

بررسی جهش‌های ژن FLT3 (FMS like tyrosine kinase 3) در کودکان مبتلا به لوسمی‌های حاد

مریم شیخی^۱، فرهاد ذاکر^۲، غلام رضا جوادی^۳، مهرداد هاشمی^۴، فرناز رزم خواه^۵

^۱ کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۲ دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

^۳ دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۴ استادیار ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۵ کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: جهش ژن *flt3* (گیرنده تیروزین کینازی شبه *FMS*) باعث تکثیر بدون کنترل سلول‌های لوسمیک شده و پیش‌آگهی بدی را به همراه دارد. هدف ما از این مطالعه اجرایی کردن آزمایشات مولکولی برای تشخیص و غربالگری این جهش‌ها در مبتلایان لوسمی‌های حاد بود.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی، ۹۱ کودک مبتلا به لوسمی‌های حاد میلوئیدی (*AML*) و لنفوئیدی (*ALL*) از نظر جهش در ژن *flt3* شامل وجود جهش *ITD* (*Internal Tandem duplication*) و جهش نقطه‌ای (*Point mutation*) در اگزون ۱۷ ارزیابی شدند. جهش *ITD* در گیرنده *flt3* با انجام *PCR* (*Polymerase chain reaction*) در اگزون ۱۱ و ۱۲ و اینترون ۱۱ انجام شد. در مورد جهش نقطه‌ای در اگزون ۱۷، بعد از انجام *PCR* روی *DNA* ژنومیک این بیماران، محصولات *PCR* شده‌ی بیماران با استفاده از آنزیم محدودالایتر *ECORV* و تکنیک *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) بررسی شدند. در موارد *ITD* مثبت، روش *Sequencing* به کار گرفته شد.

یافته‌ها: جهش *ITD* در ۷ فرد (۷/۷ درصد) مبتلا به لوسمی حاد مشاهده گردید. ۲ بیمار (۲/۲ درصد) نیز جهش نقطه‌ای *D835* داشتند. توزیع آنها در زیرگروه‌های مختلف *FAB* یکسان نبود.

نتیجه‌گیری: جهش *FLT3* در لوسمی‌های حاد کودکان شیوع بالایی دارد. بنابراین می‌توان با تشخیص مولکولی این جهش‌ها، مستقل از طبقه‌بندی *FAB* و قبل از شروع درمان، در مورد پروتکل درمانی صحیح تصمیم گرفت.

واژگان کلیدی: لوسمی حاد، ژن *FLT3*، جهش *ITD*، جهش نقطه‌ای *D835*.

مقدمه

ژن گیرنده *flt3* (گیرنده تیروزین کینازی شبه *FMS*) از گیرنده‌های خارج سلولی پیش‌سازهای خونی و متعلق به خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی کلاس III (*RTKIII*)

می‌باشد که از ۵ ناحیه شبه ایمنوگلوبولین (*Ig-Like*) در قسمت خارج سلولی و یک ناحیه کینازی در قسمت داخل سلولی تشکیل شده و این دو قسمت توسط ناحیه غشا گذر به هم متصل می‌شود. ژن گیرنده *flt3* یک پروتئین ۹۹۳ اسید آمینه‌ای است (۲،۱). این ژن در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۳ (*13q12,2*) قرار گرفته و در سلول‌های خونساز نابالغ، جفت، گنادها و مغز بیان می‌شود (۳). لیگاند *flt3* (*FL*) هم در اکثریت رده‌های سلولی بیان می‌شود (۵،۴). در حالت طبیعی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دکتر فرهاد ذاکر

(email: Farhadz20@yahoo.co.uk)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۸/۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۱/۲۷

با توجه به اینکه تاکنون مطالعات چندانی بر روی این جهش‌ها در ایران انجام نشده است، طراحی روش‌هایی برای غربالگری جهش‌های فعال‌سازی و اجرایی کردن روش‌های تشخیص مولکولی این جهش‌ها و بررسی فراوانی بروز آنها در افراد مبتلا به لوسمی حاد، علاوه بر جهش‌های موجود در تیروزین کینازها یا سایر عوامل اثر کننده فرودست آنها در لوسمی‌های حاد توجیه‌پذیر و ارزشمند است.

مواد و روشها

در این مطالعه بنیادی، جهش‌های ژن گیرنده *flt3* در ۹۱ کودک مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML) با زیرگروه‌های مختلف طبقه‌بندی FAB (به خصوص AML-M3) و لوسمی لنفوئیدی حاد (ALL) با طبقه‌بندی ایمونوفنوتیپ از طریق فلوسایتومتری بررسی شد. نمونه‌های خون از بخش خون بیمارستان‌های علی اصغر، بهرامی، مرکز طبی کودکان و مرکز فلوسیتومتری سازمان انتقال خون تهیه شد تا جهت تخلیص DNA و بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد. جهت استخراج از روش پروتئیناز K و استات آمونیوم اشباع استفاده شد. لوله‌های حاوی خون تا زمان تخلیص DNA در فریزر نگهداری می‌شدند. برای تشخیص جهش ITD از DNA ژنومیک استخراج شده با استفاده از پرایمرهای Forward primer 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC- Reverse primer 5'-CTTTTTTGACGGCAACCTCA GCA و مطابق برنامه PCR Initial denaturation 1x 95°C 5 min و annealing 1 min 66°C, denaturation 1min 95°C و final elongation 7 min 35x (elongation 90 sec 72°C و 72°C تکثیر شدند و با مشاهده مستقیم و مقایسه باندها با مارکر، وجود جهش بررسی شد.

در مورد جهش نقطه‌ای D835 با استفاده از پرایمرهای reverse primer 5'-GCAGCCTCACATTGC CCC- 3' و Forward primer 5'- CCG CCA GGA ACG TGC TTG- 3' و مطابق برنامه PCR Initial denaturation 1x 95°C و annealing 1min 60°C, denaturation 1min 95°C و final elongation 7 min 35x (elongation 90 sec 72°C و 72°C ژنوم استخراج شده بیمارانی تکثیر شده و mastermix شامل بافر ۵μL، dNTP ۱μL، MgCl₂ ۱/۵μL، ddH₂O ۱۰μL، پرایمر ۱μL و پرایمر ۱μL می‌باشد. برای یافتن جهش نقطه‌ای D835، براساس تکنیک RFLP و با استفاده از آنزیم ECORV بمدت ۱۶ ساعت در انکوباتور گذاشته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از رنگ‌آمیزی در اتیدیوم برماید و

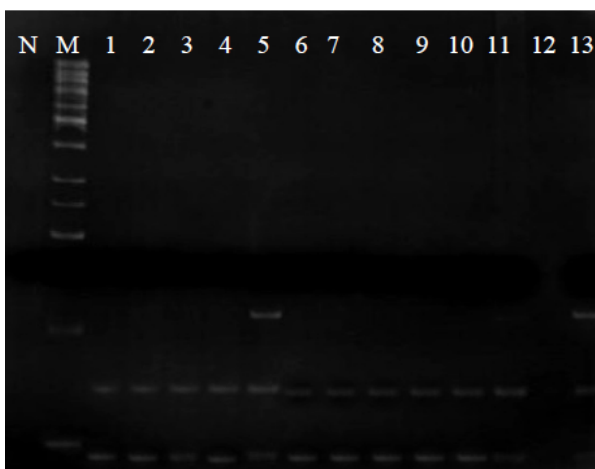
حتی لیگاند هم علی‌رغم تحریک گیرنده *flt3* نمی‌تواند باعث رشد مستقل از فاکتور این سلول‌ها شود، ولی در حالت جهش یافته شامل ITD (Internal Tandem duplication) یا جهش نقطه‌ای D835 (Point mutation) می‌تواند باعث تکثیر مستقل از فاکتور (IL-3) سلول‌ها شود (۶). هیچ تفاوتی در فعالیت بیولوژیکی ال‌های *flt3*/ITD که در مطالعات کشت سلولی یا مدل‌های حیوانی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند وجود ندارد، علیرغم تنوع قابل ملاحظه در طول تکرار اسیدهای آمینه که محدوده‌ای از ۳ تا ۵۰ اسید آمینه را شامل می‌شود (۸،۷). مشارکت بین جهش‌های *flt3* و بازآرایی‌های ژنی می‌تواند برای ایجاد فنوتیپ AML مورد نیاز باشند.

بروز زیاد ژن گیرنده *flt3* در حدود ۷۰ تا ۱۰۰ درصد از موارد AML (لوسمی میلوئیدی حاد) و درصد بالایی از موارد ALL (لوسمی لمفوئیدی حاد) اتفاق می‌افتد (۹-۱۲). جهش‌ها در ژن گیرنده *flt3* بیشترین فراوانی نقص ژنتیکی را شامل می‌شوند که در لوسمی میلوئیدی حاد تعریف شده‌اند و اصلی‌ترین این جهش‌ها، جهش شناخته شده تضاعف توالی داخلی (ITD) و جهش نقطه‌ای در موقعیت ASP835 می‌باشند (۱۴،۱۳).

جهش ITD در اگزون ۱۱ و ۱۲ و اینترون ۱۱ اتفاق می‌افتد و اولین بار حضور ITD در ناحیه مجاور غشایی (JM) توسط Nakao و همکارانش در سال ۱۹۹۶ میلادی گزارش شد. این جهش حدود ۲۵-۲۰ درصد از موارد AML را شامل می‌شود. جهش نقطه‌ای D835 هم در اگزون ۱۷ ژن گیرنده *flt3* در موقعیت اسید آمینه آسپارتیک اسید ۸۳۵ است. وضعیت جایگزینی ASP835Tyr بیشترین حالت می‌باشد (۱۵). داده‌ها نشان می‌دهد که حدود ۳۰ درصد از بیماران لوسمی میلوئید حاد جهش اکتسابی در ژن گیرنده *flt3* دارند که مرکب از ۲۴ درصد تضاعف توالی داخلی (ITD) و ۷-۶ درصد جهش نقطه‌ای در موقعیت اسید آسپارتیک ۸۳۵ می‌باشد. فراوانی کلی آن در بالغین مبتلا به AML، ۲۴ درصد گزارش شده است و فراوانی کمتری حدود ۱۵-۱۰ درصد را در کودکان به خود اختصاص می‌دهد، به عبارتی فراوانی این موتاسیون با افزایش سن افزایش می‌یابد. فراوانی ITD در ALL کمتر و حدود ۵-۱ درصد است. بدین ترتیب با توجه به آمار جهش‌های سایر ژن‌ها، ژن گیرنده *flt3* معمولی‌ترین ژن جهش یافته در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی است (۱۶).

به دلیل بالا بودن ارزش پیش‌آگهی دهنده جهش ژن گیرنده *flt3* در بیماران مبتلا به AML، تمرکز شدیدی بر توسعه داروهای بازدارنده فعالیت *flt3* وجود دارد.

۸ و ۶ مربوط به بیمار Early pre B cell هستند که جهش در آنها دیده می‌شود و ستون ۹ مربوط به بیمار AML-M2 و ستون شماره ۱۳ مربوط به بیمار AML-M1 می‌باشد. در تمام این موارد باند پایین‌تر (۳۲۸ bp) مربوط به کلون نرمال سلول‌ها و باند بالایی (بیش از ۳۲۸ bp) مربوط به کلون سلول‌های جهش یافته لوسمیک است که در توالی داخلی اگزون ۱۱ و ۱۲ و اینترون ۱۱ تضاعف و جایگزینی اتفاق افتاده و طول این ناحیه را از ۳۲۸bp بالاتر برده است. از ۹۱ بیمار مبتلا به ALL و AML، ۲ نفر جهش نقطه‌ای D835 داشتند که یک مورد آن در M3 و یک مورد دیگر در (ALL) Pre B cell مشاهده شد.



شکل ۲- مشاهده جهش D835 در ژن flt3 در زیرگروه‌های مختلف بیماران AML و ALL. N: کنترل منفی؛ M: مارکر

در شکل ۲ محصولات PCR شده اگزون ۱۷ ژن flt3 دیده می‌شوند که بر اساس تکنیک RFLP آنزیم ECORV به آنها اضافه شد. همانگونه که مشاهده می‌شود در تمام نمونه‌ها برش DNA اتفاق افتاده به جز در ستون‌های شماره ۵ و ۱۳ که در مقداری از محصولات برش DNA حادث نشده است. در حقیقت قطعات ۱۱۴ bp از محصولات PCR شده که به دو قطعه ۶۸ bp و ۴۶ bp برش داده شده‌اند، نشان می‌دهد که در این نمونه‌ها جهش اتفاق نیفتاده است و مکان برش آنزیم که GAT 3'...ATC...5' تغییر نکرده و آنزیم به راحتی محصولات PCR را به دو قطعه کوچکتر به صورت کامل تقسیم کرده است، ولی در بیمار شماره ۱۳ و ۵ باندهای مختلف دیده می‌شود که باند بالایی همان باند ۱۱۴ bp است که به دلیل وجود جهش مکان برش آنزیم تغییر نموده و آنزیم قادر به برش DNA نبوده است که نشان دهنده وجود جهش نقطه‌ای D835 است. دو باند پایین‌تر یعنی ۶۸ bp و ۴۶ bp ژن‌های کلون نرمال سلول در فرد

سپس شستشو با آب مقطر، وضعیت ژل‌ها بررسی و نمونه‌ها مورد مطالعه و عکس‌برداری قرار گرفت. در صورت وجود جهش و یا عدم آن باندهای مختلف قابل مشاهده است. در موارد ITD مثبت روش Sequencing جهت تأیید بکار برده شد.

جهت تعیین توالی، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، قطعه دارای موتاسیون PCR و محصول خالص‌سازی گردید و با استفاده از دستگاه تعیین توالی ABI 3130 تعداد ۵ نمونه از نمونه‌های مورد نظر سکانس گردید. از نرم افزار Chromas جهت خواندن نمودارها استفاده گردید و با مقایسه توالی نمونه سالم، جهش‌ها از نوع اضافه شدن‌ها (Insertions) تشخیص داده شد.

یافته‌ها

از ۹۱ بیمار مورد بررسی، ۷ نفر (۷/۷ درصد) جهش ITD داشتند، بدین صورت که از یک مورد M0 در هیچ‌یک، از ۳ مورد M1 در یک نفر، از ۳ مورد M2 در یک نفر، از ۲ مورد M3 در هر ۲ نفر، از ۳ مورد M4 در هیچ‌یک، از ۲ مورد M5 در هیچ‌یک، از ۳ مورد M6 در هیچ‌یک، از ۳۹ مورد Early pre B cell در سه نفر، از ۱۴ مورد Pre B cell در هیچ‌یک، از ۵ مورد B cell در هیچ‌یک و از ۱۵ مورد T cell در هیچ‌یک جهش ITD مشاهده شد. شکل ۱ تعدادی از این افراد را نشان می‌دهد.



شکل ۱- مشاهده جهش ITD در ژن flt3 در زیر گروه‌های مختلف بیماران مبتلا به لوسمی‌های حاد. N: کنترل منفی؛ M: مارکر

در شکل ۱ با توجه به مارکر، قطعات ۳۲۸ bp دیده می‌شوند که مربوط به اگزون ۱۱ و ۱۲ و اینترون ۱۱ ژن flt3 می‌باشد. نمونه‌های فوق مربوط به زیرگروه‌های متنوع طبقه‌بندی FAB هستند که ستون ۲ نمونه بیماران AML زیرگروه M3 و ستون

نقطه‌ای D835 داشتند که توزیع آنها در زیرگروه‌های مختلف FAB یکسان نبود. در این مطالعه مورد مثبتي از وجود جهش ITD در بیماران زیرگروه M1، M2، M3 و Early pre B cell دیده شد.

جهش مورد مطالعه در این تحقیق در پاتوژن لوسمی‌ها اهمیت بسزایی دارد. جهش در گیرنده *flt3* متعلق به گیرنده‌های تیروزین کینازی کلاس III می‌باشد و منجر به تکثیر بدون کنترل سلول‌های لوسمی می‌شود. جهش تضعف توالی داخلی (ITD) معمولاً در مطالعات بزرگتر و گسترده با پیش‌آگهی بد و ایجاد یک لوسمی مقاوم به درمان‌های رایج گزارش شده است (۱۷).

در سه سری مطالعات بر روی کودکان مبتلا به AML دارای جهش در ژن گیرنده *flt3* پیش‌آگهی بد گزارش شده است. بزرگترین این مطالعات، گزارش ۹۱ بیماری بود که توسط گروه CCG پیگیری شده بود. پانزده مورد از ۹۱ بیمار مبتلا به AML (۱۶/۵ درصد) جهش‌های *flt3*/ITD داشتند. پس‌رفت بیماری در بیماران *flt3*/ITD⁺ ۴۰ درصد و در بیماران *flt3*/ITD⁻ ۷۳ درصد بود ($p=0/005$). ۸ سال بقای فارغ از اتفاق (EFS) در دو گروه به ترتیب ۷ درصد در برابر ۴۴ درصد بود ($p=0/002$). بیشترین فراوانی در زیرگروه M3 بود. جهش‌های *flt3*/ITD در بزرگسالان اغلب بر یک پیش‌آگهی بد دلالت دارد (۱۹، ۱۸).

مطالعه ما نشان داد که جهش‌های *flt3*/ITD در ۲۳/۵ درصد موارد لوسمی میلوئیدی حاد و ۴ موارد لوسمی لنفوئیدی حاد کودکان اتفاق می‌افتد و جدا از کمیت تعداد نوکلئوتیدی که اضافه و یا تکرار شده‌اند وجود هر تعداد از اسید آمینه باعث تغییر شکل فضایی پروتئین شده و اثر ناحیه مجاور غشایی در جلوگیری از فعالیت اتوفسفوریلاسیون گیرنده از بین می‌رود. این تکرارها می‌توانند در اگزون ۱۱، ۱۲ و اینترون ۱۱ از ژن *flt3* باشد و یا در مرز مشترک بین اگزون و اینترون ۱۱ اضافه شوند (۲۰، ۱۷). جهش دیگری که در این مطالعه بررسی شد، جهش در اگزون ۱۷ ژن گیرنده *flt3* بود. این جهش یک جهش نقطه‌ای (point mutation) است که در آن اسید آمینه اسید آسپارتیک در موقعیت ۸۳۵ (D835) با اسید آمینه‌های دیگری از قبیل تیروزین، والین و... جایگزین می‌شود که این استخلاف منجر به ایجاد لوپ فعال‌سازی (activation Loop) می‌گردد (۲۱-۲۳). در ۹۱ بیمار مبتلا به لوسمی‌های حاد مطالعه ما در ۲ نفر این جهش شناسایی شد که ۶ درصد موارد AML و ۱/۴ درصد موارد ALL بود. به دلیل کم بودن میزان جهش و همچنین بیماران مورد مطالعه ما به طور دقیق

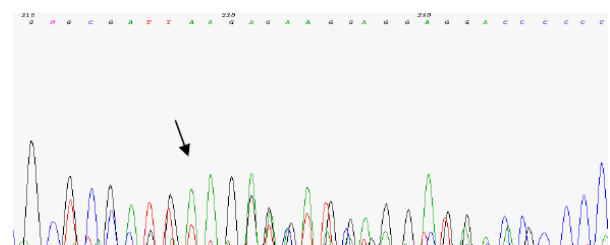
مبتلا به ALL و AML هستند که جهش در این کلون‌ها اتفاق نیفتاده است. جدول ۱ اطلاعات ۸ بیماری که این جهش‌ها در آنها رخ داده است را نشان می‌دهد.

جدول ۲- اطلاعات بیماران لوسمیک دارای جهش ITD* و D835.

سن (سال)	جنس	بیماری	کاربوتا پ	ITD	D835
۹	مونث	AML/M2 [†]	نا مشخص	+	-
۱۷	مونث	Early Pre Bcell	-	-	+
۲	مونث	Early Pre Bcell	طبیعی	+	-
۱۵	مذکر	AML/M1	-	+	-
۷	مذکر	AML/M3	طبیعی	+	-
۱۳	مذکر	Early Pre Bcell	48,XY,+8 t(15;17)(q22;q21), +21[15]/ 46,X Y[5]	+	-
۴	مذکر	AML/M3	-	+	+
۲	مونث	Early Pre Bcell	-	+	-

ITD* : Internal Tandem duplication
† AML : Acute Myeloblastic Leukemia

پس از تعیین ۷ نمونه واحد ژن جهش یافته ITD، ما ۴ مورد را برای بررسی بیشتر تعیین توالی کردیم و نتایج متفاوتی برای هر نمونه بدست آمد. بدین ترتیب که اضافه شدن‌های (Insertions) ۲۷، ۲۷، ۴۷ و ۶۳ نوکلئوتیدی مشاهده شد. نمونه‌ی شماره ۳۹ اضافه شدن ۶۳ نوکلئوتیدی، شماره ۵۳ اضافه شدن ۲۷ نوکلئوتیدی، شماره ۸۳ اضافه شدن ۲۷ نوکلئوتیدی و شماره ۸۹ اضافه شدن ۴۷ نوکلئوتیدی را نشان دادند. در شکل ۳، نتیجه تعیین توالی در نمونه شماره ۸۳ که با فلش مشخص شده است، نشان دهنده نقطه شروع جهش می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳- نتیجه توالی بیماران لوسمیک دارای جهش ITD و D835.

بحث

در مطالعه حاضر، جهش ITD در ۷ فرد (۷/۷ درصد) مبتلا به لوسمی حاد مشاهده گردید و ۲ بیمار (۲/۲ درصد) نیز جهش

حاد (AML) و ۵-۱ درصد کودکان مبتلا به لوسمی لنفوئیدی حاد یافت می‌شود و به طور معنی‌داری با یک برون‌ده ضعیف و پیش‌آگهی بد در مبتلایان به ALL و AML همراه است. در مورد جهش نقطه‌ای D835 در ژن flt3 هم باید گفت که در ۴ درصد از موارد ALL و AML بیماران مورد مطالعه ما وجود داشت. در گزارشات مختلف میزان آن حدود ۵ درصد است و توزیع این جهش‌ها در زیر گروه‌های مختلف FAB متفاوت می‌باشد. پیگیری مناسب این جهش‌ها (D835, ITD) در ژن گیرنده flt3 و اجرایی کردن روش‌های تشخیص مولکولی آنها به صورت روتین منجر به یک تصمیم‌گیری مناسب در درمان لوسمی میلوئیدی و لنفوئیدی حاد شده و از ایجاد مقاومت به درمان و عودهای مکرر جلوگیری بعمل می‌آورد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران گروه هماتولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران قدردانی می‌شود.

نمی‌توانیم رابطه‌ای بین وجود این جهش و زیر گروه‌های FAB تعریف کنیم. در مطالعه‌ای، جایگزینی ASP835 در ۳۰ مورد از ۴۲۹ کودک مبتلا به AML (۷ درصد)، ۱ مورد از ۲۹ بیمار مبتلا به MDS (حدود ۳ درصد) و ۱ مورد از ۳۶ بیمار مبتلا به ALL (۳ درصد) مشاهده شد (۲۵، ۲۴). در مطالعه‌ای مشابه، ۷ مورد از ۳۵ بیمار مبتلا به AML (۷ درصد) این جهش را داشتند (۲۶).

بروز جهش نقطه‌ای D835 به طور معنی‌داری کمتر از جهش ITD در ژن flt3 است، ولی هر دو جهش با فراوانی بالایی در AML یافت می‌شوند. در مطالعه‌ای که انجام شد مواردی از وجود هر دو جهش ITD و D835 در ژن flt3 در یک بیمار یافت گردید. حضور این دو جهش در یک بیمار قبلاً گزارش شده است و با مطالعات تعیین توالی (sequencing) مشخص شد که این دو جهش بر روی یک آلل مشابه نبوده‌اند.

در این مطالعه جهش ITD در حدود ۷/۷ درصد بیماران وجود داشت که توزیع یکسانی در میان زیرگروه‌های FAB در طبقه‌بندی لوسمی‌ها نداشت. مطالعات نشان داده جهش flt3/ITD در ۲۰-۱۰ درصد از کودکان مبتلا به لوسمی میلوئیدی

REFERENCES

1. Donald S, ed. FLT3 mutations: biology and treatment. Johns Hopkins: American Society of Hematology; 2006. p.1120-28.
2. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. Blood 2005; 82: 1110-19.
3. deLapeyriere O, Naquet P, Planche J, Marchetto S, Rottapel R, Gambarelli D, et al. Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. Differentiation 2005; 58: 351-59.
4. Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. Crit Rev Oncog 2003; 4: 595-613.
5. Agnes F, Shamon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. Gene 2003; 145: 283-88.
6. Birg F, Rosnet O, Carbuca N, Birnbaum D. The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. Leuk Lymphoma 2003; 13: 223-27.
7. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. Oncogene 2000; 19: 624-31.
8. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. Leukemia 1998; 12: 1333-37.
9. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood 2000; 96: 3907-14.
10. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. Blood 2002; 80: 2584-93.
11. Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, et al. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. Blood 2002; 86: 4105-14.

12. DaSilva N, Hu ZB, Ma W, Rosnet O, Birnbaum D, Drexler HG. Expression of the FLT3 gene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 2002; 8: 885-88.
13. Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJP. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood* 2001; 85: 751-56.
14. Zwaan CM, Kaspers GJL, Pieters R, Brizzi MF, Severino A, Garetto L, et al. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB-types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 2879-86.
15. Moriyama Y, Tsujimura T, Hashimoto K. Role of aspartic acid 814 in the function and expression of c-kit receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 3347-50.
16. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 19-24.
17. Choi Y, Kim HJ, Park BH, Min WS, Kim CC. Novel mutations in the FLT3 gene in adult patients with refractory acute myeloid leukemia. *BGH* 2005; 108: 141-43.
18. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-18.
19. Iwai T, Yokota S, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia* 1999; 13: 38-43.
20. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000; 111: 190-95.
21. Williams DE. In vivo effects of *flt3* ligand. *Blood* 1997; 90: 5022a.
22. Frohling S, Breitnick J, Schlenk R, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. FLT3 internal tandem duplications and survival in adult acute myeloid leukemia: analysis of 188 intensively treated patients. *Blood* 2001; 89: 717a.
23. Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *Flt3* gene. *Leukemia* 2000; 14: 675-83.
24. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kadera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97: 2434-39.
25. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; 30: 41-47.
26. Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, et al. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol* 2000; 108: 322-30.