na poziciju 1109 referentne sekvene (NM\_002520.6).
3. Utvrđena je statistički znatna povezanost mutacija u genima *NPM1* i *FLT3* i njihov mehanizam u nastanku leukemije tek treba rasvijetliti.
4. Fragmentalna analiza i direktno sekvenciranje pokazali su se kao dobre metode u utvrđivanju mutacije eksona 12 gena *NPM1*. Poseban naglasak ovdje stavljamo na fragmentalnu analizu - razlog tome je injenica da je u dijagnostici za sada još uvijek važnije odrediti postojanje mutacije, nego utvrđivanje samog tipa mutacije.

## 7 LITERATURA

- Alcalay M., Tiacci E., Bergomas R., Bigerna B., Venturini E., Minardi S. P., Meani M., Diverio D., Bernard L., Tizzoni L., Volorio S., Luzi L., Colombo E., Lo Coco F., Mecucci C., Falini B., Pelicci P. G. 2005. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood*, 106, 899-902.
- Bain, B. J. 1990. *Leukaemia Diagnosis A Guide to the FAB Classification*. J. B. Lippincott Company/Gower Medical Publishing, Philadelphia/London, SAD/UK.
- Bernard K., Litman E., Fitzpatrick J. L., Shellman Y. G., Argast G., Polvinen K., Everett A. D., Fukasawa K., Norris D. A., Ahn N. G., Resing K. A. 2003. Functional Proteomic Analysis of Melanoma Progression. *Cancer Res*, 63, 6716–6725.
- 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.
- Boissel N., Renneville A., Biggio V., Philippe N., Thomas X., Cayuela J.-M., Terre C., Tigaud I., Castaigne S., Raffoux E., De Botton S., Fenaux P., Dombret H., Preudhomme C. 2005. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*, 106, 3618-3620.
- Brady S. N., Maggi Jr L. B., Winkeler C. L., Toso E. A., Gwinn A. S., Pelletier C. L., Weber J. D. 2009. Nucleophosmin protein expression level, but not threonine 198 phosphorylation, is essential in growth and proliferation. *Oncogene*, 28, 3209–3220.
- Brady S. N., Yu Y., Maggi Jr. L. B., Weber J. D. 2004. ARF Impedes NPM/B23 Shutting in an Mdm2-Sensitive Tumor Suppressor Pathway. *Mol Cell Biol*, 24, 9327–9338.

- 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.
- Budhu A. S., Wang X. W. 2005. Loading and Unloading: Orchestrating Centrosome Duplication and Spindle Assembly by Ran/Crm1. *Cell Cycle*, 4, 1510–1514.
- Cazzaniga G., Dell’Oro M. G., Mecucci C., Giarin E., Masetti R., Rossi V., Locatelli F., Martelli M. F., Basso G., Pession A., Biondi A., Falini B. 2005. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood*, 106, 1419-1422.
- Chan P. K., Chan F. Y., Morris S. W., Xie Z. 1997. Isolation and characterization of the human nucleophosmin/B23 (NPM) gene: identification of the YY1 binding site at the 5' enhancer region. *Nucleic Acids Res*, 25, 1225–1232.
- Chang J.-H., Olson M. O. J. 1990. Structure of the Gene for Rat Nucleolar Protein B23. *J Biol Chem*, 265, 18227-18233.
- Chou W.-C., Tang J.-L., Lin L.-I., Yao M., Tsay W., Chen C.-Y., Wu S.-J., Huang C.-F., Chiou R.-J., Tseng M.-H., Lin D.-T., Lin K.-H., Chen Y.-C., Tien H.-F. 2006. Nucleophosmin Mutations in De novo Acute Myeloid Leukemia: The Age-Dependent Incidences and the Stability during Disease Evolution. *Cancer Res*, 66, 3310-3316.
- 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.
- Döhner K., Schlenk R. F., Habdank M., Scholl C., Rücker F. G., Bullinger A. C. L., Fröhling F., Döhner 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.
- 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.

Falini B., Bolli N., Shan J., Martelli M. P., Liso A., Pucciarini A., Bigerna B., Pasqualucci L., Mannucci R., Rosati R., Gorello P., Diverio D., Roti G., Tacci E., Cazzaniga G., Biondi A., Schnittger S., Haferlach T., Hiddem W., Martelli M. F., Gu W. 2006. 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., Mecucci C., Tacci E., Alcalay M., Rosati R., Pasqualaci L., La Starza R., Diverio D., Colombo E., Santucci A., Bigerna B., Pacini R., Pucciarini A., Liso A., Vignetti M., Fazi P., Meani N., Pettirossi V., Saglio G., Mandelli F., Lo-Coco F. 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *New Engl J Med*, 352, 254-266.

Falini B., Nicoletti I., Bolli N., Martelli M. P., Liso A., Gorello P., Mandelli F., Mecucci C., Martelli M. F. 2007a. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*, 92, 519-532.

Falini B., Nicoletti I., Martelli M. F., Mecucci C. 2007b. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*, 109, 874-885.

Feuerstein N., Chan P. K., Mond J. J. 1988. Identification of numatrin, the nucleolar matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. *J Biol Chem*, 263, 10608-10612.

Gilliland D. G., Tallman M. S. 2003. Acute Myelogenous Leukemia. U Handin R. I., Lux S. E., Stossel T. P. (ur.). *Blood: principles and practice of hematology*. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, SAD, 483-510.

Grisendi S., Mecucci C., Falini B., Pandolfi P. P. 2006. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 493-505.

Herrera J. E., Savkur R., Olson M. O. J. 1995. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res*, 23, 3974-3979.

Hingorani K., Szebeni A., Olson M. O. J. 2000. Mapping the Functional Domains of Nucleolar Protein B23. *J Biol Chem*, 32, 24451-24457.

Holland J. F., Frei E. 2003. *Cancer Medicine* 6, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/brfcgi?book=cmed6>. Pristupljeno 12. 7. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

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.

Korgaonkar C., Hagen J., Tompkins V., Frazier A. A., Allamargot C., Quelle F. W., Quelle D. E. 2005. Nucleophosmin (B23) Targets ARF to Nucleoli and Inhibits Its Function. *Mol Cell Biol*, 25, 1258–1271.

Krause A., Hoffmann I. 2010. Polo-Like Kinase 2-Dependent Phosphorylation of NPM/B23 on Serine 4 Triggers Centriole Duplication. *PLoS ONE*, 5, e9849. doi:10.1371/journal.pone.0009849.

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., Laiho M. 2004. Nucleophosmin, HDM2 and p53 Players in UV damaged incited nucleolar stress response. *Cell Cycle*, 3, 976-979.

Lee C., Smith B. A., Bandyopadhyay k., Gjerset R. A. 2005. DNA Damage Disrupts the p14ARF-B23 (Nucleophosmin) Interaction and Triggers a Transient Subnuclear Redistribution of p14ARF. *Cancer Res*, 65, 9834-9842.

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, Structure note*, doi: 10.1002/prot.21504 .

Lindström M. S., Zhang Y. 2008. Ribosomal Protein S9 Is a Novel B23/NPM-binding Protein Required for Normal Cell Proliferation. *J Biol Chem*, 283, 15568–15576.

Ma Z., Kanai M., Kawamura K., Kaibuchi K., Ye K., Fukasawa K. 2006. Interaction between ROCK II and Nucleophosmin/B23 in the Regulation of Centrosome Duplication. *Mol Cell Biol*, 26, 9016-9034.

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.

Musani, V. 2008. Mehanizmi regulacije signalnog puta Hedgehog/Patched/Gli u tumorima i nasljednim oboljenjima. *Prirodoslovno - matemati ki fakultet - doktorska disertacija*.

Nakagawa M., Kameoka Y., Suzuki R. 2005. Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia. *New Engl J Med*, 352, 1819-1820.

Nakao M., Yokota S., Iwai T., Kaneko H., Horiike S., Kashima K., Sonoda Y., Fujimoto T., Misawa S. 1996. Internal tandem duplicatin if the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10, 1911-1918.

NCBI (2010a): NCBI - National Center for Biotechnology Information, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_002520.6](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002520.6). Pristupljeno 24. 6. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

NCBI (2010b): NCBI - National Center for Biotechnology Information, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_199185.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_199185.3). Pristupljeno 24. 6. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

NCBI (2010c): NCBI - National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/10835063>. Pristupljeno 24. 6. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

NCBI (2010d): NCBI - National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/83641870>. Pristupljeno 25. 6. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

NCBI (2010e): NCBI - National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=4869>. Pristupljeno 24. 6. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

NCBI (2010f): NCBI - National Center for Biotechnology Information, <http://ncbi.nlm.nih.gov/protein/40353734>. Pristupljen 24. 6. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

NCBI (2010g): NCBI - National Center for Biotechnology Information, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001037738.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001037738.2). Pristupljen 24. 6. 2010., na [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

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 Biotech Bioch*, 66, 2239-2242.

Nozawa Y., van Belzen N., van der Made A. C. J., Dinjens W. N. M., Bosman F. T. 1996. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol*, 178, 48-52.

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., Fukasawa K. 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 Letters*, 506, 272-276.

Pelletier C. L., Maggi Jr. L. B., Brady S. N., Scheidenhelm D. K., Gutmann D. H., Weber J. D. 2007. TSC1 Sets the Rate of Ribosome Export and Protein Synthesis through Nucleophosmin Translation. *Cancer Res*, 67, 1609-1617.

Rajesh S. S., Olson M. O. J. 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*, 26, 4508-4515.

Rozen S., Skaletsky H. J. 2000. Primers on WWW for general users and for biologist programmers. U Krawetz S., Misener S. (ur.). *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, SAD, 365-386.

Schmidt-Zachmann M. S., Hügle-Dörr B., Franke W. W. 1987. A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO J*, 6, 1881-1890.

- Schnittger S., Kern W., Tschulik C., Weiss T., Dicker F., Falini B., Haferlach C., Haferlach T. 2009. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*, 114, 2220-2231.
- 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.
- 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., Kiyo H., Ozeki K., Tomita A., Yamaji S., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Nishimura M., Motoji T. 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., Hingorani K., Negi S., Olson M. O. J. 2003. Role of Protein Kinase CK2 Phosphorylation in the Molecular Chaperone Activity of Nucleolar Protein B23. *J Biol Chem*, 278, 9107–9115.
- Szebeni A., Olson M. O. J. 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci*, 8, 905–912.
- 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.
- Tokuyama Y., Horn H. F., Kawamura K., Tarapore P., Fukasawa K. 2001. Specific Phosphorylation of Nucleophosmin on Thr199 by Cyclin-dependent Kinase 2-Cyclin E and Its Role in Centrosome Duplication. *J Biol Chem*, 276, 21529–21537.

- Verhaak R. G. W., Goudswaard C. S., van Putten W., Bijl M. A., Sanders M. A., Hugens W., Uitterlinden A. G., Erpelinck C. A. J., Delwel R., Löwenberg B., Valk P. J. M. 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.
- Wang D., Baumann A., Szebeni A., Olson M. O. J. 1994. The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J Biol Chem*, 269, 30994-30998.
- Wang W., Budhu A., Forques 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.
- Wu M. H., Chang J. H., Yung B. Y. M. 2002. Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 overexpressed NIH 3T3 fibroblasts: Enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis*, 23, 93-100.
- 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.
- 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.
- Zhang Y. 2004. The ARF-B23 connection: implications for growth control and cancer treatment. *Cell Cycle*, 3, 259-262.