

بررسی جهش‌های ژن **FLT3** در کودکان مبتلا به لوسومی‌های حاد

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

^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 لوسومیک 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 لوسومی‌های حاد بود.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی، ۹۱ کودک مبتلا به لوسومی‌های 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 آگزون ۱۷ ارزیابی شدند. جهش *ITD* در گیرنده *flt3* با انجام *PCR* (Polymerase chain reaction) در آگزون ۱۱ و ۱۲ و اینترون ۱۱ انجام شد. در مورد جهش نقطه‌ای در آگزون ۱۷، بعد از انجام *PCR* روی *DNA* ژیومیک این بیماران، محصولات *PCR* شده‌ی بیماران با استفاده از آنزیم محدود الاتر *ECORV* و تکنیک *RFLP* بعد از انجام *PCR* روی *DNA* ژیومیک این بیماران، محصولات *PCR* شده‌ی بیماران با استفاده از آنزیم محدود الاتر *ECORV* و تکنیک *RFLP* مثبت، روش *Sequencing* (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 لوسومی 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 لوسومی‌های حاد کودکان شیوع بالایی دارد. بنابراین می‌توان با تشخیص مولکولی این جهش‌ها، مستقل از طبقه‌بندی *FAB* و قبل از شروع درمان، در مورد پرتوکل درمانی صحیح تصمیم گرفت.

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

مقدمه

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 (۲۱، ۱۳q12.2). این ژن در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۳ قرار گرفته و در سلول‌های خونساز نابالغ، جفت، گنادها و مغز بیان می‌شود (۳). لیگاند *flt3* (FL) هم در اکثریت رده‌های سلولی بیان می‌شود (۴، ۵، ۶). در حالت طبیعی

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

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 تیروزوزین 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 ایمونوفوتیپ از طریق فلوسیتومتری بررسی شد. نمونه‌های خون از بخش خون بیمارستان‌های علی اصغر، بهرامی، مرکزی 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 واستات امونیوم 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'-GCAATTAGGTATGAAAGCCAGC-
Reverse primer 5'-CTTTTTGACGGCACACCTCA GCA

و مطابق برنامه ۱x ۹۵°C ۵ min PCR annealing ۱ min ۶۶°C denaturation ۱min ۹۵°C و final elongation ۷ min C ۳۵x (elongation ۹۰ sec ۷۲°C ۷۲°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'

Forward primer 5'- CCG CCA GGA ACG TGC TTG-3' و

Initial denaturation ۱x ۹۵°C PCR annealing ۱min ۶۰°C denaturation ۱min ۹۵°C و ۵min final elongation ۷ min ۳۵x (elongation ۹۰ sec ۷۲°C

۷۲°C ژنوم استخراج شده بیماران تکثیر شده و

شامل با فرمیل ، ۱µL ddH₂O ، ۱µL MgCl₂ ، ۱µL dNTP ، ۱/۵µL MgCl₂ ، ۱µL RFLP و با استفاده از آنزیم

ECORV بمدت ۱۶ ساعت در انکوباتور گذاشته و در دمای ۳۷

درجه‌سانتیگراد 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 D835 Point mutation (Point mutation) flt3 می‌تواند باعث تکثیر مستقل از فاکتور IL-3 (IL-3) سلول‌ها شود (۶). هیچ تفاوتی در فعالیت بیولوژیکی الـهای 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 ۳۰۰ تا ۵۰۰ اسید آمینه را شامل می‌شود (۷،۸). مشارکت بین جهش‌های flt3 و بازآرایی‌های ژنی می‌توانند برای ایجاد فوتیپ AML مورد نیاز باشند.

بروز زیاد ژن گیرنده flt3 در حدود ۷۰ تا ۱۰۰ درصد از موارد ALL (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 (۱۳،۱۴).

جهش ITD در اگزون ۱۱ و اینترنون ۱۲ و اینترنون 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 ۲۰-۲۵ 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 ۶-۷ درصد جهش نقطه‌ای در موقعیت اسید اسپارتیک 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 ۱-۵ 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.

جهش‌های ژن fLT3 در کوکان مبتلا به لوسمی‌های حاد

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 ۳۲۸ bp بالاتر برده است. از ۹۱ بیمار مبتلا به ALL و AML، ۲ نفر جهش نقطه‌ای 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 ALL و AML. N: کنترل منفی؛ M: مارکر

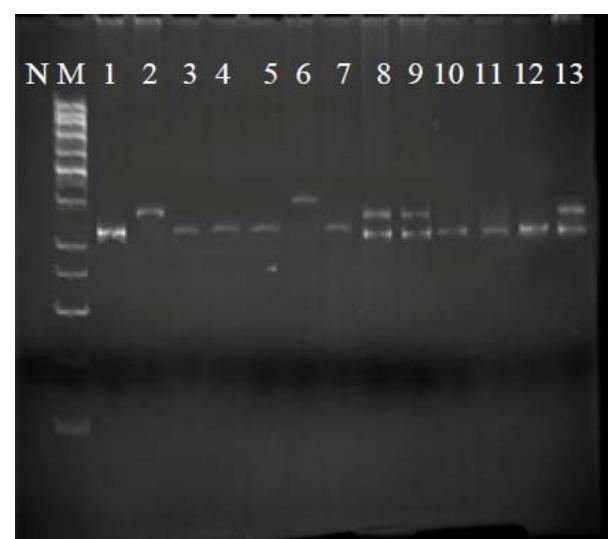
در شکل ۲ محصولات PCR شده اگزون ۱۷ ژن fLT3 دیده می‌شوند که بر اساس تکنیک RFLP آنزیم ECORV به آنها اضافه شد. همانگونه که مشاهده می‌شود در تمام نمونه‌ها برش DNA اتفاق افتاده به جز در ستون‌های شماره ۵ و ۱۳ که در مقداری از محصولات برش DNA حادث نشده است. در حقیقت قطعات ۱۱۴ bp از محصولات PCR شده که به دو قطعه ۶۸ و ۴۶ bp برش داده شده‌اند، نشان می‌دهد که در این نمونه‌ها جهش اتفاق نیفتاده است و مکان برش آنزیم که GAT ۳'...ATC ۵' 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 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 ۴۶ bp و ۶۸ bp اگزون‌های کلون نرمال سلول در فرد

سپس شیستشو 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 مشبت روشن 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 زیرگروههای 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 مثبتی از وجود جهش ITD در بیماران زیرگروه ۱، M2، M3 و pre B می‌باشد. در دیده شد.

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

در سه سری مطالعات بر روی کودکان مبتلا به AML دارای جهش در زن 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. پس رفت 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 لوسومی میلیونی حاد و ۴ موارد لوسومی 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 اینتررون ۱۱ از زن flt3 باشد و یا در مرزمشترک بین اگزون و اینتررون ۱۱ اضافه شوند (۲۰، ۱۷). جهش دیگری که در این مطالعه بررسی شد، جهش در اگزون ۱۷ زن 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 لوب فعال‌سازی (activation Loop) می‌گردد (۲۱-۲۳). در ۹۱ بیمار مبتلا به لوسومی‌های حاد مطالعه ما در ۲ نفر این جهش شناسایی شد که در 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

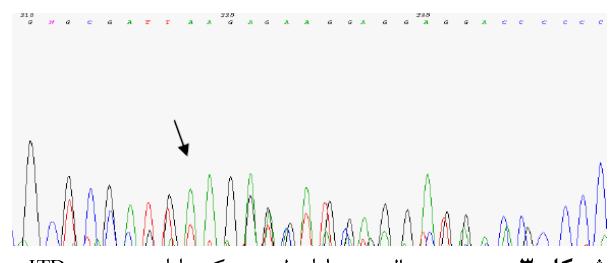
مبتلا ALL و AML هستند که جهش در این کلون‌ها اتفاق نیفتاده است. جدول ۱ اطلاعات ۸ بیماری که این جهش‌ها در آنها رخ داده است را نشان می‌دهد.

جدول ۲ - اطلاعات بیماران لوسومیک دارای جهش^{*} ITD و D835

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

Internal Tandem duplication :ITD^{*}
Acute Myeloblastic Leukemia :AML[†]

پس از تعیین ۷ نمونه واحد زن 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) ۳۹، ۴۷، ۲۷ و ۶۳ نوکلئوتیدی مشاهده شد. نمونه‌ی شماره ۲۷ 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 لوسومیک دارای جهش^{*} ITD و D835

بحث

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

حاد (AML) و ۱-۵ درصد کودکان مبتلا به لوسومی لنفوئیدی حاد یافت می‌شود و به طور معنی‌داری با یک بروون‌ده 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 موجود 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 (ITD, D835) در ژن flt3 و اجرایی کردن روش‌های تشخیص مولکولی آنها به صورت روتین منجر به یک تضمیم‌گیری مناسب در درمان لوسومی میلوئیدی ولنفوئیدی 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.

REFERENCES

- Donald S, ed. *FLT3 mutations: biology and treatment*. Johns Hopkins: American Society of Hematology; 2006. p.1120-28.
- 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.
- deLapeyrière 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.
- Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev Oncog* 2003; 4: 595-613 .
- Agnes F, Shamoony 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.
- Birg F, Rosnet O, Carbuccia N, Birnbaum D. The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2003; 13: 223-27 .
- 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.
- 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.
- 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.
- Birg F, Courcou M, Rosnet O, Bardin F, Pébusque 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.
- 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.

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 D835 و ITD در ژن flt3 در یک بیمار یافت گردید. حضور این دو جهش در یک بیمار قبل از 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 زیر گروه‌های FAB در طبقه‌بندی لوسومی‌ها نداشت. مطالعات نشان داده جهش flt3/ITD در ۱۰-۲۰ درصد از کودکان مبتلا به لوسومی میلوئیدی

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, Breituck 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, Kiyo H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera 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.