

Badanie wewnątrzrandemowej duplikacji genu *FLT3* u chorych z ostrą białaczką szpikową

Studies of *FLT3* internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients

Szymon Zmorzyński¹, Dorota Koczkodaj¹, Małgorzata Michalak¹, Ewa Wąsik-Szczepanek², Agata Filip¹

STRESZCZENIE

Ostra białaczka szpikowa (OBS) jest zróżnicowaną chorobą hematologiczną. Wewnątrzrandemowa duplikacja genu *FLT3* (*FLT3*-ITD) wpływa niekorzystnie na rokowanie i jest wykrywana u około 25% chorych na OBS (we wszystkich podtypach według klasyfikacji FAB). Mutacje genu *FLT3* występują najczęściej u chorych na OBS z prawidłowym kariotypem.

W celu wykrycia mutacji *FLT3*-ITD wykorzystano reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR). Badanie wykonano u 15 chorych na OBS, u 4 chorych wykryto mutację *FLT3*-ITD.

Słowa kluczowe: ostra białaczka szpikowa, prawidłowy kariotyp, mutacja genu *FLT3*

SUMMARY

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous hematologic disease. A *FLT3*-internal tandem duplication (*FLT3*-ITD) mutation imparts a particularly poor prognosis. It is found approximately in 25% of patients with AML (in all subtypes according to FAB classification). Mutations of *FLT3* are the most common abnormalities in AML patients with normal karyotypes.

To assess the internal tandem mutation in *FLT3* gene we used polymerase chain reaction (PCR) to screen 15 AML patients. *FLT3*-ITD mutation was detected in 4 of 15 patients with AML.

Key words: Acute myeloid leukemia, Normal karyotype, *FLT3* gene mutation

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 16.04.2012
Zaakceptowano: 25.04.2012

¹ Zakład Genetyki Nowotworów z Pracownią Cytogenetyczną, Uniwersytet Medyczny, Lublin
Kierownik: dr hab. Agata Filip

² Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny, Lublin
Kierownik: Prof. dr hab. Anna Dmoszyńska

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres autora korespondencyjnego:
Szymon Zmorzyński
Zakład Genetyki Nowotworów
ul. Radziwiłłowska 11
20-950 Lublin
tel./fax 81 528 84 10
e-mail: s.zmorzynski@gmail.com

Praca zrealizowana w ramach projektu NN402187035

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (2b): 229–233

Wstęp

Ostra białaczka szpikowa – OBS (*acute myeloid leukemia*; AML) jest najczęściej spotykaną postacią białaczki u osób dorosłych. Występuje jako choroba klonalna, w której dochodzi do nadmiernej proliferacji i kumulacji niedojrzałych morfologicznie oraz czynnościowo komórek blastycznych [1]. Komórki te wywodzą się z prekursorowej, transformowanej nowotworowo macierzystej komórki hematopoetycznej szpiku z wyłączeniem linii limfoidalnej [1, 2]. OBS stanowi 75–80% przypadków ostrych białaczek u dorosłych, natomiast u dzieci występuje w około 15% wszystkich przypadków [3].

Niestabilności chromosomowe wykrywane pod postacią aberracji chromosomowych są klasycznym markerem wielu procesów rozrostowych wywodzących się z układu hematopoetycznego. Mają one kluczowe znaczenie nie tylko dla właściwego rozpoznania, lecz również dla rokowania przebiegu choroby oraz przewidywania odpowiedzi na stosowane leczenie. Stąd

też niezmiernie ważne w postępowaniu diagnostycznym jest wykorzystanie metod umożliwiających pozyskanie wiedzy adekwatnej do potrzeb klinicysty.

Klonalne aberracje chromosomowe występują u 60–70% chorych na OBS [4]. Dotychczas opisano ponad 200 strukturalnych i liczbowych zaburzeń, m.in. translokacje zrównoważone i niezrównoważone, wzajemne i niewzajemne, insercje, delecje, izochromosomy oraz izolowane trisomie lub monosomie [5]. Częstość występowania tych zmian jest różna, niektóre opisano tylko w pojedynczych przypadkach. Zmiany te korelują z obrazem morfologicznym i klinicznym białaczki [6, 7]. Molekularna charakterystyka zrównoważonych translokacji i inwersji, takich jak t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22) i t(15;17)(q22;q11-21), które zostały uznane za zmiany klonalne, ma implikacje dla patogenezy różnych podtypów OBS. Dotychczasowa wiedza dotycząca molekularnej patogenezy OBS ze złożonymi kariotypami jest niewielka. Powszechnie opi-

sywane są duże nieprawidłowości chromosomowe: t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17) i rearanżacje 11q23. Złożone kariotypy, występujące u około 10% do 15% dorosłych chorych z OBS, wiąże się z wczesną fazą mielodysplastyczną albo uprzednią ekspozycją na czynniki toksyczne i niemal niezmiennie z niekorzystnym rokowaniem [8, 9].

U około 45% chorych na OBS niewielkie zmiany strukturalne chromosomów są niewykrywalne w standardowym badaniu cytogenetycznym, czego następstwem jest prawidłowy wynik badania. Rozpoznanie prawidłowego kariotypu można postawić dopiero po dokładnej analizie co najmniej 20 metafaz komórek szpiku [10]. Chorzy z prawidłowym kariotypem (*cytogenetically normal AML*; CN-AML) są klasyfikowani do grupy pośredniego ryzyka razem z nosicielami t(9;11) i trisomii 8 (+8) [11]. W tej grupie chorych istotne znaczenie ma badanie genu *FLT3* (locus 13q12) kodującego kinazę tyrozynową receptora klasy III (*fms-like tyrosine kinase 3*; *FLT3*).

Kinazy tyrozynowe są enzymami, które powodują fosforylację białek biorących udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych. Wyróżnia się dwa podtypy kinaz tyrozynowych – receptorowe (*receptor*

tyrosine kinases; RTKs) i niereceptorowe. Receptory kinaz tyrozynowych składają się z czterech domen: zewnątrzkomórkowej – wiążącej ligand, okołobłonowej i dwóch wewnątrzkomórkowych o aktywności kinazy tyrozynowej [12]. Receptor *FLT3* jest obecny na powierzchni wczesnych komórek progenitorowych hematopojezy [13]. Wewnątrzkomórkowa domena kinazowa może łączyć się z innymi receptorami tej rodziny, np. *FMS*, *KIT*, *PDGFRA* i *PDGFRB* [14]. Ligand *FLT3* poprzez swój receptor *FLT3* odgrywa istotną rolę w proliferacji i różnicowaniu progenitorowych komórek hematopoetycznych, a także w patogenezie OBS [4, 15]. Autofosforylacja receptora *FLT3* aktywuje wewnątrzkomórkowe drogi sygnałowe odpowiedzialne za proliferację [15]. Ekspresja genu *FLT3* jest hamowana podczas dojrzewania komórek, a jego mutacje są obecne u 25% chorych na OBS (we wszystkich podtypach wg FAB), w tym u 35–45% chorych z prawidłowym kariotypem [16, 17]. W ostrej białaczkę promielocytowej obserwuje się częstsze występowanie mutacji tego genu [18].

Wyróżnia się dwie kategorie mutacji *FLT3*: mutacje typu *FLT3-Lenght Mutation (FLT3-LM)* i muta-

Tabela I. Charakterystyka kliniczna i molekularna pacjentów z OBS

Table I. Clinical and molecular characteristics of patients with AML

Lp.	Wiek	Płeć	Typ MLA wg FAB	Przeżycie	WBC G/l	RBC M/ μ L	HGB g/dl	HCT %	PLT G/l	kariotyp	Mutacja <i>FLT3</i> -ITD
1	28	K	M-3	Tak	0,8	2,71	8,1	24,2	16,0	46,XX	-
2	54	M	M-1	Nie	36,50	1,96	7,5	21,7	16,0	46,XY	+
3	60	K	M-5	Nie	4,48	2,84	8,4	25,7	36,0	45-47,XX, del(15)(q13q33)[5], +8[3], +20[4], -21[7], +mar[cp]/46,XX	-
4	57	M	M-4	Nie	3,9	2,85	8,1	25,8	783,0	46,XY,i(7)(q10),-13,-15,+mar1,+mar2/46,XY	-
5	76	M	M-4	Tak	1,64	3,6	10,1	32,2	110,0	46,XY	-
6	62	M	M-4	Tak	-	-	-	-	-	46,XY	-
7	63	M	M-4	Tak	2,76	3,04	9,8	28,0	33,0	46,XY	-
8	46	K	M-5	Tak	111,80	2,27	7,1	20,3	40,0	46,XX	-
9	62	K	M-5	Tak	409,50	3,76	11,8	38,2	27,0	47,XX,+8[3]/46,XX[27]	+
10	47	M	M-5	Tak	2,50	2,45	8,5	27,0	57,0	46,XY	-
11	63	M	M-4	Tak	0,54	2,19	7,7	21,5	177,0	46,XY	-
12	40	M	M-4	Tak	15,0	2,46	8,2	24,4	33,0	Brak mitoz do analizy	-
13	56	M	M-4	Tak	-	-	-	-	-	46,XY	+
14	53	M	M-1	Tak	-	-	-	-	-	46,XY	+
15	66	K	M-4	Tak	-	-	-	-	-	46,XX	-

cje punktowe zmiany sensu. Mutacja *FLT3-LM* jest heterogenna i może mieć postać insercji, delecji i tzw. wewnątrzrandemowej duplikacji (*internal tandem duplication; FLT3-ITD*). Ta ostatnia obejmuje obszar genu kodujący domenę okołobłonową (*juxtamembrane; JM*). *FLT3-ITD* stwierdza się u 25% dorosłych chorych na OBS i w około 45% przypadków OBS z prawidłowym kariotypem [15].

Mutacja *FLT3-ITD* zwykle zachodzi w obrębie egzonu 14 lub 15 i zazwyczaj jest rezultatem podwojenia regionu obejmującego od 3 do 400 par zasad (w egzonie 14 lub 15) [16].

U chorych na OBS z mutacjami wewnątrzkomórkowej domeny kinazy tyrozynowej (*tyrosine kinase domain; FLT3-TKD*) rokowanie może zależeć od rodzaju mutacji punktowych (zmiany sensu) genu *FLT3* [16]. Zazwyczaj stwierdza się je w kodonie 835 (egzon 20, *FLT3/D835*), a skutkują zamianą kwasu asparaginowego na tyrozynę (D835Y). Rzadziej kwas asparaginowy jest podstawiany przez walinę (D835V), histydynę (D835H), resztę kwasu glutaminowego lub asparaginę (D835N). Mutacje punktowe mogą być obecne w kodonie 680 (egzon 16), co powoduje wstawienie waliny zamiast alaniny (A680V) [12].

Przedstawiona praca zawiera wstępne wyniki badań dotyczące mutacji *FLT3-ITD* u 15 kolejnych chorych na ostrą białaczkę szpikową.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 15 chorych (5 kobiet i 10 mężczyzn) w wieku od 28 do 76 lat. Rozpoznanie OBS ustalono w oparciu o standardowe kryteria FAB (French-American-British).

Aspiraty szpiku kostnego od chorych z OBS zostały podzielone na część do hodowli komórkowej i część do izolacji DNA. Z próbek szpiku założono 24- i 72-godzinne niestymulowane hodowle komórkowe (RPMI 1640 z 15% FCS; penicylina 100 U/ml; streptomycyna 50 µg/ml). Hodowle kończono standardowo, a następnie wykonano odpowiednie wybarwienie otrzymanych chromosomów (prążki GTG i RHG). Ocena cytogenetyczna w wybranych przypadkach została poszerzona o technikę FISH.

Fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH) przeprowadzono na utrwalonych niebarwionych preparatach komórek szpiku. Wykorzystano sondy komplementarne do sekwencji unikatowych genów pozwalające na wykrycie t(15;17) (*PML/RARα*) oraz do sekwencji alfa satelitarnych centromerowych chromosomu 8 (VYSIS). Sondy znakowane były różnymi fluorochromami: FITC, Rodamina, Texas Red. Sygnały hybrydyzacyjne oceniano w mikroskopie OLYMPUS z przystawką fluorescencyjną i zestawem odpowiednich filtrów.

Następnie wykonano analizy molekularne (wykorzystując DNA izolowane [kit firma Qiagen] z komórek szpiku chorych) mające na celu wykrycie wewnątrzrandemowej duplikacji w genie *FLT3*. W tym celu reakcji PCR (aparat firmy Applied Biosystem) został poddany fragment genu *FLT3* obejmujący 14 i 15 egzony [19]. Prawidłowa długość badanego odcinka wynosi 329 pz. Odcinek z wewnątrzrandemową duplikacją jest większy i migruje w żelu wolniej, co jest podstawą do analizy uzyskanych wyników. W reakcji PCR zastosowano startery (Genomed) o następujących sekwencjach:

- starter F: 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3'
- starter R: 5'-CTTTCAGCATTGACGGCAACC-3'

Do reakcji PCR użyto: DNA (150 ng), buforu reakcyjnego (10x stężony), mieszaniny dNTP (5 mM), starterów F i R (100 µM), polimerazy HD (2,5 U/µl). Mieszaninę reakcyjną uzupełniano wodą wolną od RN-az i DN-az do 25 µl (Sigma). Ilość DNA oceniano metodą spektrofotometryczną, wykorzystując aparat NanoDrop (Thermo Scientific).

Warunki reakcji przedstawiały się następująco:

- denaturacja wstępna – 95°C 5 min,
- 35 cykli: 95°C 30 s, 66°C 30 s, 72°C 30 s,
- elongacja końcowa – 72°C 5 min.

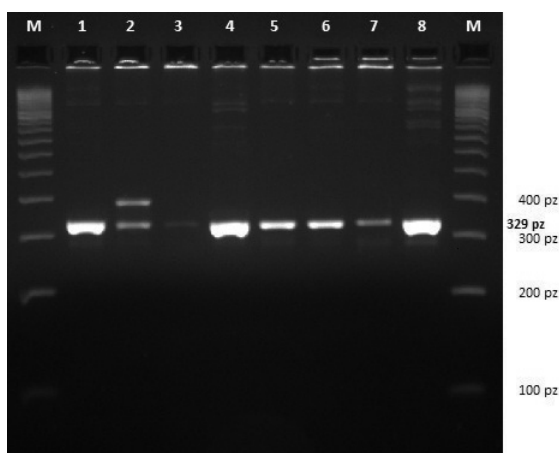
Powstały produkt w PCR poddano elektroforezie w 3,5% żelu agarozowym. Elektroforezę przeprowadzono przy napięciu 7,5 V/cm przez około 60 min, w obecności markera wielkości (Jules firma Fermentas) i próby kontrolnej (amplifikat DNA od zdrowego dawcy krwi).

Wyniki

Klasyfikacja cytogenetyczna w badanej grupie pacjentów z OBS w większości przypadków wykazała brak zmian w kariotypie. Tylko w trzech przypadkach zaobserwowano występowanie aberracji cytogenetycznych w niewielkiej liczbie komórek (Tab. I). Natomiast dzięki technice FISH u jednego z pacjentów (1) wykryto występowanie translokacji t(15;17) (*PML/RARα*).

Badania mutacji genu *FLT3-ITD* wykazały występowanie wewnątrzrandemowej duplikacji u czterech pacjentów z ostrą białaczką szpikową. U wszystkich chorych z mutacją zmiana dotyczyła tylko jednego allela. Allel z duplikacją charakteryzował się dłuższym produktem reakcji PCR niż allel prawidłowy o długości 329 par zasad, co w elektroforezie dało obraz dwóch prążków (Ryc 1, pacjent 2).

Mutacje *FLT3-ITD* zostały wykryte u trzech pacjentów z prawidłowym kariotypem (dwóch typ M-1 oraz jeden typ M-4) (Tab. I). Tylko u jednej chorej (typ M-5) w klasycznych badaniach cytogenetycznych stwierdzono występowanie trisomii chromosomu 8 oraz w badaniu molekularnym mutację *FLT3-ITD*.



Ryc 1. Analiza wewnątrzrandemowej duplikacji genu *FLT3*
Fig. 1. Analysis of *FLT3* internal tandem duplication

M – marker wielkości

1 – próba kontrolna (zdrowy dawca krwi)

2–8 – próby badane (pacjenci z OBS opisani w tabeli I numerami 2–8)

Omówienie

Mutacje *FLT3*-ITD występują częściej u dorosłych niż u dzieci i są rezultatem duplikacji i tandemowej insercji małych, wielkościowo zmiennych fragmentów genu [4, 20, 21].

Mutacje *FLT3*-ITD wpływają niekorzystnie na rokowanie, ponieważ korelują z częstymi nawrotami OBS [22, 23]. Korzystniejsze rokowanie (w grupie pośredniego ryzyka cytogenetycznego) mają chorzy z mutacjami *NPM1* i *CEBPA* niż z *FLT3*-ITD [24, 25]. *FLT3*-ITD prowadzi do autoaktywacji receptora *FLT3* mimo braku ligandu *FLT3L*, czego wynikiem jest nadekspresja *FLT3*, *WT1* i genów homeotycznych (*MEIS1*, *PBX3*, *HOXB3*) [12, 21].

Badania Ozeki i Bullingera dowiodły, że nadekspresja *FLT3* ma również niekorzystny wpływ na rokowanie [26, 27].

Częstość mutacji genu *FLT3* zwiększa się wraz z wiekiem, jednak *FLT3*-ITD u starszych chorych na OBS (powyżej 60. roku życia) ma niewielki wpływ na rokowanie, ze względu na obecność innych niekorzystnych zmian, np. rearanżacji regionu 11q23 [17, 21, 28].

W naszych badaniach mutację *FLT3*-ITD stwierdzono u czterech chorych (26%). Badania wielu autorów wykazały, że ten rodzaj mutacji jest obecny u 15–35% chorych na OBS [28–31]. Peng i wsp. wykazali korelację między obecnością mutacji *FLT3*-ITD a zwiększoną liczbą leukocytów we krwi, komórek blastycznych szpiku i podwyższoną aktywnością dehydrogenazy mleczanowej [32]. Ponadto sugerują, że *FLT3*-ITD może być niezależnym czynnikiem prognostycznym w ostrej białaczce szpikowej [32].

Wstępne wyniki badań wskazują, iż analiza mutacji *FLT3*-ITD może z powodzeniem być prowa-

dzona dostępną w wielu laboratoriach metodą reakcji łańcuchowej polimerazy.

PIŚMIENNICTWO

- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Blood*. 2005; 106: 3740–3746.
- Estey EH, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006; 368: 1894–1907.
- Balana-Nowak A, Zdziwłowska E. Cytometria przepływowa w diagnostyce immunofenotypowej ostrych białaczek. *Post Biol Kom*. 2008; 24: 65–102.
- Betz BL, Hess JL. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134: 1427–1433.
- Haus O. Zmiany cytogenetyczne i molekularne w ostrych białaczkach szpikowych. *Diagn Lab*. 2001; 37: 221–252.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, 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. *Blood*. 2002; 100: 4325–4336.
- Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 19–47
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. Medical Research Council Adult Leukemia Working Party: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML) – Analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical research Council AML 11 trial. *Blood* 2001; 98: 1312–1320.
- Schoch C, Haferlach T, Hasse D, et al. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: A study of 90 patients. *Br J Haematol*. 2000; 112: 118–126.
- Spiekermann K. Biology of AML with normal karyotype. Acute leukemias XL Prognostic factors and treatment strategies. *Ann Haematol*. 2006; 85: 107–110.
- Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 169–177.
- Rupa J, Lewandowski K. Przydatność rokownicza mutacji genu *fms*-podobnej kinazy tyrozynowej 3 (*FLT3*) w chorobach limfo- i mieloproliferacyjnych. *Acta Haemat Pol*. 2005; 36: 17–32.
- Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003; 82–101.
- Zuo Z, Chandra P, Wen YH, Koepfen H. Molecular diagnostics of acute myeloid leukemia. *Diagn Histopathol*. 2009; 15: 531–539.
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002; 100: 1532–1542.
- Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics

- in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2010; 22: 646–655.
17. Foran JM. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010; 47–55.
 18. Smith ML, Hills RK, Grimwald D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2011; 25: 39–51.
 19. Balwierz W, Pietrzyk JJ, Skotnicki AB, Wątor G, Stożek K, Zawada M. et al. Badania molekularne w ostrej białaczce szpikowej u dzieci i dorosłych. W: *Hematologia molekularna – patogeneza, patomechanizmy i metody badawcze.* Red. Witt M, Szczepański T, Dawidowska M. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań 2009; 297–319.
 20. Gulley ML, Shea TC, Fedoriw Y. Genetic tests to evaluate prognosis and predict therapeutic response in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn.* 2010; 12: 3–16.
 21. Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and micro-RNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 2010; 116: 3622–3626.
 22. De Jonge HJM, Huls G, de Bont ESJM. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *Neth J Med.* 2011; 69: 167–176.
 23. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1909–1918.
 24. Liso A, Castiglione F, Cappucino A, et al. A one-mutation mathematical model can explain the age incidence of acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1). *Haematologica.* 2008; 93: 1219–1226.
 25. Mrózek K, Marucci G, Paschka P, Bloomfield CD. Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2008; 20: 711–718.
 26. Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2004; 103: 1901–1908.
 27. Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1605–1616.
 28. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001; 97: 3598–3595.
 29. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996; 10: 1911–1918.
 30. Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood.* 2006; 108: 3654–3661.
 31. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in large cohort young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2007; 111: 2776–2784.
 32. Peng HL, Zhang GS, Gong FJ, et al. Fms-like tyrosine kinase (FLT) 3 and FLT3 internal tandem duplication in different types of adult leukemia: analysis of 147 patients. *Croat Med J.* 2008; 49: 650–659.