

FLT3, NPM1 y C/EBP α como marcadores de pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda

Francisco Alejandro Lagunas-Rangel¹
Víctor Alfredo Pérez-Contreras²
Carlos Cortés-Penagos^{1,2}

¹ Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

² Laboratorios Mendel, Morelia, Michoacán, México.

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda es un grupo de enfermedades fenotípica y genéticamente heterogéneas, originadas por la acumulación de mutaciones en una célula madre hematopoyética o célula progenitora. De manera tradicional, los estudios citogenéticos se han utilizado para estratificar a los pacientes con leucemia mieloide aguda en tres categorías: favorable, intermedio y desfavorable. Sin embargo, la estratificación pronóstica y la decisión del tratamiento para los pacientes que tienen cariotipo normal muestra dificultades debido a la alta heterogeneidad clínica. Recientemente, la identificación de mutaciones genéticas adicionales a los marcadores clásicos permitió generar nuevas entidades en el grupo de leucemia mieloide aguda respecto al tratamiento y seguimiento de esta enfermedad. En 2008, la Organización Mundial de la Salud introdujo las mutaciones en NPM1 y C/EBP α como entidades dentro del grupo de leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes, mientras que las mutaciones en el gen FLT3 se han descrito como de mal pronóstico en los pacientes portadores. El conocimiento de estas mutaciones no sólo apoya el seguimiento de esta enfermedad, sino que abre la posibilidad de generar nuevas estrategias de tratamiento.

Palabras clave: leucemia mieloide aguda, marcador molecular, pronóstico, proliferación, diferenciación celular.

FLT3, NPM1 y C/EBP α as prognosis markers in patients with acute myeloid leukemia

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) can be described as a group of diseases, phenotypic and genetically heterogeneous originated by multiple mutations in a progenitor or hematopoietic stem cell. Cytogenetics is traditionally used to stratify the patients with AML in three risk categories: favorable, intermediate and unfavorable. However, the forecast stratification and the treatment decision for patients with normal karyotype shows difficulties due to the high clinical heterogeneity. Recently, the identification of several genetic mutations additional to classical molecular markers, have been useful to identify new entities

Recibido: 15 de enero 2015

Aceptado: 24 de marzo 2015

Correspondencia: Dr. Carlos Cortés Penagos
neocccs@yahoo.com

Este artículo debe citarse como
Lagunas-Rangel FA, Pérez-Contreras VA, Cortés-Penagos C. FLT3, NPM1 y C/EBP α como marcadores de pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda. Rev Mex Hematol 2015;16:152-167.

in AML. In 2008, the World Health Organization introduced the mutations in NPM1 and C/EBP α as entities within the group of AML with recurrent genetic abnormalities. On the other hand, FLT3 mutations have been associated with poor responses in patients positive to this mutation. The knowledge of these new mutations has been useful to clinical stratification of AML patients and opens the possibility to find new strategies of treatment.

Key words: acute myeloid leukemia, molecular marker, prognostic, proliferation, cellular differentiation.

ANTECEDENTES

La leucemia mieloide aguda es un conjunto de enfermedades hematológicas de progresión rápida, fenotípica y genéticamente heterogéneas, caracterizadas por la expansión clonal de precursores mieloides con capacidad disminuida de diferenciación. Durante la evolución de este tipo de leucemia, la célula madre hematopoyética o célula progenitora sufre una serie de alteraciones genéticas que modifican en algún punto su sistema de señalización celular (receptor-segundo mensajero-proteína efectora), teniendo como consecuencia cambios en la funcionalidad y expresión de proteínas que son clave en procesos como proliferación, muerte y diferenciación celular (Figura 1).¹ Se ha postulado que para que ocurra la evolución de la leucemia mieloide aguda deben darse dos clases de mutaciones: las que le confieren una ventaja proliferativa (clase I) y las que bloquean el proceso de diferenciación celular (clase II; Figura 2).^{1,2} Este modelo propuesto por Gilliland en 2001, conocido como teoría de los dos "hits", supone que la mayor parte de las leucemias agudas son la consecuencia de al menos dos mutaciones.³⁻⁵ La identificación de estas modificaciones genéticas requiere tecnología y metodologías que no son convencionales en los laboratorios de diagnóstico y para muchas de ellas aún no se conoce

su asociación con alguna característica clínica de valor diagnóstico o pronóstico.

La citogenética clásica y molecular se ha utilizado tradicionalmente para la identificación de algunas alteraciones genéticas asociadas con leucemia mieloide aguda (traslocaciones, eliminaciones, inversiones, etc.), lo que ha permitido estratificar a los pacientes con este padecimiento en tres categorías de riesgo: favorable, intermedio y desfavorable. Así, los pacientes con t(8;21)(q22;q22) [RUNX1/RUNX1T1], inv(16)(p13q22) [CBFB/MYH11] y t(15;17)(q24;q21) [PML/RARA] tienen un pronóstico favorable con buena respuesta al tratamiento y remisiones completas. Por otra parte, los pacientes con t(9;11)(p22;q23) [MLLT3/MLL] se consideran con pronóstico intermedio, y en los pacientes con t(6;9)(p23;q34) [DEK/NUP214], inv(3)(q21q26) [RPN1/EV11] y t(1;22)(p13;q13) [RBM15/MKL1] el pronóstico clínico es malo debido a la agresividad del padecimiento y la baja respuesta al tratamiento.^{6,7} Sin embargo, un grupo importante de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda tienen un cariotipo normal; esto es, sin alteraciones cromosómicas evidentes. Estos pacientes se clasifican con pronóstico intermedio, debido a que clínicamente no se tiene un marcador de referencia y su origen biológico aún es desconocido.

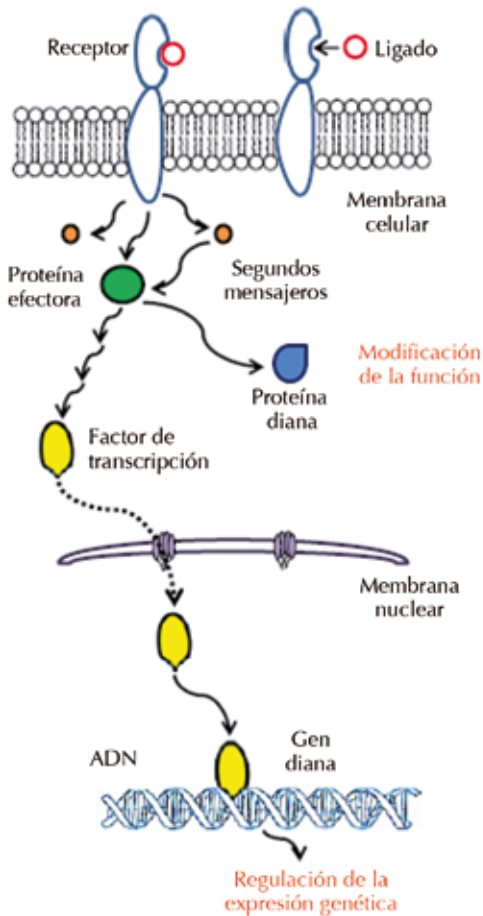


Figura 1. Esquema general del sistema de señalización celular dependiente de un receptor.

Recientemente, con el desarrollo de metodologías de secuenciación masiva, se han identificado nuevas mutaciones genéticas asociadas con la leucemia mieloide aguda. Algunos de los genes identificados incluyen a: *c-KIT*, *FLT3*, *MLL*, *NPM1*, *C/EBPα*, *RAS*, *RUNX1*, *WT1*, *BAALC*, *ERG*, *MN1*, *DNMT*, *TET2*, *IDH*, *ASXL1*, *PTPN11* y *CBL*. De todos ellos destacan los que afectan a los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPα*, porque se han asociado con la respuesta al tratamiento y el progreso de esta enfermedad, principalmente de los pacientes con cariotipo

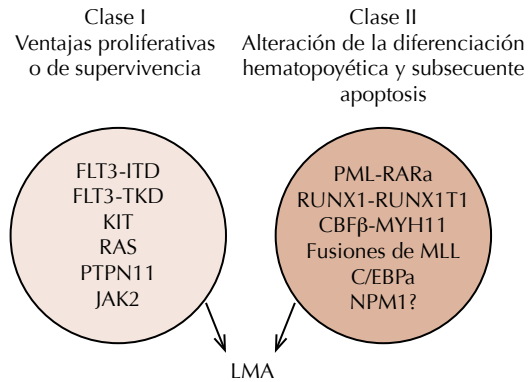


Figura 2. Modelo de interacción de las mutaciones asociadas con la aparición de leucemia mieloide aguda. Las mutaciones que confieren ventajas proliferativas se agrupan en la clase I y las que bloquean el proceso de diferenciación se agrupan en la clase II. Modificada de la referencia 43.

normal.^{2,6-8} En 2008, la Organización Mundial de la Salud publicó la actualización de la clasificación de neoplasias mieloides; uno de los principales cambios en esta revisión es la incorporación de las mutaciones en los genes *NPM1* y *C/EBPα* como entidades dentro del grupo de leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes. Las mutaciones en *FLT3* no se incluyeron como entidad independiente debido a que éstas se asocian con otros marcadores ya descritos. Sin embargo, su significado no debe subestimarse debido a que su identificación es especialmente valiosa en pacientes con cariotipo normal u otra anomalía genética recurrente debido a que puede establecer el pronóstico de la leucemia.⁷

Debido a la importancia que han adquirido estos tres marcadores genéticos en el diagnóstico y pronóstico de la leucemia mieloide aguda, en este trabajo se revisan los datos más relevantes de las mutaciones en los genes *FLT3* (*FLT3-ITD* y *FLT3-TKD*), *NPM1* y las que afectan a *C/EBPα*; se hace hincapié en su participación en la aparición de la neoplasia y su utilidad clínica.

FLT3**Estructura y función**

El gen *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) codifica para un receptor tipo tirosina cinasa (RTK) de clase III, que está relacionado estructuralmente con FMS, KIT, PDGFR α y PDGFR β debido a que posee cinco dominios tipo inmunoglobulina en la región extracelular, una única secuencia transmembrana e intracelularmente una corta región yuxtamembrana seguida por dos dominios cinasa separados por un sitio de inserción de la enzima cinasa (Figura 3).⁹⁻¹¹

La identificación del gen en murinos fue realizada independientemente por dos grupos utilizando diferentes estrategias de clonación en células madre hematopoyéticas de hígado fetal y placenta. El gen humano *FLT3* se clonó poco después a partir de células CD34+. Este gen se localiza en el cromosoma 13q12 y originalmente se pensó que contenía 21 exones similar a la relación intrón-exón de *KIT*, pero en realidad posee 24 exones, donde los tres primeros dominios inmunoglobulina extracelulares están codificados por ocho exones comparado con cinco exones para el caso de *KIT*.⁹⁻¹⁴

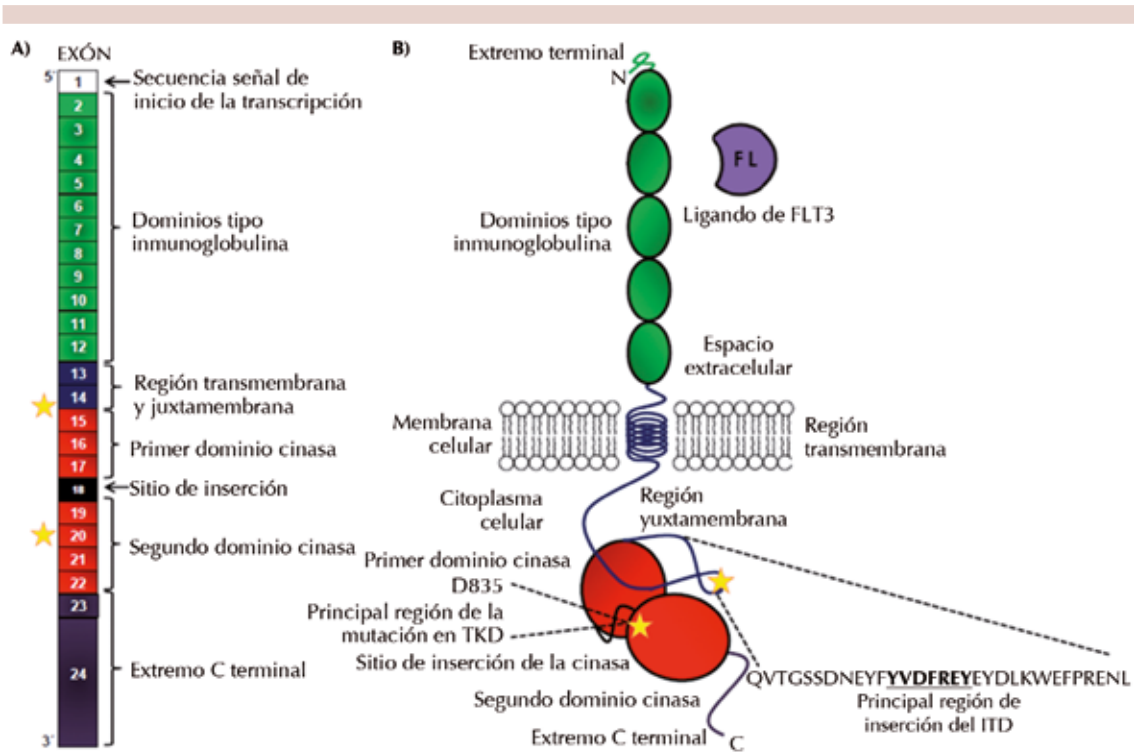


Figura 3. Mutaciones en el gen *FLT3* relevantes en la leucemia mieloide aguda. **A.** El gen *FLT3* posee 24 exones, en el exón 1 se localiza la secuencia señal de inicio de la transcripción (blanco); los exones 2 al 12 codifican los dominios tipo inmunoglobulina (verde); los exones 13 y 14 codifican principalmente la región transmembrana y yuxtamembrana (azul), respectivamente. Los dos dominios cinasa (rojo) están codificados por los exones 15 a 17 y 19 a 22, separados por el sitio de inserción codificado por el exón 18. Finalmente, el extremo C terminal (morado) es codificado por los últimos dos exones. **B.** La proteína *FLT3* es un receptor tirosina cinasa de clase III. La mutación *FLT3*-ITD ocurre en la región yuxtamembrana, eliminando el impedimento estérico que normalmente bloquea la dimerización, mientras que *FLT3*-TKD estabiliza la forma activa de la proteína. Los sitios donde ocurren las mutaciones *FLT3*-ITD y TKD se detallan con estrellas. Modificada de las referencias 18 y 44.

La proteína FLT3 contiene 993 aminoácidos, con una homología de 85% al compararla con la proteína de ratón. Tiene dos isoformas, la primera de 158 a 160 kDa, unida a la membrana celular y modificada postraduccionalmente por glicosilación, y la segunda de 130 a 143 kDa, que no se asocia con la membrana celular y tampoco es glicosilada. La proteína FLT3 se expresa principalmente en precursores tempranos mieloides y linfoides CD34+, aunque también se ha encontrado en otros órganos linfo-hematopoyéticos, como el hígado, el bazo, el timo y la placenta, así como en las gónadas y el cerebro. La expresión de FLT3 se pierde gradualmente a medida que avanza el proceso de diferenciación celular.^{9,10,12}

FLT3 normalmente reside en la membrana celular de manera monomérica, con una configuración que impide su activación. Al unirse FLT3 a su ligando específico (FL) se produce un cambio conformacional que permite la dimerización y autofosforilación en trans de varios residuos de tirosina en el dominio intracelular, creando sitios de acoplamiento para proteínas transductoras como SHC, GRB2, VAC, GAB2, SHIP, CBL y CBLB, que activan diversas vías de señalización celular. La cascada de señalización involucra la fosforilación y activación de múltiples mediadores secundarios incluyendo PI3K, PLC γ , MAPK y RAS. La actividad de FLT3 es altamente dependiente del tipo celular y otros factores de crecimiento que actúan sinérgicamente en la célula; ejemplos son la IL-3, el G-CSF, el GM-CSF, la EPO y KIT que producen en colaboración con FLT3 una vigorosa respuesta proliferativa. La activación de FLT3 juega un papel crítico en la hematopoyesis y el crecimiento celular, debido a que regula diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis celular.^{2,9,15}

Los principales mecanismos autoinhibitorios en FLT3, que permiten su actividad únicamente al unirse a su ligando, son los dominios de cinasa N y C terminal (*bilobal kinase fold*), el "loop"

de activación y el dominio yuxtamembrana. El dominio cinasa N y C terminal se doblan en dirección opuesta, permitiendo que los residuos catalíticos clave de ambos dominios se alineen únicamente después del cambio conformacional que desencadena la unión al ligando. El loop de activación muestra varios residuos tirosina que modifican su conformación al fosforilarse, de una estructura cerrada a una estructura abierta que permite el paso de los sustratos y el ATP. Por otra parte, la región yuxtamembrana estabiliza la conformación autoinhibida mediante diversas interacciones no covalentes de la cinasa; por esta razón, al modificar la estructura con el ligando se induce la fosforilación de diversos residuos tirosina conservados que eliminan estas uniones e inducen la activación de la proteína.^{14,16-18}

Recientemente se describieron diversas mutaciones en el gen *FLT3* en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA, 1 a 3% de los pacientes), síndromes mielodisplásicos (SMD, 5 a 10%) y leucemia mieloide aguda (LMA, 15 a 35%), haciendo de *FLT3* uno de los genes más frecuentemente mutados en neoplasias hematológicas.⁹ Notablemente *FLT3* es sobreexpresado en 70 a 90% de los pacientes con leucemia mieloide aguda y linfoblástica aguda, y una tercera parte de los pacientes con leucemia mieloide aguda tienen alguna mutación en *FLT3*. Los pacientes con leucemia linfoblástica aguda con alguna translocación que involucra el gen *MLL* tienen un perfil genético único que se distingue por la sobreexpresión de *FLT3*. De acuerdo con la hipótesis de los dos "hits", las mutaciones en *FLT3* pueden cooperar funcionalmente con otras mutaciones genéticas para inducir la transformación leucémica. Dos distintas clases de mutaciones se han identificado en pacientes con leucemia mieloide aguda que involucran la activación constitutiva de FLT3, una en la región yuxtamembrana y otra dentro del "loop" de activación en el dominio tirosina cinasa, denominadas FLT3-ITD y FLT3-TKD, respectivamente.^{2,9}

Mutaciones en FLT3

FLT3-ITD. La mutación más común en FLT3 involucra una duplicación genética en tándem interna (ITD) entre los exones 14 y 15 correspondientes al dominio yuxtamembrana, que varía en longitud y posición de paciente a paciente.⁹ FLT3-ITD se describió por primera vez en 1996 cuando al realizar la detección sistemática de la expresión de FLT3 en pacientes con leucemia, se identificaron por PCR productos de amplificación más grandes de lo esperado.¹⁹ La mutación FLT3-ITD ocurre cuando un fragmento de la secuencia que codifica el dominio yuxtamembrana se duplica y se inserta. La longitud del ITD varía de 3 a 400 pb, siendo siempre un múltiplo de tres nucleótidos, por lo que se preserva el marco de lectura. Los grupos de Meshinchi y Kayser reportaron de manera independiente que el promedio de los amplificados es de 59 pb, involucrando la duplicación de al menos uno de los siete residuos del codón 591 a 597; este último es el más común. En algunos casos es posible identificar más de cinco diferentes clonas con diferente número de repetidos, puntos de inserción y relaciones alélicas. La causa de la duplicación aún no se conoce; sin embargo, se sugiere que durante la replicación del ADN, una secuencia palindrómica en la cadena retrasada forma una estructura en horquilla, que permite la duplicación, aunado a una falla general en los mecanismos de reparación por *mismatch*. Otras teorías sugieren un defecto en el proceso de reparación *slippage*, posterior a la ruptura simultánea de la cadena líder y retrasada.^{11,17,20-22}

Se ha sugerido que el cambio conformacional ocasionado por el segmento de la duplicación de FLT3-ITD es responsable de eliminar el impedimento estérico que normalmente bloquea la dimerización sin estimulación del ligando, exponiendo así diversos sitios dentro de los dominios tirosina cinasa que inducen su autofosforilación. Los experimentos en modelos de trasplante de

médula ósea en ratón indican que FLT3-ITD es suficiente para promover un cambio fenotípico asociado con proliferación aumentada, pero es insuficiente para inducir leucemia aguda manifiesta.^{2,9,15}

La incidencia de la mutación FLT3-ITD se correlaciona con la edad de los pacientes con leucemia mieloide aguda; en pacientes pediátricos menores de 10 años ocurre en 5 a 16% de los casos, con aumento significativo en pacientes mayores de 10 años. En pacientes adultos se reporta una incidencia de 25 a 35%, sin incremento con la edad. El efecto más significativo de esta mutación es su asociación con altas cuentas blásticas, incremento del riesgo de recaída y disminución de la supervivencia. Diversos grupos reportaron que FLT3-ITD es uno de los principales marcadores de riesgo debido a que predice un resultado adverso. Las mutaciones FLT3-ITD se han correlacionado con ciertos subgrupos citogenéticos; son especialmente frecuentes en pacientes con un cariotipo normal. Se ha reportado que 30 a 50% de los pacientes con leucemia aguda promielocítica con t(15;17) (q22;q12) [PML-RARA] también tienen alguna mutación en FLT3. Asimismo, se ha reportado una asociación frecuente con la t(6;9)(p23;q34) [DEK-NUP214] (~90%). Otras mutaciones asociadas con FLT3-ITD ocurren en NPM1 y DNMT3a. Estudios retrospectivos sugieren que la existencia de mutaciones en NPM1 pueden disminuir el pronóstico negativo de FLT3-ITD, sólo si la relación alélica de este último es baja.^{9,15,20,23}

En contraste con la proteína FLT3 normal, FLT3-ITD activa la vía STAT5 significativamente. La existencia de regiones fosforiladas en la región yuxtamembrana de FLT3-ITD permite que interactúe con proteínas proximales del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, lo que inhibe su procesamiento por las enzimas de estos complejos, resultando en la retención

del receptor en el citoplasma y aumentando el tiempo de exposición a sustratos como STAT5. La proteína STAT5 induce la expresión de genes como la ciclina D1, c-MYC y p21, que son importantes reguladores de la proliferación celular. Por otra parte, las proteínas Pu.1 y CEBP α , involucradas en la regulación de la diferenciación en células hematopoyéticas, son significativamente reprimidas por FLT3-ITD, lo que sugiere su contribución en el bloqueo de la diferenciación. Además, se ha reportado que FLT3-ITD inicia un ciclo de inestabilidad genómica, incrementando las especies reactivas de oxígeno (ROS) que favorecen fenómenos como el rompimiento de la doble cadena de ADN y errores en la reparación.^{2,9,15,18,20,24}

FLT3-ITD se encuentra con más frecuencia de forma heterocigota y se ha observado que la relación alélica (FLT3-ITD/FLT3) determina en gran medida el pronóstico clínico en pacientes con esta mutación. Varios estudios han indicado que los valores altos de relación alélica tienen peor pronóstico clínico, debido a que la existencia de la proteína FLT3 normal interfiere y bloquea la señalización aberrante de FLT3-ITD. Se ha propuesto que la pérdida de la heterocigocidad (LOH) puede deberse a la recombinación homóloga del alelo FLT3-ITD, creando más copias del alelo mutado que del normal, lo que implica un alto riesgo de recaída y muerte.^{15,24}

Stirewalt y su grupo reportaron que los diferentes tamaños del ITD en el gen *FLT3* tienen un importante efecto en el tratamiento y supervivencia. Los pacientes con fragmentos largos del ITD (≥ 40 pb) tuvieron peor respuesta al tratamiento que aquéllos con fragmentos pequeños (< 40 pb), lo que a su vez disminuye el tiempo de supervivencia. Sin embargo, estos resultados contrastan con otros reportes en los que no se observa una asociación; se necesitan más estudios antes de definir una conclusión que pueda ser trasladada al manejo clínico de estos pacientes.²⁵⁻²⁷

Existen diversos métodos experimentales para detectar la mutación FLT3-ITD; la más utilizada es mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida de los productos de PCR generados de la amplificación de los exones 14 y 15. Por lo general, las muestras utilizadas son médula ósea o sangre periférica, de las que indistintamente se realiza la extracción de ácidos nucleicos (ADN o ARN). Libura y colaboradores reportaron que el uso de cDNA, obtenido a partir de ARN, es una a dos escalas logarítmicas más sensible que el ADN. Se sugiere que esta diferencia se debe a que al utilizar ARN se realizan dos amplificaciones: la primera en la transcripción reversa para obtener el cDNA, y la segunda en la reacción de PCR, lo que no ocurre al utilizar ADN, pudiendo así detectar concentraciones más bajas de FLT3-ITD. La relación alélica se puede determinar utilizando marcadores fluorescentes que se unen al ADN, así los productos de PCR se separan de acuerdo con su tamaño mediante electroforesis capilar y se mide la abundancia de cada fragmento por la intensidad de la fluorescencia después de producir la excitación del fluoróforo con láser.^{9,28}

FLT3-TKD. El segundo tipo de mutación en FLT3 son mutaciones puntuales "missense" en el exón 20 del loop de activación en el dominio tirosina cinasa (TKD). La mutación FLT3-TKD se ha encontrado en células malignas de pacientes con leucemia mieloide crónica (1%), leucemia linfoblástica aguda (1-3%), síndromes mielodisplásicos (2-5%) y leucemia mieloide aguda (5-10%). Casi todas estas mutaciones involucran la sustitución de un aspartato por una tirosina en el codón 835 (D835Y) por una mutación puntual (GAT \rightarrow TAT). El aspartato en la posición 835 pertenece al dominio DFG (aspartato-fenilalanina-glicina) del loop de activación, que juega un papel crítico en la prevención de la unión del ATP, pudiendo adoptar una forma cerrada (inactivo) o abierta (activo). Estas mutaciones producen un cambio

conformacional en la proteína, perturbando el equilibrio energético requerido para estabilizar la forma cerrada y eliminando su función autoinhibitoria que provoca su activación constitutiva. También se han identificado otras sustituciones, eliminaciones e inserciones dentro de este codón y otros aledaños. A diferencia de la mutación ITD, FLT3-TKD no se asocia con altas cuentas blásticas, lo que implica un pronóstico no tan adverso. En modelos animales se ha demostrado que mientras FLT3-ITD provoca inicialmente la evolución de un trastorno mieloproliferativo, FLT3-TKD induce el desarrollo de una alteración linfóide. Un solo paciente puede ocasionalmente tener ambas mutaciones, ITD y TKD en FLT3; sin embargo, la mayoría de los pacientes tiene un solo tipo de mutación.^{2,15,16}

FLT3-TKD se identifica fácilmente debido a que resulta en la pérdida de un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV, pudiendo así digerir un producto de PCR por amplificación de esta región mediante un análisis tipo RFLP o, bien, confirmando el cambio puntual mediante secuenciación de ADN.¹¹

NPM1

Estructura y función

NPM1 (*nucleophosmin*) es una proteína que originalmente se identificó como fosfoproteína expresada a concentraciones altas en la región granular del nucléolo. Posteriormente, basados en la observación de que su expresión rápidamente aumentaba en respuesta a estímulos mitóticos y su elevada concentración en células proliferantes y malignas, se pensó que tenía un papel importante en la regulación del crecimiento, proliferación y transformación celular. Sin embargo, a medida que el conocimiento de esta multifuncional proteína ha aumentado, se ha relacionado en muchos procesos celulares.^{29,30}

NPM1 existe como oligómero en dos formas alternativas, designadas como B23.1 y B23.2, que comparten 255 residuos en el extremo N terminal, mientras que los últimos 35 aminoácidos del extremo C terminal de B23.1 están ausentes en B23.2. La isoforma B23.1 es casi exclusivamente nucleolar, mientras que B23.2 se localiza en el nucléolo y en el nucleoplasma. La isoforma B23.1 contiene 294 aminoácidos y tiene un peso aproximado de 37 kDa, tiene diversos dominios, iniciando con el extremo N terminal que contiene un segmento hidrofóbico implicado en la oligomerización y en la función como chaperona; le continúan dos dominios ácidos (ricos en ácido aspártico y glutámico) importantes en la unión a las histonas, que se encuentran separados por una región asociada con la actividad ribonucleasa. Esta región, al igual que el extremo C terminal, contiene regiones alcalinas involucradas con la unión a ácidos nucleicos. Las porciones alcalinas son seguidas por una región aromática, que contiene dos residuos triptófano (W288 y W290) requeridos para la localización nucleolar de la proteína. Además, incluye una señal bipartita de localización nuclear (NLS), una señal de exportación nuclear (NES) rica en leucina y diversos sitios de fosforilación que regulan su asociación con los centrosomas y compartimentos subnucleolares. El gen *NPM1* contiene 12 exones y se encuentra localizado en el cromosoma 5q35. La isoforma B23.1 es codificada por los exones 1 al 9, 11 y 12, mientras que la isoforma B23.2 solamente contiene los exones 1 al 10 (Figura 4).^{29,31}

La sobreexpresión de NPM1 promueve la supervivencia y recuperación celular frente a condiciones de estrés, mientras que la deficiencia bloquea la traducción proteica y detiene el ciclo celular. La expresión de NPM1 disminuye con la diferenciación celular.³⁰

NPM1 reside principalmente en el nucléolo, aunque se transporta rápidamente entre el nú-

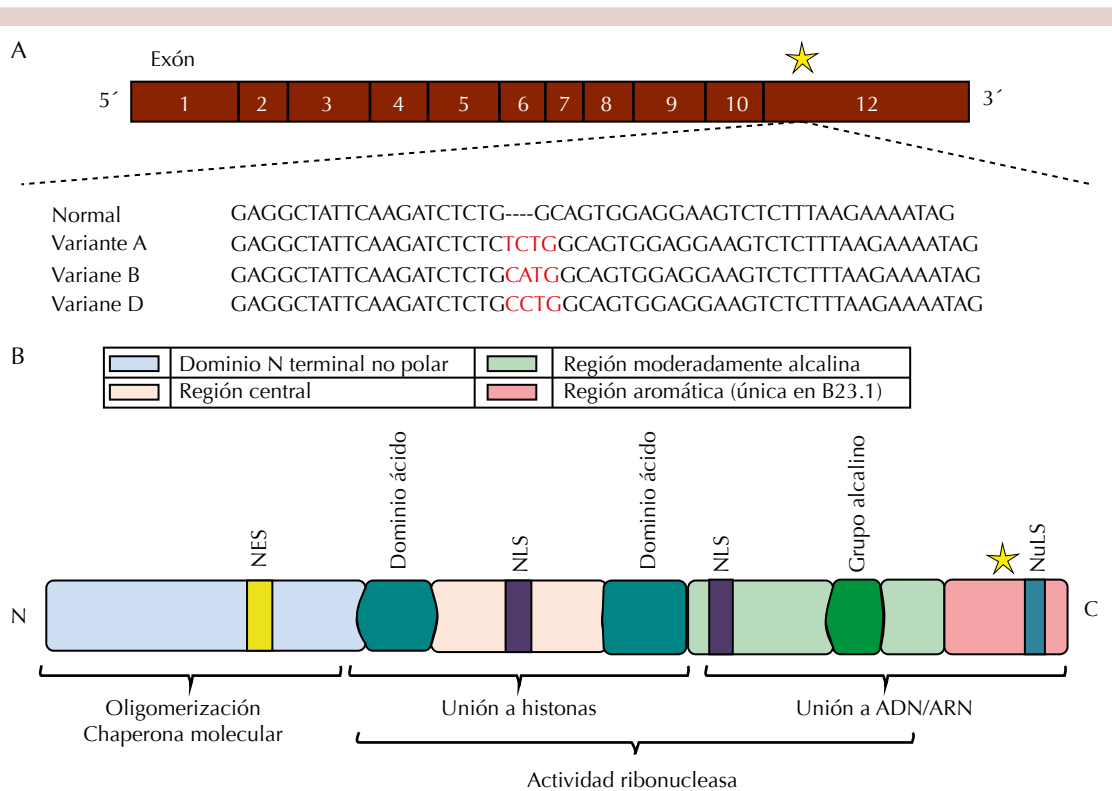


Figura 4. Mutaciones en el gen NPM1. **A.** El gen *NPM1* posee 12 exones, los exones 1 al 3 codifican el extremo N terminal donde se localiza la señal de exportación nuclear; el exón 4 contiene un dominio de unión a metales (MB). El segmento entre los exones 5 y 7 codifica los dos dominios ácidos y la región de separación, la otra parte del exón 7 y el exón 8 presentan la señal de localización nucleolar. Los exones 9 a 12 codifican el extremo C terminal, que contiene la señal de localización nucleolar. Las principales mutaciones asociadas con leucemia mieloide aguda ocurren dentro del exón 12, principalmente las variantes A, B y D. **B.** La proteína NPM1 es una histona chaperona nucleolar, las mutaciones descritas modifican la señal de localización nucleolar permitiendo que permanezca mayor tiempo dentro del citoplasma. El sitio de mutación se detalla con una estrella. NES: señal de exportación nuclear; NLS: señal de localización nuclear; NuLS: señal de localización nucleolar. Modificada de la referencia 29.

cleo y el citoplasma, por lo que forma parte de diversos procesos celulares que incluyen el transporte de partículas pre-ribosomales y biogénesis de los ribosomas, respuesta contra estímulos estresantes como radiación UV e hipoxia, mantenimiento de la estabilidad genómica a través del control de la ploidía celular y la participación en procesos de reparación del ADN, la regulación de la transcripción a través del moldeamiento de los eventos de condensación y descondensación

de la cromatina, previene la agregación proteica en el nucléolo y participa en la regulación de la actividad y estabilidad de supresores tumorales decisivos como p53 y ARF. En realidad, NPM1 funciona como histona chaperona, capaz de realizar el ensamblaje de histonas y del nucleosoma, así como promover un incremento de la acetilación dependiente de la transcripción. Los dominios ácidos de NPM1 sirven como sitios de unión de proteínas ribosomales alcalinas,

minimizando interacciones no específicas entre proteínas ribosomales y rRNA durante el ensamblaje ribosomal en el nucléolo.^{29,32} A través de sus dominios, NPM1 es capaz de unirse a distintas proteínas en diferentes compartimentos celulares, incluidos factores nucleolares (nucleolina, fibrilarina y snoRNPs), factores de transcripción (IRF1, YY1 y NF- κ B, histonas H2B, H3 y H4), proteínas involucradas en la proliferación celular (ADN polimerasa α), mitosis (NUMA, NEK2A) y respuesta al estrés oncogénico (ARF y p53), directamente con el ADN y ARN. Además, se ha reportado que NPM1 tiene actividad de endorribonucleasa en el rRNA y forma complejos con segundos mensajeros como PIP3 en respuesta a factores antiapoptóticos (inhibiendo la ruptura del ADN por la caspasa CAD y p53).^{29,31} Asimismo, NPM1 está frecuentemente sobreexpresada en tumores sólidos de diversos orígenes histológicos, está implicada en traslocaciones cromosómicas o eliminaciones en varios tipos de malignidades hematológicas y tumores sólidos. De manera sorprendente, se ha encontrado que una alta proporción de pacientes con leucemia mieloide aguda (~35%) tienen mutaciones o una localización aberrante de NPM1, lo que hace al gen *NPM1* uno de los mutados con más frecuencia en esta enfermedad.²⁹

Mutaciones en *NPM1*

La mutación más común en *NPM1* se localiza en el exón 12, que se manifiesta en 35% de los casos de leucemia mieloide aguda de *novo*. Las mutaciones en el gen *NPM1* son consistentemente heterocigotas, ocurren principalmente en el exón 12, con algunas pocas excepciones reportadas en los exones 11 y 9. El 86% de los pacientes con mutaciones en *NPM1* tienen un cariotipo normal, el otro 14% tiene anomalías cromosómicas probablemente secundarias. Se han descrito aproximadamente 50 variantes genéticas; sin embargo, en 95% de los casos ocurren en la posición del nucleótido 960; la mutación más común es la duplicación de los

nucleótidos TCTG en las posiciones 956 a 959 que es conocida como variante A. Las variantes B y D se observan en 10 y 5% de los casos, respectivamente, todas las demás variantes son especialmente raras. Independientemente de la variante de la mutación, todas generan modificaciones en el extremo C terminal de la proteína.^{31,33,34}

En condiciones normales, la importación nuclear de NPM1 predomina sobre la exportación, lo que explica su mayor concentración en el nucléolo. Una de las características distintivas de las mutaciones en NPM1 es su sobreexpresión en el citoplasma de células leucémicas con leucemia mieloide aguda (NPM1c⁺); esto se debe a dos alteraciones en el extremo C terminal: la primera es la generación de un dominio de exportación nuclear adicional rico en leucina, que aumenta el transporte dependiente de CRM1 y, segundo, la pérdida de los residuos aromáticos 288 y 290 que son decisivos para la localización nucleolar.^{31,33,34}

Las mutaciones en *NPM1* son muy estables, generalmente la pérdida de la mutación se asocia con el cambio de cariotipo, de normal a anormal; por esta razón algunos autores (Gorello y su grupo y Chou y colaboradores) sugieren el uso de NPM1 como marcador para vigilar la enfermedad mínima residual en pacientes con cariotipo normal. La existencia de NPM1 se correlaciona significativamente con la de FLT3-ITD, lo que sugiere que las mutaciones en NPM1 son eventos primarios que preceden a la adquisición de FLT3. En contraste, las mutaciones en tándem dentro del gen *MLL* son usualmente excluyentes con NPM1.^{30,33-36}

La incidencia en las mutaciones en *NPM1* se incrementa con la edad, se manifiesta en 2.1 a 6.5% en pacientes pediátricos y en 25 a 35% en pacientes adultos; sin embargo, las variantes menos comunes ocurren principalmente en niños y adultos jóvenes. Notablemente, 80 a 90%

de los pacientes con leucemia mielomonocítica aguda y leucemia monocítica tienen mutaciones en *NPM1*. Los casos con *NPM1*^{c+} tienen mayor cuenta blástica y elevado número de plaquetas; sin embargo, la mutación en *NPM1*, en ausencia de *FLT3* ITD, se asocia con buena respuesta al tratamiento y supervivencia a cinco años en 60% de los pacientes, lo que resalta el valor de la identificación molecular para establecer una estratificación de riesgo en pacientes con cariotipo normal. La coexistencia de *FLT3*-ITD y *NPM1* se asocia con mal pronóstico clínico; sin embargo, estos pacientes tienen mejor respuesta que los pacientes *NPM1* negativos y *FLT3*-ITD positivos.^{27,30}

Las mutaciones en *NPM1* son fácilmente identificadas por secuenciación y PCR alelo específico o, bien, con la observación de *NPM1*^{c+} mediante inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica es la primera opción para la detección de *NPM1*^{c+}, mientras que las pruebas de biología molecular permiten la detección y vigilancia de la enfermedad mínima residual.³⁰

C/EBP α

Estructura y función

El gen *C/EBP α* (*CCAAT/enhancer-binding protein α*) codifica para dos proteínas que pertenecen a la familia de proteínas potenciadoras de la unión a la secuencia *CCAAT*, que están implicadas en el equilibrio entre proliferación celular y diferenciación terminal. Este gen se sitúa en el cromosoma 19q13.1 y posee un único exón sin tener intrones. *C/EBP α* da lugar a dos diferentes transcritos, usando dos diferentes secuencias de inicio AUG dentro del mismo marco de lectura; la primera secuencia de inicio codifica una isoforma de 42 kDa (p42), mientras que la segunda secuencia de inicio codifica otra isoforma de 30 kDa (p30), que pierde los primeros 118 aminoácidos, incluido el dominio funcional TAD1. Las células regulan la relación de p42/p30 a través

de la señalización celular desencadenada por rapamicina y la proteína cinasa R de la siguiente manera: bajo condiciones de crecimiento favorables, los factores de iniciación de la transcripción eIF2 α y eIF4E incrementan su actividad, posiblemente a través del incremento de la actividad de c-MYC; a su vez, éstas actúan promoviendo la transcripción de p30 que desencadena el proceso de proliferación celular. De la misma manera, cuando existen bajas concentraciones de eIF2 α y eIF4E, se promueve la transcripción de p42, que induce diferenciación celular. Las funciones de la isoforma p30 aún no son bien conocidas; sin embargo, Pabst y su grupo demostraron que esta isoforma ha perdido las funciones normales de C/EBP α y tiene un efecto negativo en la variante de 42 kDa. C/EBP α tiene cuatro dominios principales, el extremo C terminal contiene una estructura de cremallera de leucina (bZIP) que media la homo y heterodimerización, así como las interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción (GATA, PU.1, ETS y RUNX1) y factores de crecimiento (c-JUN y E2F), un dominio de unión al ADN (DBD) de carácter alcalino cargado positivamente, capaz de unirse a secuencias específicas del ADN y, por último, dos elementos de regulación y transactivación, denominados TAD1 y TAD (Figura 5).^{37,38}

C/EBP α actúa como factor de transcripción, con un papel determinante durante la diferenciación de varios tipos celulares, que incluyen hepatocitos, adipocitos, enterocitos, queratinocitos, células pulmonares, células de glándula mamaria y células hematopoyéticas. Asimismo, juega un papel fundamental en estados tempranos de la diferenciación mieloide y es particularmente expresado en células mielomonocíticas y específicamente es altamente regulada durante la diferenciación granulocítica.^{37,39} La isoforma p42 activa directamente promotores de linaje específico y tiene contacto con el aparato de transcripción basal (TBP/TFIIB), actúa sobre acetiltransferasas de histonas (CBP/p300) y recluta el complejo de remodelamiento de la cromatina.

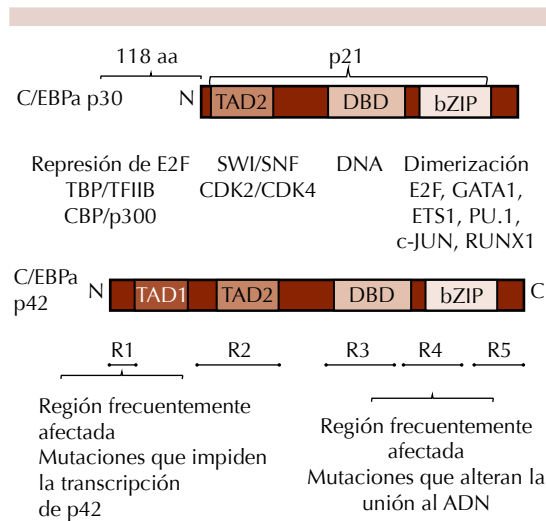


Figura 5. Mutaciones en C/EBP α . C/EBP α posee dos isoformas diferentes p30 y p42 que difieren en los primeros 118 aminoácidos. p42 tiene cuatro dominios principales, una estructura de cremallera de leucina (bZIP), un dominio de unión al ADN (DBD) y, por último, dos elementos de regulación y transactivación denominados TAD1 y TAD2; este último no aparece en p30. Las mutaciones dentro de C/EBP α se dividen en cinco regiones (R1 a R5), R1 y R4 son las más frecuentes.

Modificada de la referencia 37.

tina (SWI/SNF). Por otra parte, p30 promueve diferenciación de adipocitos, pero previene la diferenciación terminal y produce arresto del ciclo celular.⁴⁰ C/EBP α posee múltiples acciones como la regulación negativa de la expresión de c-MYC que permite la diferenciación, regulación directa de la expresión de genes específicos de linaje mieloide y acción sinérgica con otros genes clave en el desarrollo mieloide, incluido el complejo de genes CBF y PU.1. Las principales asociaciones de C/EBP α ocurren con p21, CDK2, CDK4 y E2F. La represión de E2F, dependiente de la transcripción de genes por C/EBP α , es un evento crítico en la supresión de la proliferación celular y también induciendo la diferenciación granulocítica. C/EBP α también inhibe la proliferación celular por activar la transcripción de

p21/WAF1, estabilizar a p21 e inactivar a CDK2 y CDK4. La fuerte implicación de C/EBP α en la diferenciación granulocítica apunta a que es un blanco clave en la leucemogénesis; recientemente se reportaron tres mecanismos de inactivación: el primero es la regulación negativa de su transcripción debido a la expresión del gen de fusión RUNX1/RUNX1T1 en la t(8;21), el segundo mecanismo es la inhibición de la traducción del mRNA por interacción con hnRNPE2 inducido por la proteína de fusión BCR-ABL1, lo que contribuye a la transición de la fase crónica a la crisis blástica por bloqueo de la diferenciación, y finalmente, el tercer mecanismo es por mutaciones inactivantes, especialmente en leucemia mieloide aguda.³⁷

Mutaciones en C/EBP α

El gen C/EBP α está mutado en aproximadamente 6 a 15% de los casos de leucemia mieloide aguda de *novo* y en 15 a 18% de los pacientes con cariotipo normal, sin asociación con la edad. Esta mutación ocurre principalmente en los subtipos M1 y M2 (según la FAB) donde se observa en 20% de los pacientes; sin embargo, los pacientes con t(8;21), inv(16) y t(15;17) no tienen la mutación. Los pacientes con mutaciones en C/EBP α tienen concentraciones altas de hemoglobina, bajas cuentas plaquetarias, altas cuentas blásticas y difícilmente tienen linfadenopatías o leucemia extramedular comparados con pacientes sin mutaciones en C/EBP α . Las mutaciones descritas corresponden a mutaciones puntuales que pueden impedir la transcripción de p42, permitiendo la sobreexpresión de p30 o, bien, afectar la región de cremallera de leucina y el DBD, provocando que la estructura de este dominio se modifique e impidiendo así la unión adecuada al surco mayor del ADN. La mayoría de los pacientes tiene más de una mutación en C/EBP α , el escenario más frecuente es la combinación de dos mutaciones en alelos diferentes, una mutación en el dominio N terminal que bloquea la transcripción de

p42 y otra en el bZIP que altera la unión con el ADN, su dimerización o su interacción con otras proteínas. Hasta ahora se han reportado 146 mutaciones distintas en C/EBP α , de las que cinco son mutaciones *missense*, 54 corresponden a adiciones o eliminaciones que modifican el marco de lectura y 78 son mutaciones *nonsense*; además se incluyen nueve mutaciones silenciosas sin efecto transcripcional. Todas estas mutaciones ocurren en cinco regiones de la proteína (R1 a R5), donde R1 corresponde a los aminoácidos situados antes del TAD1, R2 se sitúa en la región entre TAD1 y TAD2, R3 concierne la región anterior al DBD y la parte N terminal de este dominio, R4 corresponde a los aminoácidos en la zona C terminal del DBD y el N terminal de la región con estructura de cremallera de leucina y finalmente R5 lo conforman los aminoácidos del extremo C terminal de la estructura de cremallera. Las mutaciones en C/EBP α ocurren principalmente en R1 y R4 con 76% de las mutaciones no silenciosas; sin embargo, la distribución entre estas dos regiones es heterogénea. De manera interesante, casi todas las mutaciones *nonsense* (65 de 78) ocurren en la región 5' del segundo codón de inicio, lo que permite que se aumente la transcripción de la isoforma 30 kDa.^{6,37,40-42}

Las mutaciones en C/EBP α presentes en pacientes que muestran un cariotipo normal se asocian con un pronóstico favorable similar al que ocurre con inv(16)(p13q22) o t(8;21)(q22;q22). La razón del porqué C/EBP α confiere buen pronóstico aún no se conoce; sin embargo, recientemente se sugirió que sólo los pacientes con la mutación doble tienen buen pronóstico, mientras que los pacientes con una mutación única no difieren de los que no exhiben ninguna mutación. La coexistencia de mutaciones en C/EBP α y FLT3-ITD ocurre en 22 a 33% de los casos; sin embargo, aún no es claro si no existe un efecto o si éste es negativo en el pronóstico de estos pacientes.^{39,41}

La identificación de las mutaciones dentro del gen C/EBP α se realiza generalmente mediante secuenciación directa del ADN obtenido de células sanguíneas debido a la aleatoriedad con que ocurren las mutaciones.

CONCLUSIONES

La leucemia mieloide aguda es la más común de las leucemias mieloides con prevalencia de 3.8 casos por 100,000 habitantes, con aumento en la población de 65 años o más hasta 17.9 casos por 100,000 habitantes. Cerca de 55% de los pacientes con leucemia mieloide aguda tiene algún tipo de anormalidad citogenética que permite orientar el tratamiento y pronosticar su evolución en favorable, intermedia o desfavorable. Sin embargo, en el otro 45% de los pacientes, que tienen un cariotipo normal, el pronóstico aún parece incierto.¹ Recientemente, el descubrimiento de mutaciones genéticas en varios genes, como FLT3, NPM1, C/EBP α , KIT, MLL, RAS, PTPN11 y CBL en pacientes con cariotipo normal, ha abierto una ventana de posibilidades para definir con mayor precisión la naturaleza de esta enfermedad. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud resaltó la búsqueda intencionada de mutaciones en FLT3, NPM1 y C/EBP α en todos los pacientes con leucemia mieloide aguda, pero principalmente en los que tienen un cariotipo normal, para de esta manera determinar el pronóstico y personalizar más adecuadamente el tratamiento.

En el Cuadro 1 se simplifica la descripción de las mutaciones más frecuentes en los genes FLT3, NPM1 y C/EBP α en pacientes con leucemia mieloide aguda. El gen FLT3 tiene dos mutaciones frecuentes asociadas con leucemia mieloide aguda, denominadas FLT3-ITD y FLT3-TKD, que afectan la región yuxtamembrana y el dominio tirosina cinasa de la proteína, respectivamente. La mutación FLT3-ITD es una duplicación en tándem interna que ocurre entre los exones 14 y

Cuadro 1. Mutaciones frecuentes que afectan a FLT3, NPM1 y C/EBP α en pacientes con leucemia mieloide aguda

| Gen | Mutaciones frecuentes | Descripción | Pronóstico clínico |
|----------------|-----------------------|---|--------------------|
| FLT3 | FLT3-ITD | Involucra una duplicación en tándem interna (ITD) entre los exones 14 y 15 en el dominio yuxtamembrana. La longitud del ITD varía de 3 a 400 pb (múltiplo de tres nucleótidos). El promedio de los amplificados es de 59 pb | Desfavorable |
| | FLT3-TKD | Mutaciones puntuales <i>missense</i> en el exón 20 del loop de activación en el dominio tirosina cinasa (TKD). Casi todas estas mutaciones involucran la sustitución de un aspartato por una tirosina en el codón 835 (D835Y), debido al cambio GAT→TAT | Intermedio |
| NPM1 | Variante A | Duplicación de los nucleótidos TCTG en las posiciones 956 a 959 del exón 12 | Favorable |
| | Variante B | Adición de los nucleótidos CATG entre las posiciones 956 y 957 del exón 12 | Favorable |
| | Variante D | Adición de los nucleótidos CCTG entre las posiciones 956 y 957 del exón 12 | Favorable |
| C/EBP α | R1 | Región situada antes del TAD1, pudiendo presentar adiciones, eliminaciones y mutaciones <i>missense</i> y <i>nonsense</i> . Principalmente en esta región ocurren mutaciones <i>nonsense</i> que impiden la transcripción de la variante p42 | Favorable |
| | R4 | Región C terminal del DBD y el N terminal del bZIP. Al igual que R1, puede presentar adiciones, eliminaciones y mutaciones <i>missense</i> y <i>nonsense</i> , que provocan una alteración en la unión al ADN y otras proteínas. | Favorable |

Tomado de la referencia 7.

15. Se asocia con mal pronóstico clínico debido a que induce cuentas blásticas altas, incremento del riesgo de recaída y disminución de la supervivencia. FLT3-TKD generalmente es una mutación “*missense*” que modifica el codón 835, cambiando un residuo aspartato por una tirosina (D835Y). Su pronóstico se considera intermedio porque, a diferencia de FLT3-ITD, los pacientes no tienen manifestaciones clínicas adversas; sin embargo, no tienen una respuesta óptima al tratamiento. El gen *NPM1* tiene varias mutaciones asociadas con leucemia mieloide aguda dentro del exón 12, existen diferentes variantes; sin embargo, las principales conllevan la duplicación en el caso de la variante A y la adición de cuatro bases en el caso de las variantes B y D entre los nucleótidos 956 y 957. Sólo la existencia de mutaciones en *NPM1* se asocia con un pronóstico favorable en ausencia de FLT3-ITD. El gen *C/EBP α* codifica dos factores de transcripción con diferente secuencia de inicio, p42 y p30. Las mutaciones en este gen pueden ocurrir en cinco regiones diferentes; sin embargo, las regiones R1 y R4 son las afectadas con más frecuencia. Las mutaciones en la región R1 afectan la transcripción de p42, provocando la sobreexpresión de p30. Asimismo,

las mutaciones en la región R4 modifican el bZIP y el dominio de unión al ADN alterando su interacción con este último y con otras proteínas asociadas. Comúnmente, los pacientes tienen ambas mutaciones en alelos diferentes y se asocian con un pronóstico favorable.

REFERENCIAS

1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006;368:1894-1907. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673606697808>. Accessed August 29, 2014.
2. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2011;4:36. doi:10.1186/1756-8722-4-36.
3. Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia* 2002;16:740-744. doi:10.1038/sj.leu.2402500.
4. Becker H, Pfeifer D, Afonso JD, Nimer SD, et al. Two cell lines of t(8;21) acute myeloid leukemia with activating KIT exon 17 mutation: models for the “second hit” hypothesis. *Leukemia* 2008;22:1792-1794. doi:10.1038/leu.2008.61.
5. Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2002;16:559-562. doi:10.1038/sj.leu.2402446.
6. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics:

- biological and clinical implications. *Blood Rev* 2013;27:13-22. doi:10.1016/j.blre.2012.11.001.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008.
 8. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010;24:35-63. doi:10.1016/j.hoc.2009.11.008.
 9. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:650-665. doi:10.1038/nrc1169.
 10. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:178-184. doi:10.1182/asheducation-2006.1.178.
 11. Levis M, Small D. FLT3: ITD does matter in leukemia. *Leukemia* 2003;17:1738-1752. doi:10.1038/sj.leu.2403099.
 12. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998;91:1101-1134. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/91/4/1101.short>. Accessed October 22, 2014.
 13. Rosnet O, Matteï M-G, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics* 1991;9:380-385. doi:10.1016/0888-7543(91)90270-O.
 14. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100:1532-1542. doi:10.1182/blood-2002-02-0492.
 15. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009;15:4263-4269. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.
 16. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004;13:169-178. doi:10.1016/S1097-2765(03)00505-7.
 17. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, 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;114:2386-2392. doi:10.1182/blood-2009-03-209999.
 18. Chan PM. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. *Protein Cell* 2011;2:108-115. doi:10.1007/s13238-011-1020-7.
 19. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-1818. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8946930>. Accessed October 31, 2014.
 20. Parcells BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 2006;24:1174-1184. doi:10.1634/stemcells.2005-0519.
 21. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, 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.
 22. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Boggon TJ, et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008;111:4930-4933. doi:10.1182/blood-2008-01-117770.
 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.
 24. Li L, Bailey E, Greenblatt S, Huso D, Small D. Loss of the wild-type allele contributes to myeloid expansion and disease aggressiveness in FLT3/ITD knockin mice. *Blood* 2011;118:4935-4945. doi:10.1182/blood-2011-01-328096.
 25. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107:3724-3726.
 26. Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, et al. The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006;20:2074-2076. doi:10.1038/sj.leu.2404368.
 27. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, 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;111:2776-2784. doi:10.1182/blood-2007-08-109090.
 28. Libura M, Asnafi V, Tu A, Delabesse E, et al. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* 2003;102:2198-2204. doi:10.1182/blood-2003-01-0162.
 29. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:493-505. doi:10.1038/nrc1885.
 30. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007;92:519-532. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488663>. Accessed November 19, 2014.
 31. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007;109:874-885. doi:10.1182/blood-2006-07-012252.
 32. Burgess RJ, Zhang Z. Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:14-22. doi:10.1038/nsmb.2461.

33. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, 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;106:3747-3754. doi:10.1182/blood-2005-05-2168.
34. Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 2009;23:1731-1743. doi:10.1038/leu.2009.124.
35. Chou WC, Tang JL, Wu SJ, Tsay W, et al. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. *Leukemia* 2007;21:998-1004. doi:10.1038/sj.leu.2404637.
36. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006;20:1103-1108. doi:10.1038/sj.leu.2404149.
37. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, et al. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19:329-334. doi:10.1038/sj.leu.2403614.
38. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001;27:263-270. doi:10.1038/85820.
39. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:1416-1424. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1552.
40. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer* 2004;4:394-400. doi:10.1038/nrc1363.
41. Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009;15:5303-5307. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2941.
42. Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, et al. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol* 2009;2:23. doi:10.1186/1756-8722-2-23.
43. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:179-198. doi:10.1146/annurev.genom.3.032802.115046.
44. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, et al. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *Br J Haematol* 2001;113:1076-1077. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02821.x.