

# Detekcia mutácií v géne *FLT3* u pacientov východoslovenského regiónu

## Detection of *FLT3* Mutations in Patients from Eastern Slovakia

Dubayová K.<sup>1</sup>, Kožlejšová Z.<sup>2</sup>, Vašková J.<sup>3</sup>, Čakanová G.<sup>3</sup>, Kiktavá M.<sup>4</sup>, Guman T.<sup>5</sup>, Sabo J.<sup>2</sup>, Karabinos A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF Košice

<sup>2</sup> Ústav lekárskej a klinickej biofyziky UPJŠ LF Košice

<sup>3</sup> SEMBID, s.r.o., Košice

<sup>4</sup> Oddelenie lekárskej genetiky, Medirex, a. s., Košice

<sup>5</sup> Klinika hematológie a onkohematológie UPJŠ LF a UNLP Košice

### Souhrn

**Východisko:** Práca poukazuje na význam monitoringu mutácií v géne *FLT3* aplikáciou jednoduchej metódy molekulovej genetiky. **Pacienti a metódy:** Súbor tvorilo 141 pacientov vo veku od 19 do 81 rokov s primárnou akútnou myeloblastovou leukémiou (AML) a 8 pacientov s prechodom myelodysplastického syndrómu (MDS) do AML. Metódou PCR bola analyzovaná DNA zo vzorky periférnej krvi a/alebo kostnej drene. Dôkaz internej tandemovej mutácie *FLT3* génu (*FLT3*-ITD) je založený na amplifikácii exónov 14 a 15. Bodová mutácia v tyrozín kinázovej doméne *FLT3* génu (*FLT3*-TKD) bola detegovaná restriktívnou analýzou PCR produktu exónu 20. Fragmenty boli separované elektroforeticky. PCR produkty pozitívnych vzoriek boli analyzované aj na mikročipe (Bioanalyzer 2100). **Výsledky:** Interná tandemová duplikácia *FLT3*-ITD bola potvrdená u 19 % pacientov a bodová mutácia *FLT3*-TKD u 8 %. Dvaja pacienti (1 %) mali obidve mutácie. Najväčšiu skupinu *FLT3*+ tvorili pacienti bez iných chromozómových aberácií (59 %) a pacienti s translokáciou t(15; 17)/*PML-RARA* (15 %). Úmrtnosť pacientov v skupine *FLT3*+ bola 33 % oproti 10 % v skupine *FLT3*-. V rámci *FLT3*+ skupiny bolo percento úmrtnosti takmer rovnaké u *FLT3*-ITD aj *FLT3*-TKD, paradoxne 77-ročná pacientka s dvojitou mutáciou *FLT3*-ITD/TKD bola v remisii. Ôsmich pacientov s prechodom MDS do AML sme posudzovali samostatne. U troch pacientov bola pri prechode do AML potvrdená *FLT3* pozitivita, z toho u dvoch *FLT3*-ITD a u jedného *FLT3*-TKD. Iné génové aberácie z vyšetrovaného panelu u nich potvrdené neboli. Prežívanie týchto pacientov s *FLT3*+ bolo dlhšie ako u *FLT3*- pacientov. Výsledky dôkazu mutácií v géne *FLT3* u pacientov východoslovenského regiónu korelujú s publikovanými výsledkami iných databáz. **Záver:** Aplikovaná PCR metóda je spoľahlivá, relatívne rýchla a finančne nenáročná, čo umožňuje rutinný monitoring mutácií v géne *FLT3*. Verifikácia *FLT3* positivity na mikročipe je elegantnou náhradou analýzy na kapilárnej elektroforéze.

### Klíčová slova

akútna myeloblastová leukémia – DNA – PCR – mutácia – *FLT3*-ITD – *FLT3*-TKD

Táto práca bola podporená grantom z Európskeho fondu regionálneho rozvoja OPVaV-2009/2.2/05-SORO (ITMS kód: 26220220143).

The study was supported by the European Regional Development grant OPVaV-2009/2.2/05-SORO (ITMS code: 26220220143).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. Ing. Katarína Dubayová, PhD.  
Ústav lekárskej a klinickej biochémie  
UPJŠ LF Košice  
Trieda SNP 1  
040 11 Košice  
e-mail: sembid.vyskum@gmail.com

Obdržané/Submitted: 19. 10. 2017

Prijaté/Accepted: 15. 2. 2018

doi: 10.14735/amko2018200

## Summary

**Background:** The study investigated *FLT3* gene mutations in patients from eastern Slovakia using a simple molecular method. **Patients and Methods:** We analyzed 141 patients with primary acute myeloid leukemia (AML) and 8 patients with AML that developed from myelodysplastic syndrome (MDS) who were aged 19–81 years. DNA isolated from peripheral blood and/or bone marrow was analyzed by PCR. FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) was detected by amplification of exons 14 and 15. Point mutations in the *FLT3* tyrosine kinase domain (FLT3-TKD) were detected by digesting the PCR product of exon 20 with the restriction endonuclease EcoRV. Fragments were separated electrophoretically. PCR products of the positive samples were also analyzed using a microchip device (Bioanalyzer 2100). **Results:** FLT3-ITD and point mutations in the FLT-TKD were detected in 19 and 8% of patients, resp. Two patients (1%) harbored both types of mutations. Patients with and without FLT3 mutations were called FLT+ and FLT-, resp. Most FLT3+ patients had no chromosomal aberrations (59%) or harbored the t(15; 17) translocation in PML-RARA (15%). The mortality rate was 33% among FLT3+ patients and 10% among FLT3- patients. Among FLT3+ patients, the mortality rates of patients with FLT3-ITD and point mutations of the FLT-TKD were almost the same. A 77-year-old female patient with both FLT3-ITD and a point mutation in the FLT3-TKD was in remission. The eight patients who developed AML from MDS were assessed separately. Of these, three patients were FLT3+; two patients displayed FLT3-ITD, and one patient harbored a point mutation in the FLT3-TKD. No other genetic aberrations were detected. FLT3+ patients lived for longer than FLT3- patients. These analyses of *FLT3* gene mutations in patients from eastern Slovakia are consistent with published data from other databases. **Conclusion:** The applied PCR method is reliable, relatively fast, and affordable, and can be used for routine monitoring of *FLT3* gene mutations. FLT3 mutations can be verified using a microchip as an alternative to capillary electrophoresis.

## Key words

acute myelogenous leukemia – DNA – PCR – mutation – FLT3-ITD – FLT3-TKD

## Úvod

Cytogenetika a molekulová genetika významne prispieva k diagnostike leukémií, pretože na podklade prítomnosti chromozómových aberácií definuje genetické markery, ktoré spolu s klinickými parametrami charakterizujú ochorenie a určujú jeho prognózu. Podľa prítomnosti rôznych genetických abnormalít sú pacienti stratifikovaní do prognostických skupín – priaznivá, intermediárna a nepriaznivá prognóza [1,2]. Dôkaz prítomnosti špecifických mutácií v génoch metódami molekulovej genetiky umožňuje monitorovať priebeh ochorenia a hodnotiť odpoveď na liečbu na molekulovej úrovni u pacientov bez štrukturálnych či numerických chromozómových aberácií. U pacientov s chromozómovými aberáciami má taktiež aj prognostický význam.

Jednou z mutácií, ktoré sa podieľajú na procese leukemogenézy, je mutácia v géne *FLT3*. Tento gén má dôležité postavenie v procese proliferácie, diferenciácie a prežívania prekursorových krvotvorných buniek. Je lokalizovaný na 13. chromozóme (13q12.2), pozostáva z 24 exónov a pokrýva približne 96 kb. Gén *FLT3* kóduje proteín s tyrozínkinázovou (TK) aktivitou triedy III. Tento receptor je zložený z extracelulárnej (tvorí ju päť N-glykozylovaných „imunoglobulín like“ slučiek) transmembránovej, juxta-

membránovej a dvoch intracelulárnych TK domén [3]. Je exprimovaný prevažne na prekursorových kmeňových bunkách v kostnej dreni [4,5]. FLT3 proteín je syntetizovaný ako monomér a po glykozylácií je umiestnený do cytoplazmatickej membrány. FLT3 môže reagovať s ligandom – proteín z triedy rastových faktorov, ktorý stimuluje proliferáciu hematopoetických buniek. Po väzbe ligandu na imunoglobulínovú doménu receptora dôjde k dimerizácii, čo vedie ku konformačným zmenám v juxtamembránovej doméne a následnej autofosforylácii, čím sa aktivizuje TK, ktorá následne aktivizuje viaceré signálne intracelulárne dráhy (obr. 1).

V géne *FLT3* sú známe dve špecifické mutácie – interná tandemová duplikácia (FLT3-ITD, viď nižšie) a bodová mutácia v TK doméne (FLT3-TKD). Interná tandemová duplikácia zahrňuje 3–400 bázových párov (bp) v exóne 14 a vedie k zmene proteínovej štruktúry v oblasti juxtamembránovej domény. Poškodenia juxtamembránovej domény môžu meniť jej dĺžku ako inzercie a delécie, preto niektorí autori ich nazývajú aj LM mutácie („length mutations“). Vo väčšine štúdií sú všetky mutácie postihujúce túto podjednotku označované ako FLT3-ITD mutácie [6]. Pri bodovej mutácii v aktívnej slučke TK domény (FLT3-TKD) sa jedná o zmenu guanínu za

tymín, čo spôsobí zmenu aspartátu (D) na kodóne 835 za tyrozín (Y) [7,8].

Mutácie v géne *FLT3* spôsobia konštitutívnu aktiváciu receptora [9], a tak aj bez prítomnosti ligandu dôjde k dimerizácii, následným konformačným zmenám a autofosforylácii TK, výsledkom čoho je nekontrolovateľná proliferácia (obr. 1). Jedna z posledných štúdií tvrdí, že dĺžka a lokalizácia inzercie zásadne podmieňujú charakter internej tandemovej duplikácie a môžu potencovať fulminantnosť ochorenia už aj tak s nepriaznivou prognózou [10–12].

FLT3-ITD sa vyskytuje u 25–30 % pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (AML) a FLT3-TKD u 7 % pacientov [13–15]. Existuje aj asociácia medzi FLT3-ITD a jednotlivými podtypmi AML podľa French-American-British (FAB) klasifikácie. Najčastejšie sa vyskytuje u pacientov s M3 AML [16]. Táto mutácia sa objavuje aj u 3 % pacientov s myelodysplastickým syndromom (MDS) a ojedinele aj u pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou (CML). FLT3 mutácie neboli nájdené u pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou (CLL), mnohopočetným myelómom, non-Hodgkinovým lymfómom a samozrejme u zdravých jedincov [17,18]. U detí s AML je výskyt FLT3-ITD nižší a pohybuje sa okolo 15 %, pričom u FLT3-TKD je to 7 % podobne ako u dospelých [19]. Prítomnosť

FLT3-ITD u pacientov s AML sa považuje za nepriaznivý prognostický faktor. U týchto pacientov bol zistený vyšší výskyt relapsov a prudký nárast leukemických blastov v periférnej krvi (PK) a kostnej dreni (KD), problematické je aj navodenie kompletnej remisie [20].

Cieľom práce bolo poukázať na význam monitoringu mutácií v géne *FLT3* a možnosť aplikácie jednoduchých metód molekulovej genetiky u pacientov s diagnózou AML *de novo* a u pacientov so sekundárnou AML, ktorá sa vyvinula z MDS.

### Pacienti a metódy

#### Súbor pacientov

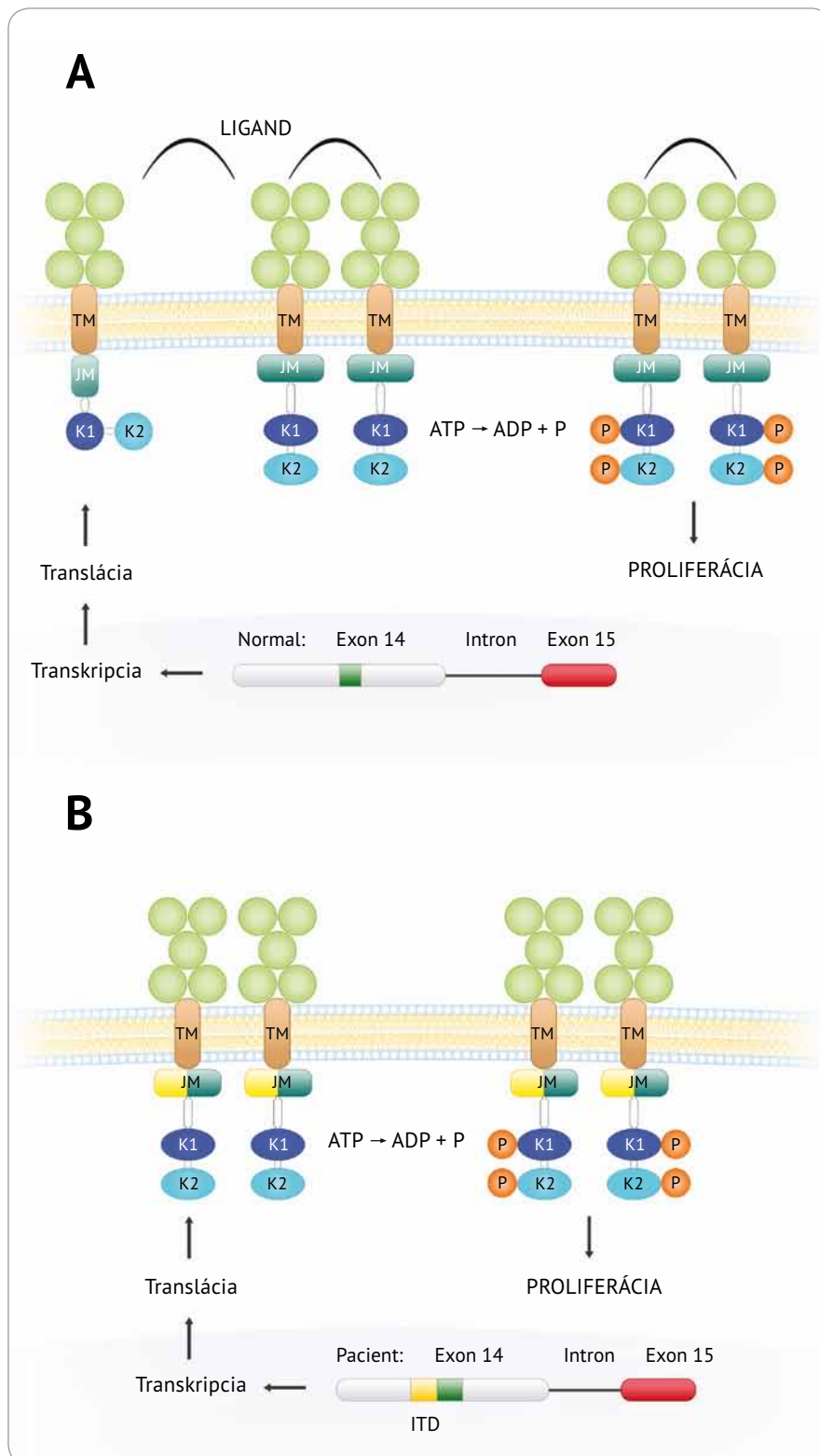
Dospelí pacienti Kliniky hematológie a onkohematológie UPJŠ LF a UNLP Košice – 141 pacientov (67 mužov a 74 žien) s diagnózou AML *de novo*, priemerný vek v čase diagnózy bol 54,7 rokov (19–81 rokov) a 8 pacientov (5 mužov a 3 ženy) s diagnózou sekundárna AML (MDS s prechodom do AML), priemerný vek 65,6 rokov (60–79 rokov). Analyzovaná bola vzorka PK a KD uvedených pacientov. Prezentované výsledky sú anonymné.

#### Izolácia DNA

Genómová DNA (gDNA) bola izolovaná zo vzorky PK a/alebo aspirátu KD podľa štandardného protokolu kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) na automatickom robotizovanom zariadení Qiacube (Qiagen). Vzorka DNA bola buď hneď analyzovaná, alebo uskladnená pri  $-20^{\circ}\text{C}$  do následného spracovania.

#### Genetická analýza *FLT3* génu a iných chromozómových aberácií

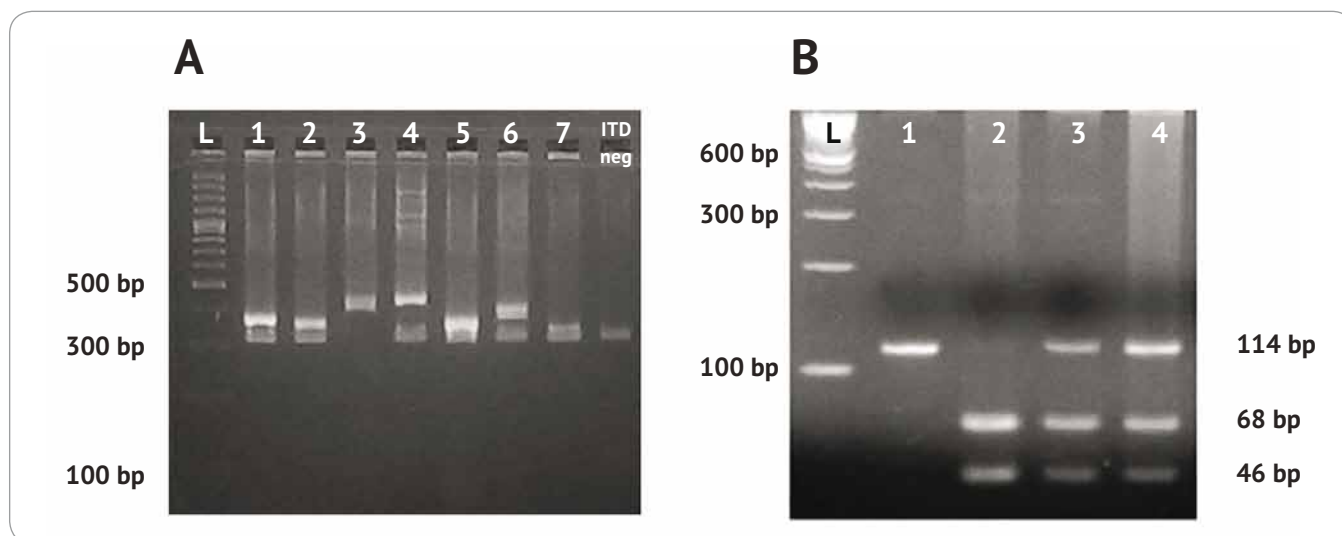
Dôkaz internej tandemovej duplikácie v géne *FLT3* (FLT3-ITD) je založený na amplifikácii exónu 14 a 15 metódou polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction – PCR) [21]. PCR produkt nemutovaného génu má veľkosť 328 bp. Dlhšie fragmenty svedčia o prítomnosti FLT3-ITD. Detekcia mutácie v tyrozínkinázovej doméne (FLT3-TKD) je založená na restriktívnej analýze PCR produktu exónu 20, ktorý je substrátom restriktívnej endonukleázy *EcoRV*. *EcoRV* vertikálne štiepi DNA sekvenciu 5'-GAT|ATC-3' a rozštiepi amplifikovaný frag-



Obr. 1. Schéma aktivácie FLT3 receptora.

A. Transmembránový FLT3 proteín ako monomér reaguje s ligandom za vzniku proteínového diméru, ktorého konformácia umožní fosforyláciu. Takto aktivovaná tyrozínkináza odštaruje riadenú proliferáciu.

B. Pridaný úsek nukleotidov v exóne 14 v géne *FLT3* spôsobí zmenu v primárnej štruktúre proteínu a tak aj bez prítomnosti ligandu dôjde k dimerizácii, a autofosforylácii tyrozínkinázy, výsledkom čoho je nekontrolovateľná proliferácia.



**Obr. 2. Separácia PCR produktov klasickou elektroforézou.**

A. FLT3-ITD L – ladder 100 bp, 1-7 FLT3-ITD pozitívni pacienti, FLT3-ITD negatívni pacienti bez mutácie

B. FLT3-TKD 1 – pacient s mutáciou v oboch alelách, 2 zdravý jedinec bez mutácie FLT3-TKD, 3,4 – pacienti s jednou mutovanou alelou FLT3-TKD

bp – bázoové páry

ment veľkosti 114 bp na 68 bp a 46 bp. V prípade bodovej mutácie je guanín (G) zamenený za tymín (T). *EcoRV* túto sekvenciu neštípi a tak nerozštiepený fragment veľkosti 114 bp potvrdzuje prítomnosť mutácie. Ak je prítomný len fragment 114 bp, je mutácia prítomná v oboch alelách. Vo väčšine prípadov je mutovaná len jedna alela a výsledkom reakcie sú produkty 114, 68 a 46 bp (obr. 3B). Separácia produktov PCR bola realizovaná horizontálnou elektroforézou na 3% agaróze, vizualizácia UV svetlom. Fotodokumentácia z každej analýzy bola archivovaná. PCR produkty pozitívnych vzoriek boli analyzované aj mikročipovou elektroforézou na zariadení Bioanalyzer 2100 (Agilent). Metodický postup analýzy zvyšných chromozómových/genetických aberácií je uvedený inde [1].

### Výsledky

Mutácie v géne *FLT3* boli detegované jednoduchou a relatívne rýchlou PCR diagnostikou na základe elektroforetickej separácie a identifikácie veľkosti fragmentov (obr. 2). V prípade pozitivity na prítomnosť *FLT3* mutácie bol PCR produkt verifikovaný aj separáciou na mikročipe Bioanalyzer 2100 (obr. 3), kde bola presne stanovená veľkosť fragmentu, ako aj pomer intenzity mutovanej a nemutovanej alely.

### AML pacienti

Súbor tvorilo 141 dospelých pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná AML *de novo*. Priemerný vek AML pacientov v čase diagnózy bol 54,7 rokov (19–81 rokov). Priemerný vek *FLT3* negatívnych pacientov (*FLT3*<sup>-</sup>) bol 54,3 rokov, skupina *FLT3* pozitívnych pacientov (*FLT3*<sup>+</sup>) bola staršia, priemerný vek bol 59,1 rokov.

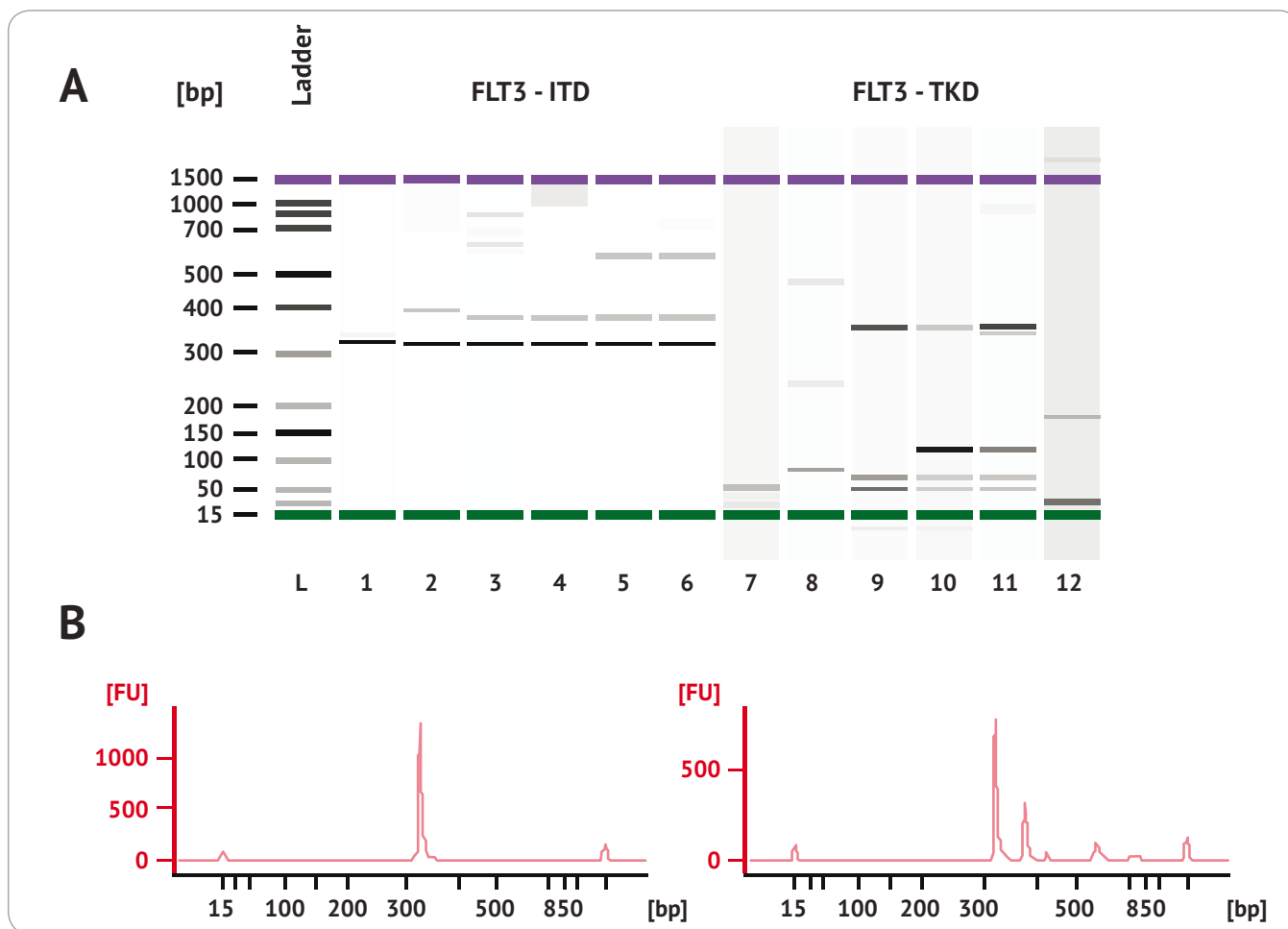
Pacienti s mutáciou v géne *FLT3* tvoria 1/3 (28 %). Pomer mužov (48) a žien (54) v skupine bez *FLT3* mutácie je pomer takmer rovnaký, u *FLT3*<sup>+</sup> pacientov je žien (26) 2× viac ako mužov (13). *FLT3*-ITD bola potvrdená u 18 % pacientov a bodová mutácia *FLT3*-TKD v 8 % zo všetkých AML pacientov. Dvaja pacienti mali obidve mutácie. V jednom prípade sme potvrdili mutáciu *FLT3*-ITD v oboch alelách, rovnako aj mutáciu *FLT3*-TKD v oboch alelách sme zachytili u jedného pacienta. Obidvaja pacienti zomreli pár dní od potvrdenia diagnózy.

V rámci skupín *FLT3*<sup>+/-</sup> sme pacientov ďalej rozdelili podľa prítomnosti ďalších chromozómových aberácií – bez aberácií, trizómia chromozómu 8, *PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *AML1-ETO*, *MLL*, komplexný karyotyp. Percentuálne zastúpenie pacientov v jednotlivých špecifických podskupinách bolo takmer

rovnaké u *FLT3*<sup>-</sup> aj u *FLT3*<sup>+</sup>, s výnimkou translokácie t (15; 17)/*PML-RARA*, kde u *FLT3*<sup>+</sup> pacientov to bolo 15 oproti 7 % *FLT3*<sup>-</sup> a naopak, pacienti s komplexným karyotypom a viac ako dvoma ďalšími prítomnými genetickými aberáciami v skupine *FLT3*<sup>-</sup> tvorili 14 oproti 3 % v súbore *FLT3*<sup>+</sup>. V skupine *FLT3*<sup>+</sup> pacientov sme nezachytili ani jednu translokáciu t (8; 21)/*AML1-ETO*.

Porovnávali sme úmrtnosť pacientov do 1 roka od stanovenia diagnózy. Mutácia v géne *FLT3* predstavuje nepriaznivý prognostický faktor, čo sa potvrdilo aj vo vyššej úmrtnosti pacientov v skupine *FLT3*<sup>+</sup> (33 %) oproti 10 % v skupine *FLT3*<sup>-</sup>. V skupine *FLT3*<sup>-</sup> bolo 57 pacientov (56 %) s normálnym karyotypom, z toho zomreli 3 pacienti, čo predstavuje 5 % pacientov s normálnym karyotypom a *FLT3* negativitou. *FLT3* pozitivitu a normálny karyotyp malo 23 pacientov (59 %), z toho 30 % pacientov (7 pacientov) zomrelo. Aj u pacientov s normálnym karyotypom, ktorí sú zaradení do skupiny s intermediárnou prognózou, sa potvrdil posun k horšej prognóze v prípade mutácie v géne *FLT3*.

V rámci *FLT3*<sup>+</sup> skupiny bola vyššia úmrtnosť u pacientov s *FLT3*-ITD (9 pacientov) ako u pacientov s *FLT3*-TKD (3 pacienti), ale percentuálne zastúpenie úmrtí v rámci danej mutácie bolo takmer



**Obr. 3. Separácia PCR produktov FLT3-ITD na mikročipe Bioanalyzer 2100.**

A. Elektroforeogram: L-ladder, 1 – nemutovaný gén *FLT3* = 328 bp (zdravý jedinec), 2-6 pacienti s ITD-*FLT3* v jednej alele (328 bp – nemutovaná alela, fragmenty dlhšie ako 328 bp = *FLT3*-ITD), 7- negatívna kontrola amplifikácie (voda), 9 – zdravý jedinec bez mutácie *FLT3*-TKD, 10,11 – mutácia v 1 alele, 12 - negatívna kontrola amplifikácie (voda).

B. Pík 328 bp je fragment nemutovaného génu.

C. Pík 385 bp je dôkaz prítomnosti *FLT3*-ITD, 328 bp je nemutovaná alela (WT), vypočítava sa aj pomer výšky píku mutovanej a nemutovanej alely ( $FLT3\text{-ITD} : WT$ ).

bp – bázoové páry

rovnaké (35, resp. 36 %). Jedna 77-ročná pacientka s dvojitou mutáciou *FLT3*-ITD-*TKD* bola paradoxne v remisii.

#### MDS pacienti s prechodom do AML

Pacientov s diagnózou MDS (8 pacientov), ktorí boli vyšetrení v súvislosti s prechodom MDS do AML, sme zaradili do samostatného súboru. Priemerný vek pacientov bol 65,6 rokov. Z piatich *FLT3*-pacientov s prechodom do AML traja zomreli do 6 mesiacov od potvrdenia prechodu do AML. Ostatní remisiu nedosiahli. U troch MDS pacientov bola pri prechode do AML potvrdená *FLT3* pozitivita, z toho u dvoch (1 muž a 1 žena,

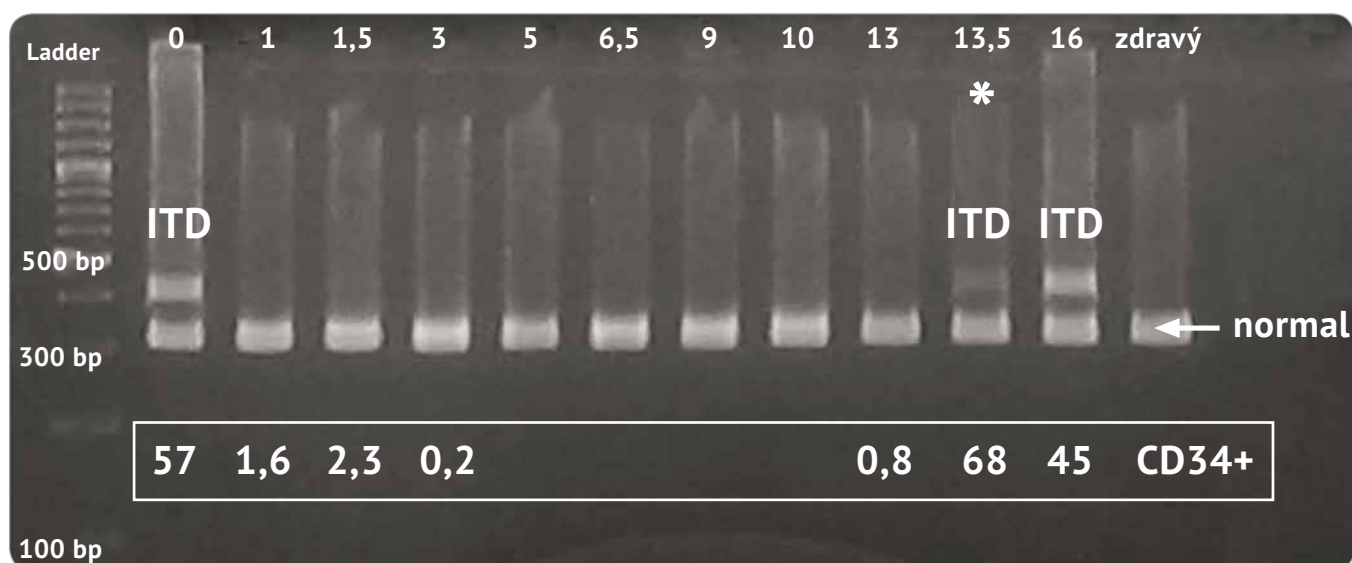
obaja vo veku 60 rokov) *FLT3*-ITD a u jedného *FLT3*-TKD. U *FLT3* + pacientov bola táto mutácia jedinou pozitívnou genetickou aberáciou z vyšetřovaného panelu. U ženy bola *FLT3*-ITD počas MDS diagnózy negatívna, pozitívna sa potvrdila až pri prechode do AML po 9 mesiacoch od monitorovania *FLT3* počas diagnózy MDS. Pacientka po roku od prechodu do AML je v dispenzári. Druhý pacient – 60ročný muž, bol u nás vyšetřený prvýkrát až pri prechode MDS do AML a odvtedy až do úmrtia (po 16 mesiacoch) bol monitorovaný na *FLT3*-ITD-pozitivitu. Priebeh ochorenia tohto pacienta je zaznamenaný na obr. 4. Pre názornosť sú tu uvedené aj hodnoty CD34+,

ktoré podobne ako ostatné hematologické parametre korelovali s prítomnosťou mutácie *FLT3*-ITD. Veľkosť fragmentu mutovanej alely bola identická pri 1. analýze aj pri relapse ochorenia (po 13,5 mesiacoch), no odlišný bol pomer medzi mutovanou a nemutovanou alelou. Pri nasledujúcom kontrolnom vyšetrení (po 16 mesiacoch) bol už aj pomer medzi obidvoma alelami rovnaký ako pri 1. analýze.

#### Diskusia

Mutácie v géne *FLT3* u pacientov s AML patria k negatívnym prognostickým markerom a výrazne zvyšujú riziko relapsov a úmrtia, preto ich monitoring je už sú-





**Obr. 4. Elektroforeogram PCR fragmentov génu FLT3 u pacienta s prechodom MDS do AML.**

Vzorky boli zoradené podľa časovej osi za účelom potvrdenia identity mutácie FLT3-ITD pri prvej analýze a v čase relapsu. V hornej časti záznamu je časová os monitoringu FLT3 v mesiacoch, hviezdičkou je vyznačený relaps. Zdravý jedinec bol do analýzy zaradený ako kontrola amplifikácie nemutovanej alely (normal). Uvedené hodnoty CD34+ korelujú s FLT3 pozitivitou

ITD – interná tandemová mutácia, PCR – polymerázová reťazová reakcia, MDS – myelodysplastický syndróm, AML – akútna myeloblastová leukémia

**Tab. 1. Porovnanie výsledkov monitoringu FLT3 vo vzorkách pacientov s AML *de novo* analyzovaných v laboratóriu SEMBID a s publikovanou štúdiou (Thiede, 2002). Uvedené hodnoty sú v %.**

	FLT3–		ITD		FLT3+ TKD		ITD + TKD	
	SEMBID	Thiede	SEMBID	Thiede	SEMBID	Thiede	SEMBID	Thiede
všetci pacienti	72	73,6	18,4	18,7	9,2	5,9	1,4	1,7
bez aberácií	56	39,1	66	65	36	60,3	100	88
+ 8	5,9	9,6	3,8	3,3	9,1	10,3	0	0
<i>PML/RARA</i>	6,9	3,6	15,3	7,1	27	6,9	0	0
<i>CBFB/MYH11</i>	2,9	5	7,7	0,6	0	8,6	0	4,8
2 a viac aberácií	13,7	18,3	3,8	1,6	0	8,6	0	4,8

ITD – interná tandemová mutácia, TKD – tyrozínkinázová doména, AML – akútna myeloblastová leukémia

časťou základných molekulovo-genetických vyšetrovacích panelov. Výsledky dôkazu mutácií v géne FLT3 u pacientov východoslovenského regiónu s diagnózou AML *de novo* korelujú s publikovanými výsledkami štúdie nemeckých pacientov [21] napriek takmer rádovému rozdielu v počte pacientov (979 pacientov v uvedenej štúdii oproti 142 pacientov v aktuálnej štúdii) (tab. 1). Pre porovnanie výsledkov sme vybrali štúdiu, kde na dôkaz mutácií v géne FLT3 bola použitá rovnaká PCR metóda. Rozdiely vo výskyte translokácií t (15;

17)/*PML-RARA* a 16inv(16)(p13;q22)/t(16; 16) (p13; q22)//*CBFB- MYH11* oproti databáze nemeckých pacientov sú spôsobené pravdepodobne malým počtom pacientov v našom súbore. U pacientov s translokáciou *PML/RARA* bol pomer medzi FLT3– a FLT3-ITD+ približne 1 : 2 v oboch súboroch.

V súbore boli aj 2 pacientky (44 a 77 rokov) s obidvoma mutáciami. Predpokladá sa [22], že prítomnosť obidvoch mutácií zhoršuje prognózu. Napriek tomu 77-ročná pacientka s obidvoma mutáciami dosiahla remisiu. Materiál

tejto pacientky bude podrobený ďalším analýzám za účelom zistenia presného typu bodovej mutácie, ako aj lokalizovania mutácií FLT3-ITD a FLT3-TKD na alelách, t. j. či sú mutácie na tej istej alebo rôznych alelách.

U všetkých pacientov sme vyšetřovali paralelne PK aj KD pri vstupnom vyšetrení aj pri monitorovaní účinku terapie. V oboch materiáloch boli mutácie identické a dobre detegovateľné. Len v jedinom prípade relapsu bola mutácia prítomná len vo vzorke KD, vzorka PK bola negatívna.

Typ a veľkosť FLT3-ITD mutácie boli pri vstupnom vyšetrení a relapse u všetkých monitorovaných pacientov rovnaké, teda jednalo sa o rovnaký klon.

Mutácie v géne *FLT3* boli vyšetrované aj u MDS pacientov. Do štúdie sme vybrali len tých pacientov, u ktorých bol diagnostikovaný prechod do AML. Zaujímavosťou bolo, že pacienti bez FLT3 mutácie po prechode do AML zomreli do 6 mesiacov, zatiaľ čo pacient s FLT3-ITD prežil 16 mesiacov a druhá pacientka s FLT3-ITD zatiaľ prežíva viac ako rok. Tento fakt koreluje s publikovaným údajom [17], kde pacienti bez FLT3 mutácie prežívali kratšie (priemer 16 mesiacov) ako pacienti s mutáciou FLT3 (19 mesiacov). Vzhľadom na náš veľmi malý súbor sekundárnych AML pacientov nie je možné robiť podrobnejšie závery ani porovnávať údaje s literatúrou.

Na dôkaz mutácií v géne *FLT3* sme aplikovali jednoduchú PCR metódu so separáciou fragmentov na klasickej agarózovej elektroforéze a verifikácii pozitivity na mikročipe na zariadení Bioanalyzer 2100, kde sme presne určili veľkosti fragmentov ako aj pomer medzi mutovanou a nemutovanou alelou v prípade FLT3-ITD. Táto metóda bola dostatočne citlivá na dôkaz mutácií. Nebol problém ani s amplifikáciou dlhších úsekov FLT3-ITD, kde je viditeľný vyšší podiel mutovanej alely, ktorá je dlhšia ako nemutovaný fragment s nižšou intenzitou.

Výber vhodnej metódy je dôležitý pre správne zachytenie nielen pozitivity, ale aj pomeru medzi mutovanou (FLT3-ITD) a nemutovanou alelou (wild type – WT) v súvislosti s prognózou a možnosťou skoršieho relapsu a celkovým prežívaním pacienta. Dlhšie fragmenty a vyšší pomer FLT3-ITD : WT zhoršujú prognózu ochorenia [23].

## Záver

Výsledky analyzovaného súboru poukazujú na vhodne zvolenú PCR metódu, ktorá je relatívne rýchla a finančne nenáročná, čo umožňuje monitorovať mutácie v géne *FLT3* nielen u pacientov s AML, ale rutinne aj u všetkých MDS a CMMoL (chronická myelomonocytová leukémia) pacientov. Aplikovaná metóda bola do-

statočne citlivá na dôkaz mutácií a bezproblémovú amplifikáciu aj dlhších úsekov FLT3-ITD. Verifikácia *FLT3* pozitivity na mikročipe nahrádza separáciu PCR produktu na kapilárnej elektroforéze, ktorá je finančne podstatne náročnejšia ako analýza na mikročipe.

V rutinej klinickej praxi sú FLT3+ pacienti zatiaľ dilemou. Z dôvodu určenia prognózy v súčasnosti pre našich klinikov úplne stačí dôkaz FLT3 pozitivity a pravidelný monitoring tejto mutácie pri každej kontrole. Stanovenie pomeru FLT3-ITD : WT sa zatiaľ nevyžaduje. Monitoring MDS a CMMoL pacientov na prítomnosť *FLT3* mutácií by mal byť súčasťou základného vyšetrovacieho panelu v rámci molekulovej genetiky, pretože objavenie sa FLT3 pozitivity u týchto pacientov je predzvesťou prechodu do AML.

Vzhľadom na vývoj inhibítorov FLT3-tyrozínkinázy v súvislosti s liečbou FLT3+ pacientov sa uvažuje aj o zavedení štandardného postupu pri monitorovaní minimálneho reziduálneho ochorenia (minimal residual disease – MRD) na základe kvantifikácie FLT3-ITD (podobne ako u CML monitoring fúzneho génu *BCR/ABL*). V mnohých prípadoch je mutácia v géne *FLT3* jediný pozitívny genetický marker u AML pacientov.

## Podakovanie

Vďaka za spoluprácu patrí Mgr. Ivete Lučkovej a RNDr. Františkovi Spišákovi, PhD.

## Literatúra

1. Vašková J, Dubayová K, Čakanová G et al. Incidence and prognostic value of known genetic aberrations in patients with acute myeloid leukemia – a two year study. *Klin Onkol* 2015; 28(4): 278–283. doi: 10.14735/amko2015278.
2. Testa U, Pelosi E. The impact of FLT3 mutations on the development of acute myeloid leukemias. [online]. *Leukemia Research and Treatment*; 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/275760>.
3. Grafone T, Palmisano M, Nicci C et al. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology Reviews* 2012; 6(1): 8e. doi: 10.4081/oncol.2012.e8.
4. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993; 82(4): 1110–1119.
5. Rosnet O, Buhring HJ, Delapayere O et al. Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol* 1996; 95(3–4): 218–223. doi: 10.1159/000203881.
6. Griffith J, Black J, Faerman C et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004; 13(2): 169–178.

7. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA et al. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113(4): 983–988.
8. Yamamoto Y, Kioyi H, Nakano Y et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97(8): 2434–2439.
9. Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M et al. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 2003; 17(1): 120–124. doi: 10.1038/sj.leu.2402740.
10. Whitman SP, Archer KJ, Feng I et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplications of FLT-3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61(19): 7233–7239.
11. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meschinchi S et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107(9): 3724–3726. doi: 10.1182/blood-2005-08-3453.
12. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114(12): 2386–2392. doi: 10.1182/blood-2009-03-209999.
13. Kioyi H, Ohno R, Ueda R et al. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 2002; 21(16): 2555–2563. doi: 10.1038/sj.onc.1205332.
14. Kusec R, Vrsalovic M, Bobetic T et al. Fms-Like Tyrosine Kinase (FLT3) gene ITD mutation in acute myeloid leukemia. *Zdrav Vestn* 2004; 73 (supl 1): 5–7.
15. Small, D. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 178–184. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.178.
16. Zaker F, Mohammadzadeh M, Mohammadi M. Detection of KIT and FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia with Different Subtypes. *Arch Iran Med* 2010; 13(1): 21–25.
17. Daver N, Strati P, Jabbour E et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol* 2013; 88(1): 56–59. doi: 10.1002/ajh.23345.
18. Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. [online]. *Journal of Hematology & Oncology* 2011; 4: 13. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-13>.
19. Ilenciková D, Sýkora J, Mikulášová Z et al. Identifikácia molekulárných markerov u detí s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML). *Klin Onkol* 2012; 25(1): 26–35. doi: 10.14735/amko201226.
20. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15(13): 4263–4269. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.
21. Thiede C, Steudel C, Mohr B 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): 4326–4335.
22. Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R et al. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* 2005; 105(9): 3679–3685. doi: 10.1182/blood-2004-06-2459.
23. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013: 220–226. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.220.