

تشخیص جهش‌های گیرنده FLT3 شامل تضاعف توالی داخلی و جهش نقطه‌ای

اسید آسپارتیک D835 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد

چکیده

زمینه و هدف: اساس مولکولی لوسمی میلوئیدی حاد (Acute Myeloid Leukemia - AML)، موتاسیون در ژن‌های تنظیم‌کننده تکثیر و تمایز سلولی می‌باشد. جهش در ژن گیرنده تیروزین کینازی FLT3 از شایع‌ترین جهش‌های ایجادشده در AML می‌باشد که موجب تکثیر و بقاء غیرطبیعی سلول‌های لوکمیک می‌شود. وجود جهش تضاعف توالی داخلی (Internal Tandem duplication) ITD و همچنین جهش نقطه‌ای D835 ژن FLT3 یک پیش‌آگهی بد را به همراه دارند. هدف از این مطالعه تشخیص و تعیین فرکانس این جهش‌ها در بیماران مبتلا به AML بود.

روش بررسی: ۱۰۱ بیمار مبتلا به AML با روش مشاهده‌ای-توصیفی از نظر جهش ITD در اگزون ۱۱ و ۱۲ و ایترون ۱۱ و جهش نقطه‌ای D835 در اگزون ۲۰ ژن گیرنده FLT3 با استفاده از تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) مورد مطالعه قرار گرفتند. جهش ITD بعد از حرکت باندها حاصل از PCR ژن گیرنده FLT3 روی ژل آکرلامید ۸٪، و مقایسه با مارکر بر روی این ژن مشخص گردید. در مورد جهش نقطه‌ای D835، بعد از PCR روی DNA ژنومیک این بیماران، محصولات به دست آمده با استفاده از آنزیم محدودالایتر ECORV و تکنیک RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: جهش ITD در ۱۸٪ مبتلایان به AML مورد مطالعه، مشاهده گردید که برای زیرگروه‌های مختلف طبقه‌بندی FAB این نتایج متفاوت بود. ۶٪ هم، جهش نقطه‌ای D835 داشتند که توزیع آن‌ها در زیرگروه‌های مختلف FAB یکسان نبود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که جهش‌های ژن گیرنده FLT3 درصداً قابل توجهی از بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد را شامل می‌شود که می‌توان با تشخیص مولکولی این جهش‌ها قبل از شروع درمان، در مورد پروتکل درمانی صحیح تصمیم گرفت.

کلیدواژه‌ها: ۱- لوسمی میلوئیدی حاد، ۲- ژن گیرنده تیروزین کینازی FLT3، ۳- تضاعف توالی داخلی ۴- اسید آسپارتیک (D835)، ۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

*دکتر فرهاد ذاکر I

محمد حسین محمدی II

دکتر احمد کاظمی III

معصومه بخشایش IV

مقدمه

لوسمی میلوئیدی حاد با افزایش تعداد میلو بلاست‌ها و سلول‌های نارس در مغز استخوان و خون محیطی همراه است و عوامل مختلفی در ایجاد آن دخیل هستند که جهش‌های تأثیرگذار در تکثیر و تمایز سلولی از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد. ژن گیرنده FLT3 (گیرنده تیروزین کینازی شبه FMS) که اغلب تحت عنوان flk-2 (کیناز کبدی جینی-2) شناخته می‌شود، از گیرنده‌های خارج سلولی پیش‌سازهای خونی و متعلق به خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی کلاس III (RTKIII) می‌باشد که از ۵ ناحیه شبه ایمنوگلوبولین 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^(۱). این ژن، در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۳ (13q12,2) قرار گرفته و در سلول‌های خون‌ساز نابالغ، جفت، گنادها و مغز بیان می‌شود^(۲). این گیرنده با سایر تیروزین کینازها از قبیل KIT و PDGFR مشابهت دارد.^(۳) بروز زیاد ژن گیرنده FLT3 در حدود ۷۰٪ تا ۱۰۰٪ از موارد AML و

لوسمی میلوئیدی حاد با افزایش تعداد میلو بلاست‌ها و سلول‌های نارس در مغز استخوان و خون محیطی همراه است و عوامل مختلفی در ایجاد آن دخیل هستند که جهش‌های تأثیرگذار در تکثیر و تمایز سلولی از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد. ژن گیرنده FLT3 (گیرنده تیروزین کینازی شبه FMS) که اغلب تحت عنوان flk-2 (کیناز کبدی جینی-2) شناخته می‌شود، از گیرنده‌های خارج سلولی پیش‌سازهای خونی و متعلق به خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی کلاس III

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه آقای محمدحسین محمدی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد هماتولوژی با راهنمایی دکتر فرهاد ذاکر و مشاوره دکتر احمد کاظمی، سال ۱۳۸۵.

(I) دانشیار و متخصص هماتولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه‌های شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول)

(II) کارشناس ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران، تهران، ایران

(III) دانشیار و متخصص هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران، تهران، ایران

(IV) کارشناس ارشد آنکلسناسی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران، تهران، ایران

گرفتند. از این نمونه‌ها، جهت استخراج DNA از تکنیک پروتئیناز K و استات آمونیوم اشباع استفاده شد. لوله‌های حاوی خون تا زمان تخلیص DNA در فریزر نگهداری می‌شوند. برای تشخیص ITD از DNA ژنومیک استخراج شده، با استفاده از پرایمرهای (زیست باران) $10\ \mu\text{M}$

5'-GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC-

Reverse primer و Forward primer:

5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC-

و مطابق برنامه Initial denaturation PCR یک دوره به

مدت ۵ دقیقه در 95°C و سیکل تکراری که هر سیکل شامل denaturation به مدت ۱ دقیقه در 95°C و annealing ۱ دقیقه در 66°C و elongation به مدت ۹۰ ثانیه در 72°C و در پایان final elongation به مدت ۷ دقیقه در 72°C انجام شد. قبل از شروع PCR، master mix (سینا ژن) شامل (50mM, dNTP2mM)، Taq polymerase ($5\ \mu\text{L}$) (واحد در میکرولیتر) (سینا ژن) و ($200-500\ \text{ng}/\mu\text{L}$) DNA در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (μL) تهیه شد. پس از PCR، با مشاهده مستقیم و مقایسه باندها با مارکر Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (سینا ژن) بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۸٪ به مدت ۳-۴ ساعت در ولتاژ ۱۵۰ وجود جهش ITD بررسی شد. در مورد جهش نقطه‌ای D835، با استفاده از پرایمرهای $10\ \mu\text{M}$ (زیست باران) reverse primer 5' و Forward primer 3' CCC-GCA GCC TCA CAT TGC 5' و مطابق برنامه PCR و مواد ذکر شده در بالا (در مورد جهش ITD) ژنوم استخراج شده بیماران تکثیر شد. برای یافتن جهش نقطه‌ای D835 و براساس تکنیک RFLP و با استفاده از آنزیم ($10\ \text{u}/\mu\text{L}$) ECORV (سیناژن) به مقدار $1\ \mu\text{L}$ به ازای هر $26\ \mu\text{L}$ از محصولات PCR و $3\ \mu\text{L}$ R buffer (سیناژن) به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور

در درصد بالایی از موارد ALL (لوسمی لمفوئیدی حاد) اتفاق می‌افتد^(۸-۹). لیگاند FLT3 (FL) هم در اکثریت رده‌های سلولی بیان می‌شود^(۹). جهش‌ها در ژن گیرنده FLT3 بیشترین فراوانی نقص ژنتیکی را شامل می‌شوند که در لوسمی میلوئیدی حاد تعریف شده‌اند. اصلی‌ترین این جهش‌ها، جهش شناخته شده تضاعف توالی داخلی (ITD) و جهش نقطه‌ای در موقعیت D835 می‌باشند. نتیجه این جهش‌ها، فعالیت تیروزین کینازی مداوم و پایدار گیرنده FLT3 بدون تحریک به وسیله لیگاند است که تکثیر مستقل از فاکتور رشد دارند.^(۱۰-۱۱)

جهش ITD حدود ۲۵٪-۲۰٪ از موارد AML را شامل می‌شود. جهش نقطه‌ای D835 هم در اگزون ۲۰ ژن گیرنده FLT3 در موقعیت اسید آمینه آسپارتیک اسید 835 است؛ که حدوداً در ۱۰-۶٪ بیماران AML مشاهده می‌شود.^(۱۲، ۱۳) به دلیل پیش‌آگهی بد در بیماران مبتلا به AML دارای جهش در ژن گیرنده FLT3، تحقیقات زیادی روی توسعه داروهای بازدارنده فعالیت تیروزین کینازی FLT3 وجود دارد.^(۱۳) تضاعف توالی داخلی ITD در اگزون^(۱۱، ۱۲) و اینترون ۱۱ اتفاق می‌افتد و بین ۹ تا ۱۸۰ نوکلئوتید (۳ تا ۶۰ اسید آمینه) در این نواحی افزوده می‌شود که باعث افزایش طول ژن می‌گردند.^(۱۶-۱۴)

با توجه به گفته‌های فوق و اینکه تاکنون مطالعات چندانی بر روی این جهش‌ها در ایران انجام نشده است، هدف از انجام این پژوهش اجرائی کردن تشخیص جهش‌های گیرنده FLT3 در میان افراد مبتلا به AML بود.

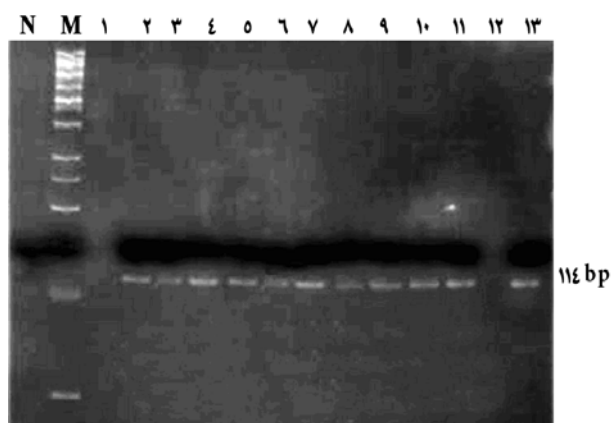
روش بررسی

نمونه‌های خونی تعداد ۱۰۱ نفر از بزرگسالان مبتلا به AML با زیرگروه‌های مختلف طبقه‌بندی FAB تهیه شده از بخش خون بیمارستان‌های دکتر شریعتی و مرکز فلوسیتومتری سازمان انتقال خون (که مراکز رفرنس هستند) با روش مشاهده‌ای-توصیفی مورد مطالعه قرار

در تمام این موارد با شرایط یکسان و پرایمرهای اختصاصی واحد، ۲ قطعه مختلف باند تکثیر شده است که باند پایین‌تر (۳۶۰ bp) مربوط به کلون نرمال سلول‌ها و باند بالایی (< ۳۶۰ 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 ۳۶۰ bp بالاتر برده است.

ب: بررسی جهش نقطه‌ای D835

از ۱۰۱ بیمار مبتلا به AML، میزان ۶٪ جهش نقطه‌ای (D835) را داشتند که فقط در بیماران M2 و M3 و M5 این جهش مشاهده شد. باندهای موجود در شکل شماره ۲، محصولات PCR اگزون ۲۰ (محل وقوع D835) را قبل از مواجهه با آنزیم محدودالایتر ECORV در تعدادی از این افراد را نشان می‌دهد



شکل شماره ۲- تایید PCR ژن طبیعی FLT3 (اگزون ۲۰) که جهش نقطه‌ای D835 در این ناحیه اتفاق می‌افتد (مرحله قبل از اضافه کردن آنزیم) M = Marker N = Negative control

در شکل شماره ۳ محصولات PCR شده اگزون ۲۰ ژن FLT3 دیده می‌شوند که بر اساس تکنیک RFLP، آنزیم ECORV به آن‌ها اضافه شده است.

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

گذاشته و در دمای ۳۷°C انکوبه می‌شوند. سپس محصولات RFLP را در روی ژل پلی‌آکریلامید ۸٪ در ولتاژ ۱۳۰ به مدت ۲ ساعت الکتروفورز می‌شوند. پس از رنگ‌آمیزی در اتیدیوم برماید و سپس شستشو با آب مقطر، وضعیت ژل‌ها بررسی شده و نمونه‌ها جهت مطالعه و برای عکسبرداری در دستگاه UV قرار داده می‌شوند. در صورت وجود جهش و یا عدم آن، باندهای مختلف قابل مشاهده است.

یافته‌ها

الف: بررسی تضاعف توالی داخلی (ITD)

از ۱۰۱ بیمار مبتلا به AML مورد بررسی در این مطالعه با زیرگروه‌های مختلف FAB (به جزء M6 و M7) ۱۸٪ تضاعف توالی داخلی (ITD) را داشتند، که ۱۶٪ آن‌ها زیرگروه M3 بودند. در شکل شماره ۱ تعدادی از این افراد دیده می‌شوند که در مورد آن‌ها بعد از هر شکل توضیح داده شده است.



شکل شماره ۱- جهش ITD در ژن FLT3 در زیرگروه‌های مختلف بیماران AML M = Marker N = Negative control

در شکل شماره ۱ با توجه به مارکر، قطعات ۳۶۰ 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 ۱ و ۳ نمونه بیماران AML زیرگروه M3 هستند که جهش در آن‌ها دیده می‌شود. ستون ۹ مربوط به بیمار AML-M2 و ستون شماره ۱۴ مربوط به بیمار AML-M4 می‌باشد.

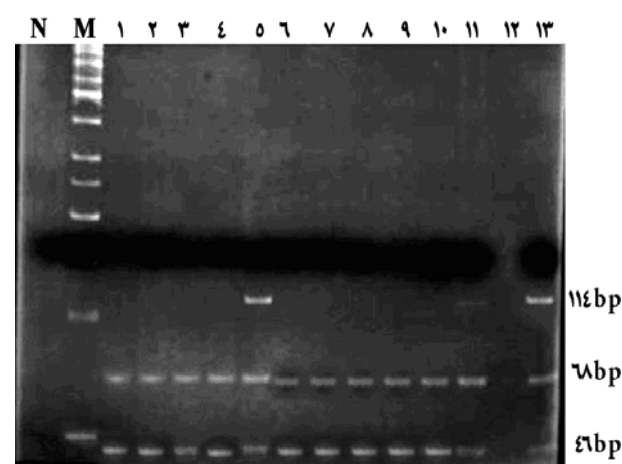
پرگنوز بد گرایش دارد^(۱۸).

در این مطالعه برای یافتن میزان بروز جهش‌های تضاعف توالی داخلی ITD و جهش نقطه‌ای D835 با تکنیک PCR و RFLP، ۱۰۱ فرد بزرگسال مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد مورد مطالعه قرار گرفتند. از ۱۰۱ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد، ۱۸٪ تضاعف توالی داخلی را نشان دادند که پراکندگی یکسانی در زیرگروه‌های FAB نداشتند. بیشترین موارد در زیرگروه M3 مشاهده شد. در این مطالعه، مورد مثبتی از وجود جهش ITD در بیماران زیرگروه M0 و M1 و M5 دیده نشد.

بررسی این پژوهش نشان می‌دهد که جهش‌های FLT3/ITD در حدود ۱۸٪ از لوسمی میلوئیدی حاد بزرگسالان اتفاق می‌افتد و تعدادی نوکلئوتید اضافه و یا تکرار می‌شود و در نتیجه وجود هر تعداد از اسید آمینه اضافی باعث تغییر شکل فضایی پروتئین شده و نهایتاً اثر ناحیه مجاور غشایی پروتئین را در جلوگیری از فعالیت اتوفسفوریلاسیون گیرنده از بین می‌برد. این تکرارها می‌توانند در اگزون ۱۱ و ۱۲ و اینترون ۱۱ از ژن FLT3 باشد و یا در مرز مشترک بین اگزون و اینترون ۱۱ اضافه شوند.^(۲۰،۱۹)

ترکیبی از همه مطالعاتی که تا امروز گزارش شده است شامل فراوانی کلی از FLT3/ITD در AML بزرگسالان در ۲۸۵ مورد از ۱۵۹۵ بیمار (حدود ۲۴٪) بوده است. گزارش‌های دیگر حاکی از آن است که FLT3/ITD در ۲۰٪ تا ۳۰٪ موارد AML و همچنین ۷٪ تا ۱۰٪ این بیماران رخ می‌دهد.^(۲۱،۲۲) FLT3/ITD در همه زیرگروه‌های FAB با بیشترین نسبت در AML-M3 دیده شده است که با مطالعه حاضر منطبق می‌باشد. کمترین میزان در AML-M2 گزارش شده است.^(۲۱،۲۲) البته در گزارش‌های مختلف، این توزیع یکسان نیست، و به طور کلی جهش‌های FLT3/ITD در بزرگسالان اغلب با یک پیش‌آگهی بد دلالت دارد.^(۲۰-۲۳)

قطعه ۶۸ bp و ۴۶ bp برش داده شده‌اند، نشان می‌دهد که در این نمونه‌ها جهش اتفاق نیفتاده است و مکان برش آنزیم که (۳'...GAT ATC...۵') تغییر نکرده و آنزیم به راحتی محصولات PCR را به دو قطعه کوچک‌تر به صورت کامل تقسیم کرده است، ولی در بیماران شماره ۵ و ۱۳ 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 نشان‌دهنده وجود جهش نقطه‌ای D835 است. دو باند پایین‌تر یعنی ۶۸ bp و ۴۶ bp، ژن‌های کلون نرمال سلول در فرد مبتلا AML هستند، که جهش در این کلون‌ها اتفاق نیفتاده است.



شکل شماره ۳- مشاهده جهش D835 در ژن FLT3 در زیرگروه‌های مختلف بیماران AML (مرحله بعد از اضافه کردن آنزیم)
M = Marker N = Negative control

بحث

جهش‌های FLT3 در پاتوژنز لوسمی‌ها، به خصوص AML اهمیت بسزایی دارند و منجر به تکثیر خارج از کنترل سلول‌های لوسمیک می‌شوند. تضاعف توالی داخلی (ITD) و جهش نقطه‌ای (D835) در ژن گیرنده FLT3 منجر به فعال شدن گیرنده، بدون تحریک به واسطه لیگاند (FL) می‌شوند. جهش ITD در بعضی مطالعات به همراه شمارش لکوسیتی بالا، پرگنوز بد و لوسمی مقاوم به درمان گزارش شده است.^(۱۷) هر چند D835 بر خلاف ITD با لکوسیتوز همراه نیست، اما اندکی به سمت یک

تمرکز شدید بر روی داروهای بازدارنده فعالیت FLT3 تیروزین کنازی جهش یافته وجود دارد که علاوه بر داروهای رایج در پروتکل‌های استاندارد رایج در درمان AML، داروهایی از قبیل CEP-701 تا حدود ۹۴٪ در مورد بیماران دارای جهش ITD و ۲۷٪ در موارد دارای جهش D835 اثر بازدارندگی بر تکثیر سلول‌های لوسمیک و در نتیجه درمان AML دارند^(۲۸). از محدودیت‌های انجام این پژوهش، عدم دسترسی به پرونده بیماران جهت یافتن بعضی از اطلاعات آزمایشگاهی آن‌ها بود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که جهش‌های ژن گیرنده FLT3 درصد قابل توجهی از بیماران مبتلا به AML را شامل می‌شود. در پایان اینکه پیگیری مناسب جهش‌های (D835, ITD) در ژن گیرنده FLT3 و اجرائی کردن روش‌های تشخیص مولکولار آن‌ها به صورت روتین، منجر به یک تصمیم‌گیری مناسب در مدیریت درمان لوسمی میلوئیدی حاد شده و از اجرای پروتکل‌های درمانی کم فایده، ایجاد مقاومت به درمان و عودهای مکرر جلوگیری به عمل می‌آورد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت حمایت مالی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران جهت آزمایش‌ها و از سازمان انتقال خون ایران و بیمارستان شریعتی به جهت تامین نمونه‌های لازم نهایت تشکر را دارند.

همچنین، جهش اگزون ۲۰ ژن گیرنده FLT3 بررسی شد که دومین جهش از نظر فراوانی است. در ۱۰۱ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد تحت مطالعه، در ۶٪ این جهش شناسایی شد، و در افراد M1، M0 و M4 این جهش مشاهده نشد. به دلیل کم بودن میزان جهش و همچنین بیماران مورد مطالعه این پژوهش، به طور دقیق نمی‌توان رابطه‌ای بین وجود این جهش و زیرگروه‌های FAB تعریف کرد. جایگزینی D835 در ۳۰ مورد از ۴۲۹ بیمار مبتلا به AML (۷٪)، ۱ مورد از ۲۹ بیمار مبتلا به MDS (حدود ۳٪) و ۱ مورد از ۳۶ بیمار مبتلا به ALL (۳٪) مشاهده شده است^(۳۶و۳۷). در یک گزارش مشابه، ۷ مورد از ۳۵ بیمار مبتلا به AML (۷٪) این جهش را داشته‌اند.^(۳۷) در مطالعه حاضر، فراوانی درصد جهش D835 منطبق با گزارش‌های دیگران می‌باشد.

بروز جهش نقطه‌ای D835 به طور معنی‌داری کمتر از تضاعف توالی داخلی (ITD) در ژن FLT3 می‌باشد، ولی هر دو جهش با فراوانی بالایی در AML یافت می‌شوند، که در مطالعه حاضر مجموعاً ۲۴٪ موارد را شامل شده است. اگرچه در مطالعه‌ای حاضر مواردی از وجود هر دو جهش، تضاعف توالی داخلی (ITD) و جهش نقطه‌ای (D835) در ژن FLT3 در یک بیمار یافت نشد، ولی حضور این دو جهش در یک بیمار قبلاً گزارش شده است که البته با مطالعات تعیین توالی (sequencing) مشخص شده که این دو جهش بر روی یک آلل مشابه نبوده‌اند. بر خلاف جهش‌های تضاعف توالی داخلی (ITD)، در مورد جهش نقطه‌ای D835 و استخلاف‌های گوناگون آن اثرات پیش‌آگهی آن‌ها به طور معنی‌داری ثبت نشده است. به دلیل فراوانی بالای جهش در ژن FLT3 (به خصوص ITD) یک

فهرست منابع

1- Savvides SN, Boone T, Andrew Karpluz P. FLT3 Ligand structure and unexpected Commonalities of

helical bundles and cystein knots . Nat Struct Biol 2000; 7:486-491.

- 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* 1993; 82:1110-1119.
- 3- deLapeyriere O, Naquet P, Planche J, Marchetto S., Rottapel, R. Expression of FLT3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation* 1995;58:351-359 .
- 4- Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev Oncog* 1993;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* 1994;145:283-288 .
- 6- Birg F, Rosnet O, Carbuccion N, Birnbaum D. The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 1994;13:223-227 .
- 7- Birg F, Courcoul 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* 1992;80:2584-2593.
- 8- Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, Brizzi MF, Severino A, Garetto L, et al. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 1995;86:4105-4114.
- 9- DaSilva N, Hu ZB, Ma W, Rosnet O, Birnbaum D, Drexler HG. Expression of the FLT3 gene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1994;8:885-888 .
- 10- 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* 1995;85: 751-756.
- 11- Zwaan CM, Kaspers GJL, Pieters R, Ramakers-Van Woerden NL, den Boer ML, et al. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB-types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96: 2879-2886.
- 12- Moriyama Y, Tsujimura T, Hashimoto K, Morimoto M, Kitayama H, Matsuzawa Y, et al. Role of aspartic acid 814 in the function and expression of c-kit receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996;271:3347-3350.
- 13- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100: 1532-1542.
- 14- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H. Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000;19:624-631.
- 15- 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;12:1333-1337.
- 16- 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;96:3907-3914.
- 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. *Br J Hematol* 2005; 108:322-326.
- 18- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodaera Y , Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001;97:2434-2439.
- 19- Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2002;99:310-318.
- 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;111:190-195.
- 21- 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;10:1911-1918.
- 22- Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, 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.

23- Williams DE. In vivo effects of FLT3 ligand . Blood 1997;90:5022a.

24- Fröhling S, Breitruck J, Schlenk R, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, et al. FLT3 internal tandem

duplications and survival in adult acute myeloid leukemia: analysis of 188 intensively treated patients . Blood 2001;89:717a.

25- 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;14:675-683.

26- 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

27- Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. Br J Haematol 2000;108:322-330.

28- Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, Apatira M, Li J, Sullivan CM. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). Cancer Cell 2002;1:421-432.

Diagnosis of FLT3 Mutations Including Internal Tandem Duplication and D835 Aspartic Acid Point Mutation in Patients with Acute Myeloid Leukemia

*F. Zaker, PhD^I M. H. Mohammadi, MSc^{II} A. Kazemi, PhD^{III}
M. Bakhshayesh, MSc^{IV}

Abstract

Background and Aim: Molecular basis of Acute Myeloid Leukemia (AML) involves mutations in regulatory genes of cellular proliferation and differentiation. Mutation in tyrosine kinase receptor gene of FLT3 occurs in high frequency in AML, resulting in proliferation and abnormal survival of leukemia cells. Mutations in Internal Tandem Duplication (ITD) and D835 of FLT3 gene are associated with poor prognosis. The aim of this study was to diagnose and determine the frequency of this mutation in AML.

Materials and Methods: This descriptive - observational study was performed on 101 AML patients for mutations in exon 11,12 and interon 11 of ITD and D835 mutation in exon 20 of FLT3 receptor gene using PCR. Mutation in ITD was observed using PCR products run on acrylamid gel 8% and compared to marker. PCR products of D835 mutation on genomic DNA were studied using ECORV restriction enzyme and RFLP technique.

Results: ITD mutation was observed in 18% of AML studied patients with differences in subgroups of FAB. Also 6% of the patients showed D835 mutation with difference in subgroups of FAB.

Conclusion: This study revealed that mutations in FLT3 gene occur in substantial number of AML patients. Therefore, molecular diagnosis of these mutations prior to treatment leads to a better decision making for the therapeutic protocol.

Key words: 1) AML (Acute Myeloid Leukemia) 2) FLT-3 (Fms Like Tyrosin kinase)
3) ITD (Internal Tandem Duplication) 4) D835 (Aspartic Acid 835)
5) PCR (Polymerase Chain Reaction)

This article is a summary of the thesis by M.H Mohammadi for the degree of MSc in Hematology under supervision of F.Zaker, Ph.D. and consultation with A.Kazemi, Ph.D. (2006)

I) Associate Professor of Hematology, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Crossing of Hemmat and Chamran Expressways, Iran University of Medical Sciences and Health services Tehran, Iran (* Corresponding Author)

II) MSc in Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

III) Associate Professor of Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Iran University Of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

IV) MSc in Parasitology, Cellular and Molecular Research Center, Iran University Of Medical Sciences and Health Services, Tehran Iran