

Revisão / Review

Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda – Classificação da Organização Mundial de Saúde 2008

Importance of detecting FLT3 and NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia – World Health Organization Classification 2008

Marley Aparecida Licínio¹

Maria Cláudia Santos da Silva²

As leucemias mieloides agudas (LMA) constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoéticas, decorrente de mutações que podem ocorrer em diferentes fases da diferenciação de células precursoras mieloides. Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS-2008) publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoético e linfóide. De acordo com essa classificação, para um diagnóstico mais preciso e estratificação de prognóstico de pacientes com leucemias mieloides agudas, devem-se pesquisar mutações nos genes FLT3 e NPM1. Sabe-se que a presença de mutações no gene FLT3 é de prognóstico desfavorável e que as mutações no gene NPM1 do tipo A são de prognóstico favorável. Assim, nos países desenvolvidos, a análise das mutações no gene FLT3 e NPM1 tem sido considerada como um fator de prognóstico importante na decisão terapêutica em pacientes com diagnóstico de leucemias mieloides agudas. Considerando essas informações, é de extrema importância a análise das mutações no gene FLT3 (duplicação interna em tandem - DIT - e mutação pontual D835) e no gene NPM1 como marcadores moleculares para o diagnóstico, o prognóstico e a monitoração de doença residual mínima em pacientes com leucemias mieloides agudas.

Descritores: Leucemia mieloide aguda/genética; Genes neoplásicos; Mutação; Organização Mundial da Saúde; Neoplasias hematológicas/classificação; Leucemia/classificação

Introdução

Leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, as quais, posteriormente, atingem a circulação periférica e

podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos.⁽¹⁾ A proliferação descontrolada de células leucêmicas resulta de uma expansão clonal de uma única célula-tronco que sofreu uma série de alterações genéticas, que se acumulam em um único clone celular, o que confere vantagem proliferativa em relação às demais células e impede seu processo de diferenciação.

¹Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis (SC), Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis (SC), Brasil.

Suporte financeiro: Marley Aparecida Licínio é bolsista da CAPES.

Conflito de interesse: sem conflito de interesse

Recebido: 26/11/2009

Aceito: 18/3/2010

Correspondência: Santos-Silva M.C.

Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde

Hospital Universitário – HU/Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Campus Universitário – Trindade

88040-970 – Florianópolis (SC), Brasil

Tel.: (55 48) 3721-8146; Fax.: (55 48) 3721-9542

E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Em decorrência dessa proliferação, as células leucêmicas inibem a produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Além disso, devido à não funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos afetados, além de sofrerem de anemia e distúrbios hemorrágicos, são mais suscetíveis às infecções.⁽²⁾

A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico. Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as leucemias diferem quanto à etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento.^(3,4) O fato de a leucemia ser uma doença genética faz com que a identificação das alterações nas células blásticas seja imprescindível para a identificação de subgrupos de pacientes com características clínicas distintas que orientam o tratamento, a estratificação do prognóstico e a monitoração da resposta terapêutica.⁽⁵⁾

O estabelecimento de um diagnóstico preciso e indicativo de prognóstico, baseado na análise de fatores clínicos, biológicos, genéticos e moleculares, é um dos motivos do sucesso terapêutico em pacientes com leucemias agudas.⁽⁶⁾ Com o avanço tecnológico, surgiram novas metodologias para o diagnóstico das leucemias agudas, as quais são capazes de identificar fatores prognósticos altamente relevantes. Com isso, em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu novos critérios para o diagnóstico de leucemia aguda (OMS, 2008): a origem e a linhagem celular, o estágio de maturação e o tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvida na patogênese da doença.⁽¹⁾

Classificação da LMA (OMS-2008)

A OMS-2008 estabeleceu, para leucemia mieloide aguda (LMA), sete subcategorias: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, neoplasias mielóides associadas ao tratamento, LMA não categorizada nos itens anteriores, sarcoma mieloide, proliferação mieloide relacionada com síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmotóides.⁽¹⁾

Embora alguns trabalhos mostrem que os critérios citogenéticos sejam importantes para a diferenciação de prognóstico em favorável, intermediário e desfavorável,^(7,8) outros demonstram que a avaliação apenas do cariótipo não é satisfatória para uma correta estratificação do prognóstico de pacientes com LMA.^(9,10) Além disso, sabe-se que só as alterações cromossômicas não são suficientes para o desenvolvimento das leucemias agudas⁽¹¹⁾ e que cerca de 45% dos pacientes com LMA possuem cariótipo normal.^(9,12) Assim, torna-se cada vez mais evidente que as alterações que desregulam genes envolvidos na regulação de vias intracelulares de transdução de sinais de morte e proliferação celular atuam em colaboração com os fatores resultantes das modificações

citogenéticas. Desse modo, a investigação de possíveis alterações é determinante para estratificação do prognóstico, o que serve de ferramenta para prever o risco de recaída, a resistência à terapia e a sobrevida livre de doença.⁽¹⁰⁾

Speck e Gilliland⁽¹³⁾ sugerem a seguinte classificação das mutações encontradas em pacientes com LMA: aquelas que conferem vantagens proliferativas e/ou de sobrevivência aos progenitores hematopoéticos, mas não afetam a diferenciação (mutações de classe I) e aquelas que afetam a transcrição ou componentes do complexo transcricional e prejudicam a diferenciação hematopoética (mutações de classe II). Assim, as mutações no gene FLT3, cKIT e N-RAS pertencem às mutações de classe I⁽¹³⁻¹⁵⁾ e as mutações no gene NPM1,^(14,16) C/EBPA e AML1/ETO e anormalidades em CBFB/MYH11, PML/RARA e MLL são mutações de classe II.⁽¹³⁻¹⁵⁾

A classificação proposta pela OMS,⁽¹⁾ em 2008, sugere um novo subtipo, de caráter provisório, na subcategoria LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes: a LMA com mutação no gene NPM1. Segundo a OMS, as mutações no gene FLT3 estão associadas a mais de uma subcategoria e, por esse motivo, não receberam um subtipo especial para tal mutação, não obstante possuam importância clínica.⁽¹⁾ Com isso, vários grupos de pesquisa enfatizam que se deve fazer a pesquisa das mutações no gene FLT3^(1,14,17,18) e no gene NPM1,^(1,14,17-19) pois possuem relevância clínica, indicada para todos os pacientes portadores de LMA, como fator determinante para uma correta estratificação de prognóstico.

Sabe-se que mutações no gene FLT3 estão associadas a maior propensão de recaída e menor sobrevida global livre de doença, possuindo consequentemente prognóstico desfavorável,^(14,20,21) enquanto que a presença da mutação no gene NPM1 é de prognóstico favorável, com maior sobrevida livre de doença para indivíduos com LMA.^(14, 22-24)

Importância da detecção das mutações no gene NPM1 para a classificação das leucemias mielóides agudas (OMS-2008)

O gene responsável pela síntese da nucleofosmina (NPM), também conhecida como B23, numatrina 1 ou NO38, foi mapeado no cromossomo 5q35 em humanos. Esse gene contém 12 éxons que codificam três isoformas de NPM: NPM1 (B23.1), NPM1.2 (B23.2) e NPM1.3 (B23.3). A isoforma NPM1 é a mais prevalente e possui um domínio C-terminal e uma região N-terminal.⁽²⁵⁾ A isoforma NPM1.2 é uma isoforma truncada, encontrada em níveis muito baixos nos tecidos, e a isoforma NPM1.3 não é muito descrita na literatura.⁽²⁶⁾

A NPM1 é uma fosfoproteína nucleolar que transita entre o núcleo e o citoplasma durante o ciclo celular e interage com diversas proteínas. Devido a esse comportamento, a NPM1 é uma proteína multifuncional, incluindo o processamento de RNA ribossomal, duplicação do centríolo, resposta a estímulos de estresse, tais como irradiação UV e

hipóxia; manutenção da estabilidade genômica por meio do controle de ploídias celulares, participação em processos de reparo de DNA e regulação da transcrição por meio da modulação de eventos de condensação e descondensação da cromatina.^(19,23,27) Além disso, a NPM1 liga-se ao p53 e regula a proteína retinoblastoma (pRb),⁽²⁸⁾ o p19ARF⁽²⁹⁾ e HDM2.⁽³⁰⁾

Alguns trabalhos relatam que mutações no gene NPM1 são encontradas em cerca de 35% de todos os pacientes com LMA e que são as alterações moleculares mais frequentes nesses indivíduos.^(19,31) Essas mutações são classificadas de A a F, de acordo com inserção ou deleção de quatro pares de bases no éxon 12 da região C-terminal da NPM1 (Figura 1), o que faz com que ocorra um novo sinal de exportação nuclear.^(26,31) As mutações em NPM1, além de serem detectadas pelas mutações encontradas no gene, também podem ser pesquisadas por alterações fenotípicas, por meio de pesquisa da proteína anormal NPM1.^(1,31)

Muitos estudos demonstram que as mutações no gene NPM1 são relevantes apenas para os pacientes com cariótipo normal.^(17,24,31,32) Por outro lado, o grupo de Haeflrich et al.⁽³³⁾ relatou recentemente que, embora os pacientes com LMA com cariótipo anormal representem uma minoria dos indivíduos com a mutação no gene NPM1, sua definição, no que diz respeito às características biológicas, patológicas e clínicas, é muito importante. Este estudo de Haeflrich et al.⁽³³⁾ foi realizado com 631 pacientes com LMA, com mutação no gene NPM1, no qual 14,7% dos pacientes apresentaram cariótipo anormal, não tendo sido observadas diferenças nos pacientes com LMA que apresentavam mutação NPM1 (cariótipo normal ou anormal) com relação à sobrevida global. Esse resultado ratifica o conceito de que a LMA com a mutação no gene NPM1 deve ser clinicamente tratada como um subtipo, independentemente do cariótipo.⁽³³⁾

Nos poucos estudos com alterações cromossômicas associadas às mutações no gene NPM1 em pacientes com LMA,^(22,23) a associação da sua importância biológica e clínica não foi profundamente investigada. Nesse contexto, durante a elaboração da classificação da OMS-2008, um dos

pontos de debate foi a denominação do subtipo "LMA com mutação no gene NPM1" como provisória e não definitiva.

Falini et al.⁽²⁶⁾ relatam que em torno de 75%-80% dos pacientes portadores de LMA com mutação no gene NPM1 possuíam a mutação do tipo A. Recentemente, um estudo relatou que indivíduos com a mutação NPM1 do tipo A é de prognóstico favorável, como já era conhecido para mutações na NPM1, como também que mutações no gene NPM1 do tipo não A são de prognóstico desfavorável.⁽³⁴⁾

Valor prognóstico das mutações no gene FLT3 nas leucemias mieloides agudas

O gene que codifica a proteína FLT3 localiza-se no cromossomo 13q12 (*Fms-like tyrosine kinase-3*, também conhecido como *FLK-2*, *de fetal liver kinase-2*) e foi clonado pela primeira vez em 1991 pelo grupo de Rosnet et al.⁽³⁵⁾ e por Matthews et al.⁽³⁶⁾ Em condições fisiológicas, a transcrição do gene FLT3 codifica uma proteína monomérica constituída por um domínio extracelular, uma região transmembrana, um domínio justamembrana (JM) e dois domínios tirosina-quinase intracelulares. Na presença de ligante ocorre a dimerização de monômeros seguida da fosforilação de substratos efetores de vias intracelulares de transdução de sinal. As principais vias acometidas pela ativação do FLT3 são a PI3K (*phosphatidylinositol 3-Kinase*), as vias do RAS/ERK/MAPK (*mitogen-activated Kinase protein*) e STAT5 (*signal transducers and activators of Transcription 5*), o que resulta no aumento proliferativo e inibição da apoptose.⁽³⁷⁾

Quando o gene FLT3 sofre mutação, dá origem a um produto final modificado, ou seja, gera um receptor FLT3 com alterações em sua estrutura. Com isso, o domínio tirosina-quinase fica permanentemente ativado, independente de ligante, o que acarreta a proliferação descontrolada das células mieloides.⁽³⁸⁾ Quando isso ocorre, a leucemia tem um prognóstico desfavorável e exige adequação no tratamento para contemplar tal variável.⁽¹⁸⁾ As alterações encontradas no gene FLT3 podem ser de dois tipos: duplicações internas em tandem (DIT) ou mutações pontuais.⁽³⁸⁾

A DIT no gene FLT3 é a segunda mutação mais frequente encontrada em pacientes com LMA.⁽³⁹⁾ Essa alteração ocorre nos éxons 14 ou 15 (previamente descritos como éxons 11 ou 12) (Figura 2-A) e acomete de 20%-35% de todos os pacientes com LMA e 5%-10% das leucemias linfoblásticas agudas (LLAs).⁽²⁰⁾ A incidência da DIT depende da idade dos pacientes com LMA. Nos indivíduos com idade superior a 60 anos, a frequência de mutações do tipo FLT3-DIT é de 30%-35%; já em pacientes com LMA mais jovens, essas aberrações

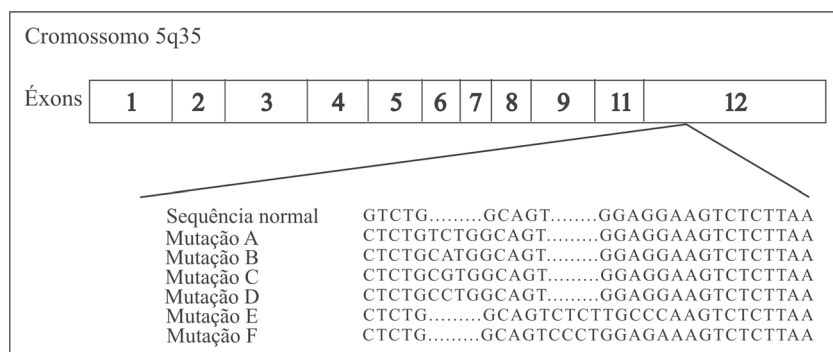


Figura 1. Representação esquemática das mutações do gene NPM1. Adaptado de (19)

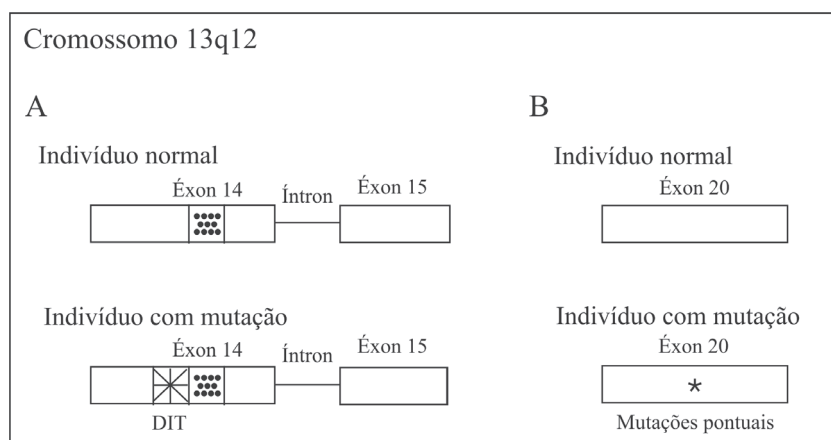


Figura 2. Representação esquemática das mutações no gene FLT3

Painel A: mutação no gene FLT3 do tipo DIT; Painel B: mutação no gene FLT3 do tipo D835. Adaptado de (40)

moleculares são detectadas em 20%-25%. Esses resultados são explicados por uma maior incidência de aberrações citogenéticas, bem como por uma maior taxa de LMA secundária (por exemplo, secundária à síndrome mielodisplásica), associados a um resultado desfavorável em idosos com LMA.^(37,41)

O grupo de Nakao et al.⁽⁴²⁾ foi o primeiro a descrever a DIT no domínio JM de um alelo de FLT3 em pacientes com LMA. O modelo molecular do funcionamento da proteína alterada foi descrito por meio de estudos *in vitro* que demonstraram a dimerização descontrolada do domínio JM produzida pela DIT, o qual perde a capacidade auto-inibitória e permite a dimerização dos receptores independente de ligante, o que gera autofosforilação e promove crescimento autônomo das células mutantes.⁽⁴³⁾ Com a presença da DIT ocorre autofosforilação do receptor FLT3, o que leva à ativação permanente desse receptor, culminando com ativação das vias de sinalização celular, tais como ERK e STAT5.⁽⁴⁴⁾

A importância clínica das mutações em FLT3 na LMA foi estabelecida a partir da correlação entre a presença de DIT associada com leucocitose, alto percentual de blastos e resposta terapêutica desfavorável.⁽²⁰⁾ Alguns grupos detectaram ainda a presença da mutação do tipo FLT3-DIT concomitante a outras alterações, como, por exemplo, a t(15;17), indicando prognóstico favorável; já a presença da t(6;9) está associada a prognóstico desfavorável.^(21,45) No entanto, o valor prognóstico da DIT no gene FLT3, associado a outras alterações, ainda não foi bem estabelecido, uma vez que a literatura traz trabalhos com DIT associado a altos níveis de recaída, com os níveis de remissão iguais aos do grupo sem essa mutação, ou até mesmo associado à resposta clínica favorável.^(46,47)

Mutações pontuais no gene FLT3 acometem a alça de ativação do segundo domínio quinase, e a mutação mais comum resulta da substituição de um resíduo de ácido aspártico na posição 835 do éxon 20 (anteriormente conhe-

cido como éxon 17) (Figura 2-B) por um resíduo de tirosina (D835).⁽⁴⁸⁾ A alça de ativação é um componente comum aos receptores tirosina-quinase e tem como função bloquear o acesso de ATP e do substrato ao domínio quinase quando o receptor está inativo. Com uma mutação pontual nessa região, o receptor se encontra autoativado e, assim, como na presença da DIT, o controle da cascata de sinalização promovido por FLT3 é perdido, o que leva à proliferação celular.⁽⁴⁹⁾

A mutação do tipo FLT3-D835, também conhecida por FLT3-TKD, foi descrita em cerca de 5%-10% dos pacientes com LMA e tem sido relacionada a um prognóstico desfavorável.^(48,50,51) Na presença das

duas alterações em FLT3, a baixa incidência (1,7%) relatada dificulta a avaliação do valor clínico; no entanto, o prognóstico desfavorável parece prevalecer e estudos *in vitro* sugerem o desenvolvimento de resistência a terapias convencionais e específicas para o receptor.⁽⁴⁶⁾

De maneira geral, as alterações em FLT3 têm sido consideradas como fator de prognóstico, já incorporadas para determinação de risco e intensificação terapêutica nos protocolos recém-atualizados nos países desenvolvidos.⁽¹⁸⁾ Por mais que haja discordâncias quanto à agressividade da doença, todos os estudos revelaram leucometria elevada e menor taxa de remissão na presença da mutação. Alguns estudos avaliam também a possibilidade de utilização das alterações em FLT3 como marcadores tumorais para identificação de doença residual mínima. O fato é que foram observados ganhos e perdas de mutações no decorrer do tratamento, o que restringe o valor de FLT3 como marcador indicativo de recaída.^(52,53)

Como já descrito neste artigo, pacientes portadores de LMA com mutação no gene NPM1 estão associados a um prognóstico favorável; porém, se esse paciente apresentar concomitantemente a DIT para o gene FLT3, seu prognóstico será considerado desfavorável.^(26,31,33,34,39,54)

Considerações finais

Na literatura, alguns estudos clínicos, em fase I e II⁽⁵⁵⁾ e em fase III,⁽⁵⁶⁾ investigam os benefícios da utilização dos inibidores de FLT3 em pacientes portadores de mutações no gene FLT3. Esses resultados mostram a importância da investigação das mutações no gene FLT3 para a estratificação e avaliação de prognóstico na LMA, pois a presença dessas mutações implica a escolha da conduta terapêutica.⁽¹⁸⁾ Além disso, novos estudos envolvendo a investigação da mutação no gene NPM1 são de extrema importância, pois podem esclarecer a caracterização do subtipo "LMA com mutação no gene NPM1".

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a group of malignancies characterized by uncontrolled proliferation of hematopoietic cells resulting from mutations that occur at different stages in the differentiation of myeloid precursor cells. In 2008, the World Health Organization (WHO-2008) published a new classification for cancers of the hematopoietic and lymphoid system. According to this classification, FLT3 and NPM1 gene mutations should be investigated for a more precise diagnosis and prognostic stratification of AML patients. It is well known that the presence of FLT3 gene mutations is considered an unfavorable prognostic factor and type-A NPM1 gene mutations are considered to be favorable. In developed countries, an analysis of FLT3 and NPM1 mutations is considered important for therapeutic decisions in AML patients. Hence, an analysis of FLT3 (internal tandem duplication - ITD- and D835 point mutation) and NPM1 gene mutations is extremely important as molecular markers for diagnosis, prognosis and monitoring of minimal residual disease in LMA patients.

Keywords: Leukemia, myeloid, acute/genetics; Mutation; World Health Organization; Hematologic neoplasms/classification; Leukemia/classification

Referências

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
2. Estey EH. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer*. 2001;92(5):1059-73.
3. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;339(9):605-15.
4. Bain BJ. Diagnóstico em leucemias. 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2003.
5. Rubnitz JE, Pui CH. Molecular diagnostics in the treatment of leukemia. *Curr Opin Hematol*. 1999;6(4):229-35.
6. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*. 1999;35(2):173-85. Review.
7. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96(13):4075-83.
8. Byrd JC, Mrózek K, Dodge Rk, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with "de novo" acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325-36.
9. Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol*. 2007;137(5):387-400.
10. Huang Q, Chen W, Gaal KK, Slovak ML, Stein A, Weiss LM. A rapid, one step assay for simultaneous detection of FLT3/ITD and NPM1 mutations in AML with normal cytogenetics. *Br J Haematol*. 2008;142(3):489-92.
11. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002;100(1):59-66.
12. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;18(2):115-36.
13. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):502-13.
14. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-18. Comment in: *N Engl J Med*. 2008;359(6):652; author reply 652-3, *N Engl J Med*. 2008;359(6):652; author reply 652-3, *N Engl J Med*. 2008;359(6):651; author reply 652-3, *N Engl J Med*. 2008;359(6):651-2; author reply 652-3, *N Engl J Med*. 2008;358(18):1960-2.
15. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, et al. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009;83(2):90-8.
16. Andersen MT, Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. NPM1 mutations in therapy-related acute myeloid leukemia with uncharacteristic features. *Leukemia*. 2008;22(5):951-5.
17. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109(2):431-48.
18. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia. Washington: NCCN; c2008. Vol.1.
19. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):493-505.
20. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98(6):1752-9.
21. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326-35.
22. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747-54.
23. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-20.
24. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of Young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776-84.
25. Nambodiri VM, Akey IV, Schmidt-Zachmann MS, Head JF, Akey CW. The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. *Structure*. 2004;12(12):2149-60. Comment in: *Structure*. 2004;12(12):2098-100.

26. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc + AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109(3):874-85.
27. Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(6):481-90.
28. Takemura M, Ohoka F, Perpelescu M, Ogawa M, Matsushita H, Takaba T, et al. Phosphorylation-dependent migration of retinoblastoma protein into the nucleolus triggered by binding to nucleophosmin/B23. *Exp Cell Res*. 2002;276(2):233-41.
29. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr C. Physical and functional interactions of the arf tumor suppressor protein with Nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol*. 2004;24(3):985-96.
30. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*. 2004;5(5):465-75.
31. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254-66. Erratum in: *N Engl J Med*. 2005;352(7):740. Comment in: *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):291-2, *N Engl J Med*. 2005;352(17):1819-20; author reply 1819-20.
32. Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, et al. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*. 2009;94(2):213-23.
33. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biological, pathological, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009; 114(14):3024-32.
34. Koh Y, Park J, Bae EK, Ahn KS, Kim I, Bang SM, et al. Non-A type nucleophosmin 1 gene mutation predicts poor clinical outcome in de novo adult acute myeloid leukemia: differential clinical importance of NPM1 mutation according to subtype. *Int J Hematol*. 2009;90(1):1-5.
35. Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*. 1991;9(2):380-5.
36. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*. 1991;28 (7): 1143-52.
37. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97(11): 3589-95.
38. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*. 2006;107(9):3700-7.
39. Scholl S, Fricke HJ, Sayer HG, Höffken K. Clinical implications of molecular genetic aberrations in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(4):491-505.
40. Stirewalt D, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(9):650-65.
41. Andersson A, Johansson B, Lassen C, Mitelman F, Billström R, Fioretos T. Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. *Eur J Haematol*. 2004;72(5):307-13.
42. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloideukemia. *Eur J Haematol*. 2004;72(5):307-13.
43. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*. 1998;12(9):1333-7.
44. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, et al. The Structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 2004;13(2):169-78.
45. Libura M, Asnafi V, Tu A, Delabesse E, Tigaud I, Cymbalista F, et al. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood*. 2003;102(6):2198-204.
46. Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P, Yu R, Wang Y, Stuber CM, et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood*. 2004;104(9):2646-54.
47. Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, et al. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(12):3768-76.
48. 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(8):2434-9.
49. Griffin JD. Point mutations in the FLT3 gene in AML. *Blood*. 2001;97(8):2193A-2193.
50. Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*. 2005;106(1):265-73.
51. Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*. 2005;105(12):4792-9.
52. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002;100(7):2393-8.
53. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*. 2006;107(1):293-300.
54. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106(12):3733-9.
55. Shah M, Agarwal B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). *Indian J Pediatr*. 2008;75(8):831-7.
56. Ohtake S. Acute myeloid leukemia. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2007;34(13):2175-9.