

Universität Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. Döhner

**Identifizierung genetischer Veränderungen
im Exon 20 des *FLT3*-Gens
bei der akuten myeloischen Leukämie des Erwachsenen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Viola Kurz, geb. Mayer
aus Heilbronn

2011

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Konstanze Döhner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Kratzer
Tag der Promotion:	12. Juli 2012

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
1. Bedeutung genetischer Veränderungen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML)	1
2. Aufbau und Funktion des <i>FLT3</i> -Rezeptors.....	2
3. Die prognostische Bedeutung genetischer Veränderungen bei der akuten myeloischen Leukämie mit normalem Karyotyp.....	5
1. <i>FLT3</i> -ITD.....	5
2. <i>FLT3</i> -TKD (Punktmutation im Exon 20).....	8
3. Weitere Punktmutationen im <i>FLT3</i> -Gen.....	11
4. Zielgerichtete Therapie durch <i>FLT3</i> -Inhibitoren.....	12
5. Weitere prognostisch relevante Genmutationen bei der AML.....	13
1. <i>NPM1</i> -Mutation.....	13
2. <i>C/EBPA</i> -Mutation.....	15
3. <i>MLL</i> -PTD.....	16
6. Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden.....	18
1. Material.....	18
1. Patientenproben.....	18
2. Kontrollproben.....	19
3. AML-Zelllinien.....	19
2. Methoden.....	19
1. DNA-Extraktion.....	19
2. <i>FLT3</i> Exon 20 Mutationsanalyse.....	20
3. Nachweis der Punktmutation D835 mittels Restriktionsverfahren.....	26
3. Reagenzien und Chemikalien.....	27
3. Ergebnisse.....	29
1. Mutationsanalyse von Exon 20 des <i>FLT3</i> -Rezeptor-Gens bei gesunden Probanden.....	29

2. Mutationsanalyse von Exon 20 des <i>FLT3</i> -Rezeptor-Gens in myeloischen Zelllinien.....	29
3. Mutationsanalyse von Exon 20 des <i>FLT3</i> -Rezeptor-Gens bei erwachsenen AML-Patienten mit normalem Karyotyp.....	29
1. D835-Mutation.....	29
1. Vergleich der Ergebnisse der direkten Sequenzanalyse für Exon 20 mit den Ergebnissen der D835-Mutation mittels Restriktionsenzymverdau.....	33
2. Weitere Mutationen im Exon 20 von <i>FLT3</i>	36
1. D839-Mutation.....	36
2. Y842-Mutation.....	37
3. Deletion 836I.....	38
4. R834-Mutation.....	39
5. Deletion 837M.....	40
4. Diskussion.....	44
1. Diskrepanz bezüglich Detektierbarkeit der D835-Mutation im Restriktionsanalyseverfahren und in der direkten Sequenzierung....	46
2. Gegenüberstellung der D835-Mutationsanalyseverfahren mittels Restriktionsverfahren und direkter Sequenzierung bezüglich Sensitivität und Spezifität.....	47
3. Punktmutationen im Exon 20 des <i>FLT3</i> -Gens: Häufigkeiten, strukturelle und funktionelle Aspekte.....	48
4. Modifizierte Verfahren zur Mutationsanalyse der D835-Mutation im Exon 20 des <i>FLT3</i> -Gens.....	52
5. Prognostische Bedeutung der aktivierenden Mutationen des <i>FLT3</i> -Rezeptors (ITD/TKD).....	55
5. Zusammenfassung.....	61
6. Literaturverzeichnis.....	63
7. Danksagungen.....	74
8. Lebenslauf.....	75

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin-Monophosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
ARF	<i>alternate reading frame protein</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B-ALL	akute lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
bp	<i>basepair</i> , Basenpaar
C	Cytidin-Monophosphat
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer-binding protein α</i>
CIR	<i>cumulative incidence of relapse</i> , kumulative Rückfallinzidenz
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CR	<i>complete remission</i> , komplette Remission
CRD	<i>complete remission duration</i> , komplette Remissionsdauer
CSGE	<i>conformation-sensitive gel electrophoresis</i>
CSR	<i>Cycle-Sequencing-Reaction</i>
ddNTP	2',3' Didesoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DFS	<i>disease-free survival</i> , krankheitsfreies Überleben
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>-acid</i>)
dNTP	2' Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N'-Tetraessigsäure
EFS	<i>event-free survival</i> , ereignisfreies Überleben
ERK	Extrazelluläre Regulatorkinase
FAB	French-American-British-Klassifikation für AML
FL	<i>FLT3</i> -Ligand
FLK2	<i>fetal liver kinase 2</i>
FLT3	<i>FSM-like tyrosin kinase 3</i>
G	Guanosin-Monophosphat
g	Gramm
IL	Interleukin

ITD	Interne Tandemduplikation
JM	juxtamembranäre Domäne
JM-B	Bingungsregion (<i>binding</i>) der juxtamembranären Domäne
JM-S	Umschaltregion (<i>switch</i>) der juxtamembranären Domäne
JM-Z	Verknüpfungsregion (<i>zipper</i>) der juxtamembranären Domäne
KDa	KiloDalton
kbp	<i>kilobasepair</i> , Kilobasenpaar
KI	Kinase-Insert
KM	Knochenmark
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
M-CST	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MLL	myeloische lymphatische Leukämie
m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure (<i>-acid</i>)
mA	Miliampère
ml	Mililiter
mM	Milimol
nm	Nanometer
NPM1	Nukleophosmin 1
OD	<i>optical density</i>
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben
PTD	Partiale Tandemduplikation
PB	peripheres Blut
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDGFR	<i>platelet derived growth factor</i>
pmol	Pikomol
Ras	<i>Rat sarcoma</i> , ein Proto-Onkogen
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i>
RFS	<i>relapse-free survival</i> , rückfallfreies Überleben
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s-AML	sekundäre akute myeloische Leukämie
SCF	<i>stem cell factor</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>

STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
T	Tymidin-Monophosphat
t-AML	therapieassoziierte akute myeloische Leukämie
TK	Tyrosinkinase
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TM	transmembranäre Domäne
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLA	<i>very late antigen</i>
WT	Wild-Typ
ZNS	zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1. EINLEITUNG

1.1 Bedeutung genetischer Veränderungen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie ist eine sowohl klinisch als auch genetisch äußerst heterogene Erkrankung. Die genetische Vielfältigkeit resultiert hauptsächlich auf zytogenetischen Veränderungen. Es hat sich gezeigt, dass diese zytogenetischen Veränderungen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. In den 90er Jahren konnte in zahlreichen prospektiven Studien gezeigt werden, dass der Karyotyp ein wichtiger Prognosefaktor bei der AML darstellt. Basierend auf diesen Erkenntnissen werden die Patienten in sog. zytogenetische Risikogruppen eingeteilt und entsprechend ihrem zytogenetischen Risikoprofil behandelt (Grimwade et al. 1998, Schlenk et al. 2003).

So z.B. in einer Studie von Bloomfield et al. aus dem Jahre 1998 die Patienten in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt. Sie unterscheiden sich signifikant im Hinblick auf die Remissionsdauer (CRD, *complete remission duration*) sowie in der Rate der kompletten Remission (CR, *complete remission*). Patienten mit Translokation t(8;21), t(16;16) oder Inversion inv(16) gehören zu der prognostisch günstigen Gruppe mit niedrigem Risiko. Patienten mit normalem Karyotyp werden zu der Standardrisikogruppe mit intermediärem Risiko gezählt. Zu der prognostisch ungünstigen Gruppe zählen die Patienten mit anderen chromosomalen Veränderungen, insbesondere die mit komplexem Karyotyp.

Bei ca. 40-50 % der AML-Patienten lassen sich mittels konventioneller Chromosomenanalyse keine zytogenetischen Veränderungen nachweisen, hier liegt somit ein normaler Karyotyp vor (Bloomfield et al. 1998, Falini et al. 2005). Wie bereits erwähnt, haben Patienten mit einem normalen Karyotyp eine intermediäre Prognose. Es hat sich jedoch in mehreren Studien gezeigt, dass die Gruppe mit normalem Karyotyp nicht nur auf klinischer, sondern auch auf molekulargenetischer Ebene sehr heterogen ist. So konnten in den letzten Jahren bei AML mit normalem Karyotyp eine Vielzahl von Genmutationen identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich Ursache dieser klinischen Heterogenität sind. So wurden Mutationen in Genen detektiert, die für Transkriptionsfaktoren (*AML1*,

C/EBPA) oder Tyrosinkinaserzeptoren (*FLT3*, *KIT*) codieren, aber auch Mutationen im *RAS*-Gen sowie partielle Tandemduplikationen im *MLL*-Gen. Die prognostische Bedeutung dieser Genmutationen wurde in zahlreichen Studien untersucht, was dazu geführt hat, dass ein Teil dieser Genmutationen in die genetische Risikostratifikation mit einbezogen wird. In der 4. Edition der WHO-Klassifikation (World Health Organization) von 2008 fanden unter anderem diese Genmutationen Einzug (Vardiman et al. 2009, Grimwade et al. 2010).

1.2 Aufbau und Funktion des *FLT3*-Rezeptors

1.2.1 Rezeptor

Der *FLT3*-Rezeptor, *fetal liver kinase 2*-Rezeptor genannt, gehört zur Gruppe der Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Ebenfalls zu dieser Gruppe gehören *c-kit* (Rezeptor für *stem cell factor*, SCF), *c-fms* (Rezeptor für *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) und die beiden von Thrombozyten abgeleiteten Wachstumsfaktoren *platelet derived growth factor*, PDGFR A und B (Lyman et al. 1993, Matthews et al. 1991). Diese Membran-gebundenen Rezeptoren weisen homologe Sequenzabschnitte und Strukturen auf. Sie sind durch fünf den Immunglobulinen ähnelnden extrazellulären Domänen, einer einzelnen transmembranären Domäne (TM) und einer juxtamembranären Domäne (JM) charakterisiert. Es folgen zwei intrazellulär gelegene Domänen mit Tyrosinkinaseaktivität (TK1 und TK2), die durch eine Kinase-Insert (KI) geteilt werden. Mit der C-terminalen Domäne wird die Sequenz des Rezeptors abgeschlossen (Rosnet et al. 1993). Die juxtamembranäre Domäne kann nochmals unterteilt werden. Sie beinhaltet eine Bindungsregion (JM-B, *binding*), eine Umschaltregion (JM-S, *switch*) und eine Verknüpfungsregion (JM-Z, *zipper*).

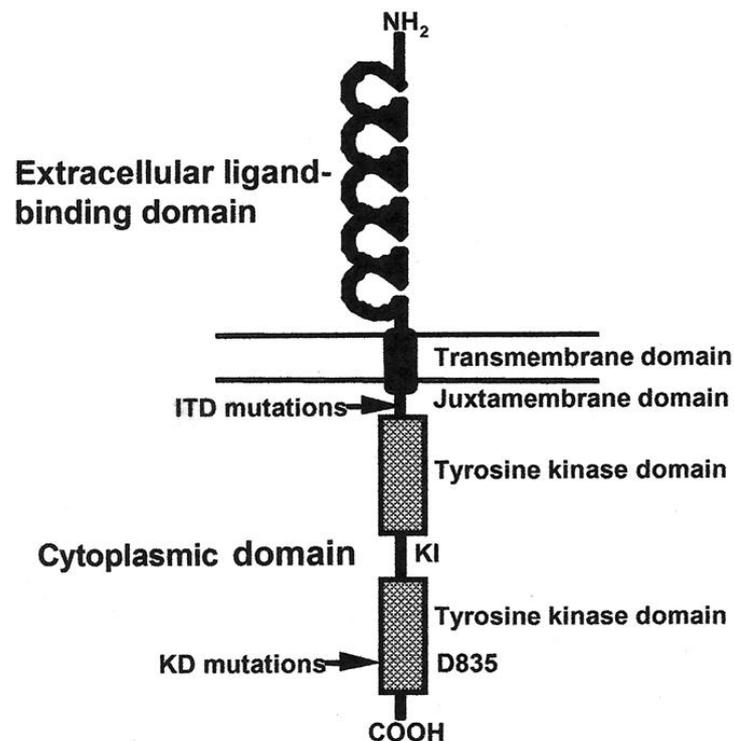


Abbildung 1: (aus Small 2006) Diese Abbildung zeigt die fünf den Immunglobulin ähnlichen Domänen.

Abkürzungen: ITD, internal tandem duplication; KI, kinase insert; KD, kinase domain.

Das humane RTKIII Gen *c-kit* weist besonders in der intrazellulären katalytischen Region Ähnlichkeiten zu *FLT3* bezüglich Anzahl der Exons, Sequenzen, Exon/Intron-Grenzen und der Funktion auf. So besteht der Verdacht, dass alle Klasse-III-RTK aus einem gemeinsamen Vorläufergen durch mehrere cis- und trans- Verdopplungen entstanden sind. Diese strukturellen Ähnlichkeiten sind bei RTKI und RTKII nicht zu finden (Agnès et al. 1994). Das Gen, welches für die Kodierung des *FLT3*-Rezeptors verantwortlich ist, liegt auf Chromosom 13q12 und besteht aus 24 und nicht wie bisher angenommen aus 21 Exons (Abu-Duhier et al. 2001). Diese sind in einer Größenordnung von 83 bis 562 Basenpaaren (bp) zu finden. Auf genomischer Ebene erstreckt sich das *FLT3*-Gen insgesamt über eine Länge von zirka 100 Kilobasenpaaren (kbp, Abu-Duhier et al. 2001, Agnes et al. 1994). Es kodiert ein Protein aus 993 Aminosäuren, das aufgrund einer N-terminalen Glykosylierung in ein 140 kDa (KiloDalton) großes und ein kleineres 160 kDa Band unterteilt ist. Ein 130 kDa Band liegt vor, wenn es unglykosyliert und nicht an Membran gebunden ist (Parcells et al. 2006). *FLT3* wird in Plazenta,

Gonaden und dem zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert. Allerdings ist seine Funktion in diesen Geweben noch unbekannt (Lyman et al. 1998).

Rezeptor-Tyrosinkinasen der Klasse III werden durch Bindung eines Liganden aktiviert und übersetzen extrazelluläre Signale in intrazelluläre.

1.2.2 Ligand

Der *FLT3*-Ligand (FL) reguliert die frühe Phase der Hämatopoese durch Stimulierung des *FLT3*-Signalübertragungsweges über den *FLT3*-Rezeptor. Der FL ist ein Typ 1 transmembranäres Protein, das, ebenso wie die Stammzellfaktoren und *macrophage colony-stimulating factor* (CSF), zu einer kleinen Zytokinfamilie gehört. FL m-RNA ist in den meisten hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Geweben exprimiert. Das FL-Protein, das als Membrangebundene oder frei lösliche Form vorliegt, wird von T-Lymphozyten und Stromafibroblasten des Knochenmarkes (Parcells et al. 2006) und von vielen humanen Leukämie-Zelllinien (Meierhoff et al. 1995) produziert. Die Expression des FL in Zellen mit zusätzlicher Expression des *FLT3*-Rezeptors weist auf autokrine und parakrine Signalmechanismen der *FLT3*-Antwort hin (Zheng et al. 2004).

Durch Bindung des FL an den *FLT3*-Rezeptor wird eine Formation des Homodimers, welches in der Plasmamembran lokalisiert ist, induziert. Durch die Paarung zytoplasmatischer Domänen wird es nun möglich, spezifische Tyrosinreste, wie zum Beispiel Tyr-589 oder Tyr-591 in der JM-Domäne, zu transphosphorylieren (Griffith et al. 2004). Die daraus resultierende Konformationsänderung induziert eine Autophosphorylierung der TK-Domäne. Die nachgeschaltete Signalkaskade führt zu Phosphorylierung und Aktivierung von zahlreichen zytoplasmatischen Effektormolekülen, wie Ras, GAP, Vav, Shc, Cbl und Grb2 (Advani et al. 2005). Das Signal wird vom *FLT3*-Rezeptor auf die p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase, ein Regulatorprotein, und auf das Akzeptorprotein des *growth factor receptor-protein 2* übertragen (Parcells et al. 2006). Ras und PI3-K sind die ersten Effektoren von *FLT3*. Ras stimuliert durch Aktivierung der Raf- und MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) Kaskade die Zellproliferation; PI3-K inhibiert die Apoptose durch Aktivierung der Akt-Kinase

(Advani et al 2005). Ein weiterer Effektor von *FLT3* ist STAT5a (*signal transducer and activator of transcription 5*). STAT5 transkribiert die Gene für die Proliferation von hämatopoetischen Zellen (Advani et al. 2005). FL zeigt eine geringe Selbstaktivität und wirkt synergistisch mit anderen Stammzelloktoren (SCF, Ligand des *c-kit*) bzw. anderen Zytokinen auf die Expansion von Vorläuferzellen (Hannum et al. 1994). Des Weiteren konnte durch Solanilla et al. 2003 gezeigt werden, dass der FL eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von hämatopoetischen Vorläuferzellen an Stromazellen durch VLA (*very late antigen*)-4 und VLA-5 spielt. Die Ergebnisse von McKenna et al. 2000 zeigen den wichtigen physiologischen Einfluss des FL auf die Hämatopoese: Mäuse, die die Fähigkeit zur Bildung von FL verloren hatten, zeigten nicht nur eine verminderte Anzahl myeloischer und B-lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark, sondern auch einen Mangel an Leukozyten im Blut.

Eine Aktivierung des *FLT3*-Signaltransduktionsweges ist für die physiologische Aufrechterhaltung des Stammzellpools und die Erneuerung reifer Blutzellen verantwortlich. Durch das hohe onkogene Potential des Signalweges kann dieser an der Proliferation undifferenzierter hämatopoetischer Zellen mit verantwortlich sein.

Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und akuter lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ (B-ALL) konnte eine *FLT3*-Expression oder Überexpression auf mRNA (messenger-Ribonukleinsäure)- und Proteinebene, nachgewiesen werden (Carow et al. 1996).

1.3 Die prognostische Bedeutung genetischer Veränderungen der akuten myeloischen Leukämie mit normalem Karyotyp

1.3.1 *FLT3*-ITD

Die Interne Tandemduplikation (ITD) des *FLT3*-Gens ist eine häufig beschriebene Mutation bei AML und ist in der juxtamembranären Domäne im Exon 14 lokalisiert. Sie zählt wie die TKD (Tyrosinkinasedomäne) zu den aktivierenden Mutationen und ist bei 20-25 % (Nakao et al. 1996, Yokato et al. 1997, Kiyoi et al. 1999, Rombouts et al. 2000, Abu-Duhier et al. 2000, Meshinchi et al. 2006, Ahmad et al.

2010) der Patienten nachweisbar. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Prävalenz der ITD-Mutationen mit zunehmendem Alter steigt. So liegt die Prävalenz bei den 5-10 Jährigen bei 5-10 %, bei den jungen Erwachsenen schon bei 20 % und bei den über 55 Jährigen AML-Patienten liegt die Prävalenz bei > 35 %. Bei der ITD wird ein Sequenzfragment von Exon 14 dupliziert. Dieses Fragment kodiert die Sequenz der JM-Domäne des *FLT3*-Rezeptors. Die Lokalisation und die Länge (von drei bis Hunderten von Nukleotiden) der Internen Tandemduplikation variieren von Patient zu Patient, die Transkription erfolgt aber noch im Leserahmen (Nakao et al. 1996). Durch die ITD entsteht keine Verschiebung des offenen Leserasters, was darauf schließen lässt, dass die Gesamtzahl der duplizierten Nukleotide immer einem Vielfachen von Drei entsprechen muss. Die ITD ist vorzugsweise in der Z-Region (*zipper*) der JM-Domäne lokalisiert. Durch die zusätzliche Einfügung von Nukleotiden wird die Autoinhibition von *FLT3* „undicht“ (Schlessinger 2003). Eine *FLT3*-ITD Mutation zerstört die Interaktion zwischen der juxtamembranären Domäne und der Aktivierungsschleife. Die autoinhibitorische Domäne verliert dadurch ihre Funktion und *FLT3* gelangt von der inaktiven zur katalytisch aktiven Konformation. Das aktive Zentrum liegt dann frei und ATP und Substrat kann binden, somit resultiert daraus eine Aktivierung der Kinase (Kiyoi et al. 2002, Griffith et al. 2004). Die ITD besitzt ein starkes Transformationspotential auf hämatopoetische Stammzelllinien (Reindl et al. 2006). Eine Arbeit von Choudhary et al. 2005 beschreibt die Auswirkungen der aktivierenden Mutation auch im Vergleich zur TKD-Mutation. Die ITD-Mutation bewirkt eine Vielzahl von Aktivierungsänderungen. Sie induziert zum Beispiel einen abnormalen Signalweg, der die Aktivierung von STAT5 und der MAPKinase (Hayakawa et al. 2000) zur Folge hat. STAT5 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der für die Entstehung und Entwicklung der AML wichtig ist. Er führt des Weiteren zu einer Hemmung von *CCAAT/enhancer-binding protein α* (*c/EBPα*) und PU.1 (ein Transkriptionsfaktor). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Differenzierung von myeloischen Zellreihen. ITD-Rezeptoren sind im Gegensatz zu TKD außerdem in der Lage, ungeachtet von An- oder Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, Kolonien in halbfestem Medium zu formen. ITD führt, genauso wie TKD, zu einer Aktivierung des *FLT3*-Signalweges, jedoch resultierend in unterschiedlichen Auswirkungen. Es ergaben sich aber keine

signifikanten Unterschiede bei ITD und TKD bezüglich der Rezeptorautophosphorylierung und der Phosphorylierung von Erk-1 und -2 (Extrazelluläre Regulatorkinase, Erk), Akt und Shc.

In einer Arbeit von Kelly et al. 2002 konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die *FLT3*-ITD Mutation mit einem ganz bestimmten Phänotyp einhergeht, nämlich einer oligoklonalen myeloproliferativen Erkrankung. Dies wurde in der Arbeit von Grundler et al. 2005 bestätigt. Im Gegensatz zu *FLT3*-ITD Mutationen zeigten die *FLT3*-TKD veränderten Mäuse keine Ausbildung eines myeloproliferativen Syndroms, sondern diese entwickelten einen lymphatischen Phänotyp mit unterschiedlicher hämatologischer Manifestation. Um herauszufinden, wodurch dieser Unterschied in der Ausprägung der verschiedenen Phänotypen herrührt, wurden die nachgeschalteten Signalwege von *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD Mutationen untersucht. In Ba/F3 (prä-B-Zelllinie) und 32D-Zellen kam es zu einer ähnlichen Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 bei *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD Mutationen. In 32D-Zellen führte die Anwesenheit von *FLT3*-ITD zu einer starken Phosphorylierung von STAT5, wobei STAT5 nur unwesentlich durch die Anwesenheit von *FLT3*-TKD aktiviert wurde. Dies lässt darauf schließen, dass eine starke Aktivierung von STAT5 für die Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung, nicht aber für die Induktion einer lymphatischen Erkrankung bei Mäusen notwendig ist.

Ein möglicher Erklärungsversuch für die unterschiedliche Auswirkung der *FLT3*-Signalwegaktivierung mit differenter STAT5-Aktivierung wird anhand des Modells des „*Intracellular active kinase load*“, basierend auf einer mis-lokalisierten juxtamembranen Autophosphorylierung, aufgezeigt (Chan 2011). Ein entscheidender Punkt zur Klärung des ITD/TKD-Aktivierungsunterschiedes stellt das intrazelluläre Transportmuster dar. Exogen exprimierte *FLT3*-Wildtyp-Proteine sind überwiegend an der Plasmamembran und ITD-mutierte Proteine vorzugsweise in der perinukleären Region lokalisiert. Daraus resultiert eine unterschiedliche Signalwirkung. Ein an die Plasmamembran gebundenes *FLT3*-ITD-Protein zeigt eine signifikant reduzierte STAT5-Aktivierung und eine erhöhte Erk und Akt Phosphorylierung. Der *FLT3*-ITD Transport entlang des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates ist verlangsamt. Die Interaktion von phosphorylierter Juxtamembran mit der Phosphotyrosin-bindenden

Domäne hält die Mehrzahl der *FLT3*-ITD-Proteine zurück, sodass diese die Plasmamembran nicht erreichen. Die hohe Menge an mis-lokalisierten aktivierten *FLT3*-ITD mit verlängerter zytosolischer Retention erhöht die Expositionszeit für Substrate wie z.B. STAT5 und aktiviert diese vermehrt. *FLT3* mit Mutationen in der Aktivierungsschleife sind weniger effizient in der Autophosphorylierung der juxtamembranären Domäne. Daraus resultiert ein geringerer Grad an mis-lokalisierter aktivierter Kinase. Im Vergleich zu *FLT3*-ITD gelangt mehr unphosphoryliertes *FLT3*-TKD-Protein zur Plasmamembran und übermittelt durch die Phosphorylierung von proximalen Zellwandoberflächensubstraten ähnliche downstream Signale wie bei einer ligandenabhängigen *FLT3*-Wildtyp-Aktivierung. Die Arbeitsgruppe von Sallmyr konnte 2008 zeigen, dass eine ITD-Mutation einen Kreislauf von genomischer Instabilität verursacht. Es wurde eine Erhöhung der ROS (reactive oxygen species) Produktion nachgewiesen. Dies wiederum führte sowohl zu einem vermehrten DNA-Doppelstrangbruch als auch zu einer fehlerhaften DNA-Reparatur. Diese Erkenntnis könnte die Aggressivität der AML mit gleichzeitigem Vorliegen einer *FLT3*-ITD Mutation erklären.

Bezüglich der klinischen bzw. prognostischen Bedeutung der *FLT3*-ITD Mutation zeigte sich in mehreren Arbeiten ein unterschiedliches Verhalten.

In den Arbeiten von Schnittger et al. 2002, Thiede et al. 2002, Grimwade et al. 1998, Fröhling et al. 2002, Santos et al. 2010 und Park et al. 2011 konnte gezeigt werden, dass eine *FLT3*-ITD Mutation bei der AML mit einem ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert ist, insbesondere im Hinblick auf das ereignisfreie Überleben (EFS, *event-free survival*) und das Gesamtüberleben (OS, *overall survival*).

1.3.2 *FLT3*-TKD (Punktmutation im Exon 20)

Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne (TKD) finden sich in 5-14 % der AML-Patienten mit normalem Karyotyp (Jiang et al. 2004, Abu-Duhier et al. 2001, Fröhling et al. 2002, Yamamoto et al. 2001, Shih et al. 2004, Bacher et al. 2008 und Ahmad et al. 2010). Die TKD- Mutationen befinden sich in der Aktivierungsschleife von *FLT3* im Exon 20. In der Arbeit von Yamamoto et al. 2001 wird deutlich, dass sich die meisten Punktmutationen im Codon 835 (liegt in der

Tyrosinkinasedomäne 2) befinden. D835-Mutationen wurden am häufigsten in der nach FAB (French-American-British) Klassifikation eingeteilten M5 Gruppe mit 22,5 % gefunden. Bei diesen Punktmutationen wird ein Nukleotid gegen ein anderes ausgetauscht und es entsteht eine neue Aminosäure. Zum Beispiel bei D835Y, der häufigsten TKD-Mutation, wird das erste Aminosäure bestimmende Guanin-Nukleotid gegen ein Thymin-Nukleotid ausgetauscht und dadurch die Änderung der Aminosäure Aspartat zu Tyrosin bewirkt. Weitere TKD-Mutationen sind D835V, D835H, D835E, D835A und D835N. Ebenso wie die Interne Tandemduplikation (ITD) gehört auch die Tyrosinkinasedomäne (TKD) Mutation zu den aktivierenden Mutationen. Eine Arbeitsgruppe aus Münster (Choudhary et al. 2005) beschrieb die verschiedenen Auswirkungen der TKD-Mutation. Durch eine TKD-Mutation kann ebenso wie bei der *FLT3*-ITD ein IL3- (Interleukin 3) oder FL-unabhängiges Wachstum von 32D-Zellen induziert werden. TKD-Mutationen sind in der Aktivierungsschleife von *FLT3* lokalisiert und verändern dadurch deren Konformation. Dadurch induzieren sie ähnliche/gleiche biologische und biochemische Reaktionen wie eine Ligandenaktivierung durch *FLT3*-WT (Wildtyp). TKD führt, im Vergleich zur ITD, nur zu einer geringfügigen Induktion von STAT5-Zielgenen. Es hemmt auch nicht wie die ITD die für die myeloische Differenzierung wichtigen Proteine c/EBP α und PU.1. Allerdings ergab sich für ITD und TKD kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Rezeptorphosphorylierung und Phosphorylierung von Erk-1 und -2 Akt und Shc.

Wie bereits erwähnt, wurde in *FLT3*-TKD veränderten Mäusen ein lymphatischer Phänotyp und bei *FLT3*-ITD Mäusen eine myeloproliferative Erkrankung ausgelöst. Beide Mutationen gehören zu den aktivierenden Mutationen im *FLT3*-Gen mit nachfolgender Aktivierung der Signalwege. Wie es jedoch zu einem Auftreten von unterschiedlichen Phänotypen kommen kann, ist letztendlich nicht klar. Die unterschiedliche Aktivierung von STAT5 könnte eine Rolle spielen, aber der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht bekannt. Da die Mausmodelle keinen leukämischen Phänotyp entwickeln, ist es sehr wahrscheinlich, dass für die Entstehung des Leukämie-Phänotyps weitere Hits benötigt werden. Möglicherweise sind diese zusätzlichen Hits andere Genmutationen.

Die im selben Gen befindlichen *FLT3*-TKD und *FLT3*-ITD Mutationen gehören beide zu den aktivierenden Mutationen, dennoch weisen sie unterschiedliche Transformationspotentiale auf. Die genaue Auswirkung der ITD durch die Verlängerung der JM-Z („zipper“, Verknüpfungsregion der juxtamembranären Domäne) auf die Intaktheit des Strukturproteins ist bis heute noch ungeklärt. Durch die enge Lokalisation zur JM-B („binding“, Bindungsregion der juxtamembranären Region) ist es gut vorstellbar, dass diese Mutation einen autoinhibitorischen Zustand nahezu vollständig verhindern kann. Man nimmt an, dass eine Verlängerung der JM-Z die Position der JM-S („switch“, Umschaltregion) versetzt. Vermutlich kommt es dadurch zu einer Störung der JM-B in deren Bindungsstelle (Reindl et al. 2006).

Es bleibt weiterhin unklar, welche Auswirkungen die Punktmutationen der TKD in der gut konservierten Aktivierungsschleife auf die Proteinstruktur haben. Bis heute kann nur spekuliert werden, dass durch die Mutationen ITD und TKD jeweils die Entstehung einer anderen Proteinstruktur bewirkt wird und dass es dadurch zu unterschiedlichen Ansteuerungen der Signalwege kommt.

Die prognostische Bedeutung der *FLT3*-TKD ist derzeit noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert. In der Arbeit von Whitman et al. 2008 zeigte sich für Patienten mit einer *FLT3*-TKD Mutation ein schlechteres krankheitsfreies Überleben (DFS, *disease-free survival*) im Vergleich mit AML-Patienten, die einen *FLT3*-WT besaßen. Jedoch zeigte eine Arbeit von Mead et al. 2007 bei Vorhandensein einer TKD-Mutation eine günstigere Prognose bezüglich der kumulativen Rückfallinzidenz (CIR, *cumulative incidence of relapse*), ein besseres Rezidiv-freies Überleben (RFS, *relapse-free survival*) und eine günstigere 5-Jahres-Überlebensrate. Es zeigte sich sogar, dass Patienten mit einem hohen Mutationslevel, d.h. also viel TKD-Mutation, eine günstigere kumulative Rückfallinzidenz und Gesamtüberlebenszeit haben als Patienten, die niedrigere Mutationslevel aufzeigen.

In einigen neueren Untersuchungen von Han et al. 2009 und der Sino-US Shanghai Leukemia Cooperative Group 2010 konnte kein signifikanter Einfluss einer TKD-Mutation auf die Prognose gezeigt werden.

1.3.3 Weitere Punktmutationen im *FLT3*-Gen

In der funktionell wichtigen JM-Domäne wurden weitere aktivierende Punktmutationen beschrieben. Hierbei handelt es sich um die von Stirewalt et al. 2004 detektierten V579A und V592A im Exon 14. Dabei wurde jeweils nur ein Nukleotid ausgetauscht. In diesen beiden Fällen wurde Valin gegen Alanin ersetzt. Des Weiteren beschreibt Stirewalt eine Serie von vier aufeinanderfolgenden Nukleotidsubstitutionen in zwei benachbarten Codons. Dabei wurden Phenylalanin und Tyrosin gegen Glycin und Aspartat ausgetauscht (F590G, Y591D). Eine Arbeitsgruppe aus München (Reindl et al. 2006) zeigte zusätzliche aktivierende Punktmutationen in der JM-Domäne. Hierbei handelt es sich um einzelne Nukleotidsubstitutionen an Position 591 und 594 (Y591C und F594L). Der Erwerb dieser juxtamembranen Punktmutationen erzeugt ein faktorunabhängiges Wachstum und eine Überempfindlichkeit gegenüber dem FL. Auf hämatopoetische Zellen wirken sie antiapoptotisch. Außerdem führen sie zu einem Anstieg der Autophosphorylierung und in Abwesenheit des FL zu einer vermehrten Oligomerisationsrate. Dennoch ist das Ausmaß der Rezeptoraktivierung wesentlich schwächer als bei *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD Rezeptormutationen. Eine mögliche Ursache für das schwächere Transformationspotential der juxtamembranen Punktmutation gegenüber der *FLT3*-ITD führte Reindl auf die geringere Änderung des Strukturproteins der autoinhibierenden JM-Domäne zurück.

Es konnte gezeigt werden, dass ein einzelner Aminosäureaustausch in der autoinhibitorischen JM-Domäne ausreicht, um das Transformationspotential von *FLT3* zu aktivieren.

Eine weitere Punktmutation wurde durch Jiang et al. 2004 beschrieben. Hierbei handelt es sich um einen Aminosäureaustausch im Codon 841 (N841I und N841Y) des Exon 20. Durch diese Mutation kommt es in der charakteristischen Struktur des autoinhibitorischen *FLT3*-Rezeptors zu einem Stabilisierungskontakt zwischen der Aktivierungsschleife und der C-Schleife der Kinasedomäne. Die Aktivierungsschleife liegt normalerweise in inaktiver Konformation vor. Eine Mutation in N841 führt dazu, dass die inaktive Konformation energetisch günstiger wird, wodurch der *FLT3*-Rezeptor aktiviert wird. *FLT3*-Rezeptoren, die eine N841I

Mutation aufweisen und in einer Ba/F3-Zelle exprimiert werden, sind autophosphoryliert und führen zu einer Phosphorylierung von STAT5 und ERK. Außerdem induziert diese Mutation eine IL3-unabhängige Proliferation.

Eine weitere Punktmutation im Exon 20 wurde von Kindler et al. 2005 beschrieben. Im Codon 842 wird durch eine Punktmutation Tyrosin durch Cystein ersetzt. Durch Kindlers Analysierung der *FLT3*-Struktur wurde deutlich, dass Y842 zu einem entscheidenden Teil für die Regulation der Umwandlung von geschlossener zu geöffneter, also aktiver Konformation beiträgt.

1.4 Zielgerichtete Therapie durch FLT3-Inhibitoren

Die Anzahl der synthetisierten *FLT3*-Inhibitoren ist in den letzten Jahren rapide angestiegen. Hier sollen jedoch nur die für die *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD wichtigen Inhibitoren kurz beschrieben werden.

Zu den relevanten Inhibitoren gehört PKC412 (ein Benzoyl-Staurosporin, Handelsname der Firma Novartis, Basel: Midostaurin). Dieser potente Inhibitor befindet sich zur Zeit in der klinischen Phase III. In hämatopoetischen Zelllinien, die endogen einen aktivierten *FLT3*-Rezeptor exprimieren, entfaltet er seine proapoptotische und antiproliferative Aktivität. PKC412 hemmt neben *FLT3* auch indirekt Tyk2, STAT5 und MAPK. Durch diese Interaktionshemmung kommt es zu einer Störung der Zellproliferation.

In der klinischen Phase I/II befindet sich der Inhibitor MLN518 (ein Piperazinylquinazolin, ursprünglich CT53518, durch die Firma Millennium Pharmaceuticals, San Francisco heute auch als Tandutinib bekannt). Er hemmt die Autophosphorylierung von *FLT3*-, *PDGFR*- und *KIT*- Tyrosinkinase. In *FLT3*-ITD-positiven Zelllinien inhibiert er zusätzlich das Wachstum von Blastenkolonien (Griswold et al. 2004).

Ein weiterer potenter Hemmstoff, SU11248 (ein Indolinon, Handelsname der Firma Pfizer, New York: Sunitinib), ist derzeit in klinischer Erprobung. SU11248 inhibiert *PDGFR*, *VEGFR2* und *KIT* und zeigt anti-tumoröse und anti-angiöse Eigenschaften. In einem Modelversuch mit *FLT3*-Wildtyp, *FLT3*-ITD und *FLT3*-D835-Zelllinien zeigte SU11248 zusätzlich eine Hemmung der Phosphorylierung.

SU11248 verfügt auch über apoptotische Eigenschaften, indem er die durch *FLT3*-WT und *FLT3*-ITD hervorgerufene Proliferation hemmt (O`Farrell et al. 2003).

Ein weiterer Hemmstoff mit dem Namen Lestaurtinib (CEP-701) wurde von der Firma Cephalon (Frazer, Pennsylvania, USA) ursprünglich als Inhibitor für TrkA entwickelt. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Indolocarbazol-Derivat ebenfalls bei Patienten mit *FLT3*-Mutationen eingesetzt werden kann. Es inhibiert die Autophosphorylierung von mutierten *FLT3*-Rezeptoren.

Ein weiterer in klinischer Phase II befindlicher Hemmstoff ist AC220. Dieser Hemmstoff wurde als erster selektiver Klasse-III-Tyrosinkinase Inhibitor entwickelt. Er scheint ein potenter und selektiver *FLT3*-Inhibitor mit guten pharmakologischen Eigenschaften und ausgezeichnetem pharmakokinetischem Profil zu sein. Auch scheint er eine ausgezeichnete Wirksamkeit zu haben (Zarrinkar et al. 2009). In aktuellen klinischen Studien konnte jedoch zunehmend eine erworbene Resistenz gegenüber diesem selektiven *FLT3*-Inhibitor verzeichnet werden. Auch zeigten *FLT3*-ITD-positive Patienten nach Behandlung mit AC220 einen sekundären Erwerb einer TKD-D835-Mutation. Ein ganz neu entwickelter dualer *FLT3*-Aurorakinase Inhibitor (CCT137690), basierend auf einem Imidazopyridingrundgerüst, zeigt in einer aktuellen Studie jedoch keine Resistenzentwicklung bei *FLT3*-ITD-positiven Patienten mit sekundärer D835-Mutation (Moore et al. 2012). Aurorakinasen spielen eine Schlüsselrolle in der Mitose. Aurorakinase A und B- Inhibitoren verursachen eine G2/M-Hemmung, einen Cytokineseausfall und letztendlich den Zelltod.

1.5 Weitere prognostisch relevante Genmutationen bei der AML

1.5.1 *NPM1*-Mutation

Nukleophosmin (*NPM1*) ist ein ubiquitär exprimiertes Nukleolar-Phosphoprotein, das sich zwar kontinuierlich zwischen dem Nukleolus und dem Zytoplasma hin und her bewegt, aber überwiegend im Nukleolus und der Nuklearmembran lokalisiert ist (Borer et al. 1989). *NPM1* ist an der ribosomalen Proteinbildung und deren Transport mitbeteiligt. Es fungiert auch als Chaperon, das die Aggregation von Proteinen im Nukleolus verhindert. Als *nukleolar-binding-partner* des

alternate-reading-frame protein (ARF) wird *NPM1* von diesem zur p53-unabhängigen Zellzyklusregulation verwendet (Brady et al. 2004).

Mutationen im *NPM1* sind die häufigsten Genmutationen, mit einer Frequenz von 46-62 %, bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp (Falini et al. 2005, Schnittger et al. 2005, Boissel et al. 2005, Thiede et al. 2006, Döhner et al. 2005). *NPM1*-Mutationen sind mit dem weiblichen Geschlecht und einer myelomonozytären Morphologie assoziiert (Schnittger et al. 2005, Döhner et al. 2005). Die häufigste *NPM1*-Mutation ist eine vier Basenpaar-Duplikation, 956dupTCTG im Exon 12 (als Typ A bezeichnet). Durch diese Mutation werden die letzten 7 Aminosäuren durch 11 andere Reste ersetzt, wodurch das Leseraster verschoben wird. Dies führt wiederum zu Veränderungen im C-terminalen Teil, nämlich zu einem zusätzlichen Exportsignal. Durch diese Veränderung kommt es zu einer Translokation des Proteins ins Zytoplasma. Patienten mit *NPM1*-Mutationen weisen zweimal häufiger eine *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD Mutation auf als Patienten mit *NPM1*-Wildtyp.

Die prognostische Bedeutung der *NPM1*-Mutation bei normalem Karyotyp wurde in vielen Arbeiten gezeigt. Dabei wurde deutlich, dass die abnormale zytoplasmatische Lokalisation des Nukleophosmin, welche in hohem Grad mit der Häufigkeit der *NPM1*-Mutation korreliert, ein unabhängiger günstiger Prognosefaktor ist (Falini et al. 2005). Patienten mit einer *NPM1*-Mutation haben eine günstigere Prognose bezüglich der kompletten Remission (CR, *complete remission*) als Patienten ohne *NPM1*-Mutation. Dabei hat sich gezeigt, dass ein wichtiger Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Vorliegen einer *FLT3*-ITD Mutation im Hinblick auf die Prognose besteht. Patienten mit einer *NPM1*-Mutation ohne gleichzeitig vorliegende *FLT3*-ITD Mutation weisen eine signifikant bessere Prognose bezüglich der Gesamtüberlebenszeit, des rezidivfreien Überlebens und des ereignisfreien Überlebens auf als Patienten, die *NPM1*-mutiert/*FLT3*-ITD-positiv, *NPM1*-WT/*FLT3*-ITD-positiv und *NPM1*-WT/*FLT3*-ITD-negativ sind. In Hinblick auf die komplette Remission ergaben sich hier keine Unterschiede (Thiede et al. 2006, Döhner et al. 2005, Verhaak et al. 2005, Schnittger et al. 2005, Schlenk et al. 2008, Haferlach et al. 2009, Schnittger et al. 2011).

1.5.2 C/EBPA-Mutation

Das *C/EBPA* (CCAAT/enhancer-binding protein A)-Gen kodiert einen myeloischen Transkriptionsfaktor. *C/EBPA* besitzt eine zweiteilige DNA-Bindungsdomäne bestehend aus einer positiven Basisregion, die mit der DNA in Kontakt tritt, und einem Leucin-zipper in dem C-terminalen Anteil, der für die Vermittlung der Dimerisation verantwortlich ist. *C/EBPA* spielt eine entscheidende Rolle in der Granulopoese (Preudhomme et al. 2002).

Mutationen des *C/EBPA*-Gens wurden in 7-10 % der AML-Zellen, überwiegend in AML mit normalem Karyotyp mit einer Inzidenz von 12-13 % gefunden. Sie verursachen eine Inaktivierung ihres transkriptionalen Potentials (Tenen 2001, Pabst et al. 2001, Gombart et al. 2002). Bezüglich der prognostischen Bedeutung zeigt sich im Hinblick auf die komplette Remission keine Differenz zwischen Patienten mit *C/EBPA*-Mutation und Patienten ohne *C/EBPA*-Mutation. Patienten mit *C/EBPA*-Mutation haben einen signifikanten Vorteil bezüglich der CRD (Fröhling et al. 2004), DFS (Bienz et al. 2005), EFS (Boissel et al. 2005) und OS (Fröhling et al. 2004, Bienz et al. 2005). In der französischen Studie von Preudhomme et al. 2002 zeigte sich kein Unterschied für das gleichzeitige Vorliegen einer *FLT3*-ITD-Subgruppe im Hinblick auf die komplette Remissionsrate. Allerdings zeigte sich bei Anwesenheit der *FLT3*-ITD eine kürzere Gesamtüberlebensrate, aber kein signifikant kürzeres ereignisfreies Überleben oder krankheitsfreies Überleben. Neuere Daten deuten darauf hin, dass nur die sog. *CEBPA* „double mutations“, also biallelische *CEBPA*-Mutationen, prognostisch relevant sind (Wouters et al. 2009).

Die Daten von Dufour et al. aus dem Jahr 2010 bestätigten dies, indem gezeigt werden konnte, dass Patienten mit biallelischer *CEBPA*-Mutation ein besseres medianes Gesamtüberleben aufwiesen. Auch konnte gezeigt werden, dass nur eine biallelische und nicht eine monoallelische *CEBPA*-Mutation als wichtiger Prognosefaktor gilt. Die Arbeit von Shen et al. bestätigte 2011 diese Daten.

1.5.3 *MLL*-PTD

Das *MLL*-Gen (*mixed lineage leukemia* Gen) ist in der chromosomalen Bande 11q23 lokalisiert. Partielle Tandemduplikationen (PTD) beinhalten meist eine Duplikation des Genomabschnittes von Exon 5 bis Exon 11 reichend. Die duplizierte Region wird in das Intron 4 des *MLL*-Gens eingefügt. In einem geringen Teil der Fälle reicht die duplizierte Region von Exon 5 bis Exon 12. Beide Veränderungen resultieren in einer In-frame Fusion des Exon 11 oder 12 und einer Duplikation des N-terminalen Endes des *MLL*-Gens, wodurch schließlich ein verlängertes Protein entsteht (Millne et al. 2002).

MLL-PTD sind in 5-10 % der AML-Patienten beschrieben (Caligiuri et al. 1994, Schnittger et al. 2000). Bei AML-Patienten mit Trisomie 11 ist die Inzidenz der *MLL*-PTD's höher als bei Patienten mit normalen Karyotyp (Schnittger et al. 2000, Christiansen et al. 2001).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit *MLL*-PTD eine signifikant kürzere komplette Remissionsdauer, eine schlechtere Prognose bezüglich des rückfallsfreien Überlebens sowie des ereignisfreien Überlebens im Vergleich zu Patienten mit *MLL*-WT aufzeigten (Döhner et al. 2002, Caligiuri et al. 1994, Schnittger et al. 2000). Die Arbeit von Shimada et al. aus dem Jahr 2008 bestätigte diese Daten. Auch zeigte sich eine signifikant schlechtere 3-Jahres-Überlebensrate sowie ein kürzeres krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit *MLL*-PTD. Die Arbeit von Whitman et al. 2007 zeigt, dass Patienten mit einer *MLL*-PTD signifikant von einer autologen Blutstammzelltransplantation profitieren.

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine große (n=319), homogene AML-Patientengruppe mit normalem Karyotyp, die im Rahmen der AML-HD98A-Studie der AML-Studiengruppe (AMLSG) behandelt wurde, auf das Vorliegen der bekannten D835-Mutation sowie weiterer bislang unbekannter Mutationen im Exon 20 des *FLT3*-Gens untersucht werden. Dabei sollten Häufigkeiten und exakte genomische Lokalisation und Typ der Mutationen genauer beschrieben werden.

Des Weiteren sollte ein Methodenvergleich bezüglich der Identifizierung der D835-Mutation zwischen dem herkömmlichen Nachweisverfahren PCR (Polymerasekettenreaktion) und anschließendem Restriktionsenzymverdau und einer PCR mit nachfolgender Sequenzierung des gesamten Exon 20 erfolgen. Es sollten dabei die jeweiligen Vor- und Nachteile der verschiedenen Verfahren, in Bezug auf die Sensitivität und Spezifität, dargelegt werden und eine Aussage über den klinischen Einsatz der Sequenzanalyse als mögliche neue Screeningmethode gemacht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Die Analyse für Mutationen im Exon 20 des *FLT3*-Gens wurde bei 319 AML-Patienten mit normalem Karyotyp durchgeführt. Alle Patienten waren im Rahmen der AML-HD98A-Studie behandelt worden. Die Studie begann im Mai 1998 und wurde im Dezember 2004 abgeschlossen. Diese Studie umfasst Patienten im Alter zwischen 16 und 60 Jahren, das mediane Alter lag bei 48,2 Jahren. Teilnehmer der Studie waren Patienten mit de novo AML, sekundärer AML nach myelodysplastischem Syndrom (s-AML, 136 Patienten) und Patienten mit therapieassoziiertes AML (t-AML, 55 Patienten). Die Geschlechterverteilung war ausgewogen mit 50 % Frauen und 50 % Männer. Die Diagnose wurde morphologisch, zytochemisch und mittels Immunphänotypisierung nach den Kriterien der French-American-British Cooperative Group (FAB; Bennett et al. 1985) gestellt. Insgesamt wurden 870 Patienten in die Studie eingeschlossen; bei 756 lag ein Karyotyp vor, wobei 384 Patienten einen normalen Karyotyp aufwiesen. Von diesen 384 Patienten mit normalem Karyotyp wurden 319 Patienten in dieser Arbeit untersucht. Bei den restlichen 65 Patienten lag kein oder für die Analyse zu wenig Material vor. Für all diese 319 Patienten lag eine TKD-Analyse mittels PCR/Restriktionsenzymverdau für Codon 835 vor.

Alle Patienten wurden bei Aufnahme in die Studie über deren Charakter aufgeklärt. Für die Aufbewahrung der peripheren Blut (PB)- und Knochenmark (KM)-Proben, sowie deren Verwendung für Studienzwecke, liegen die schriftlichen Einwilligungserklärungen sowie das positive Votum der Ethikkommission vor.

Die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von jedem Patienten gewonnenen Proben stammen entweder aus dem peripheren Blut (PB) oder aus dem Knochenmark (KM). Zur Anreicherung mononukleärer Zellen wurden die Blut- und Knochenmarkproben der Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren zur Trennung von Zellen gleicher Größe, aber unterschiedlicher Dichte. In einer homogenen Lösung sind ein

Gradientenbildner und entweder Proben des PB oder des KM enthalten. Bei Zentrifugation stellt sich für den Gradientenbildner ein Dichtegradient ein. Je nach Dichte wandern die Zellen zu der entsprechenden Stelle im Gradienten. Somit kann man selektiv mononukleäre Zellen gewinnen.

Die gewonnenen mononukleären Zellen wurden dann als Zellpellets bei -70 °C eingefroren und standen somit für die Analyse zur Verfügung.

2.1.2 Kontrollproben

Um zu evaluieren, ob es sich bei den neu identifizierten Sequenzänderungen um sogenannte TAQ-errors (artifizuell erzeugte Sequenzvarianten durch Fehleinbau von Basen bei der PCR) handelt oder ob es sich im Rahmen der normalen Verbreitung in der Bevölkerung um vorkommende Polymorphismen handelte, wurde die DNA von 10 gesunden Kontrollpersonen analog untersucht.

2.1.3 AML-Zelllinien

Um zu evaluieren, inwieweit andere Mutationen im Exon 20 vorliegen, wurden andere myeloischen Leukämie-Zelllinien untersucht. Bei den Zelllinien handelt es sich um NB4, UT7, Mono-Mac-1, KG1, HL60, SigM5, HEL, K562, Kasumi, Me1-f2, die als DMSO-Pellets unter www.DSMZ.de kommerziell erhältlich sind.

2.2. Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Für die Untersuchung auf Veränderungen des *FLT3*-Gens war es zuerst notwendig, die genomische DNA mit Hilfe des DNAzol-Reagenz (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) zu isolieren. Die vorher aufgereinigten mononukleären Zellpellets der PB- und KM-Proben wurden bis zur Isolierung bei -80 °C aufbewahrt. Damit die DNA nicht zerstört wird, wurden die Proben in einer zuvor auf -20 °C gekühlten Box aufgestellt. Die jeweiligen PB- oder KM-Pellets wurden mit 2 ml DNAzol-Lösung versetzt und gründlich gemischt. Dadurch wurde eine

Lyse der Zellwandbestandteile herbeigeführt. Durch Zugabe von 2 ml 100 % Ethanol (RdH, Seelze) und nach kurzem sorgfältigem Schütteln erhielt man nun die gefällten DNA-Stränge, die in Form eines kleinen Sediments sichtbar waren. Danach wurde es für 15 Minuten bei 4 °C mit 13000 U/min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Osterode) und der Überstand dekantiert. Das DNA-Pellet wurde in 1 ml 95 % Ethanol gewaschen und wieder bei 4 °C für 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde der Vorgang nochmals wiederholt. In Abhängigkeit der Pelletgröße erfolgte anschließend über Nacht die Resuspension in 100 bis 200 µl destilliertem Wasser bei leichtem Schütteln und 37 °C (Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg). Um einen Verdau der restlichen RNA (Ribonukleinsäure)-Fragmente zu erreichen, wurde die resuspendierte DNA kurz abzentrifugiert und inkubiert. Anschließend mit 5 µl RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C auf einem Heizblock (QBT2, Grant Instruments, Cambridge, England) erwärmt. Zur Überprüfung der Reinheit (OD₂₆₀/OD₂₈₀, *optical density* bei 260 nm für DNA und bei 280 nm für RNA, Werte zwischen 1,5 und 1,9) und Bestimmung der Konzentration (OD₂₆₀, Werte zwischen 0,2 und 0,9 µg/µl) wurde die extrahierte genomische DNA im UV-Photometer (Ultrospec III, Pharmacia, Uppsala, Schweden) durch Absorption bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration war für die spätere Berechnung der exakten Menge der Restriktionsreagenzien notwendig. Die Proben wurden bis zur Durchführung weiterer Untersuchungen bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 *FLT3* Exon 20 Mutationsanalyse

In einer Vielzahl von Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass bei Patienten mit AML eine Mutation in Exon 20 im Codon D835 des *FLT3*-Gens nachgewiesen werden kann. Diese betrifft einen Abschnitt der zweiten Tyrosinkinasedomäne (TK2) des *FLT3*-Rezeptors.

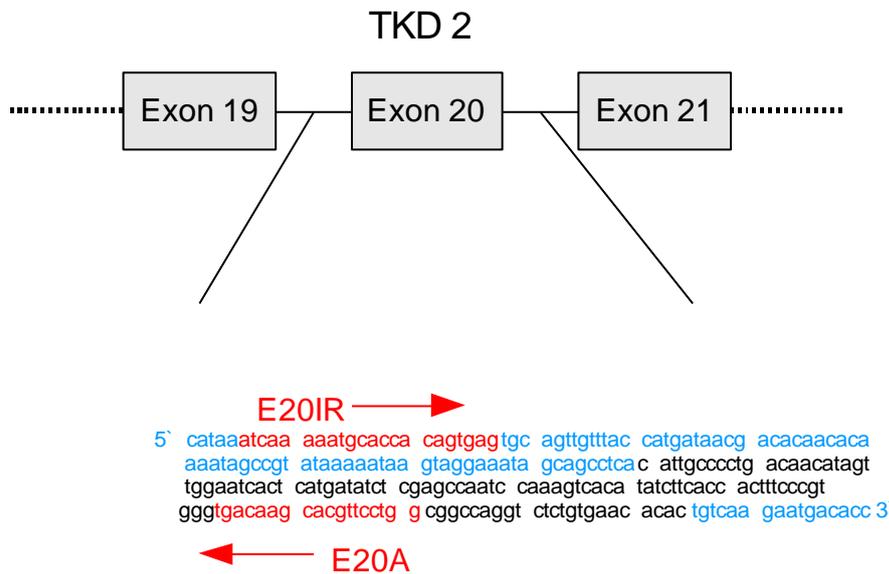


Abbildung 2: Schematische Sequenzdarstellung des Exon 20 im Bereich der Tyrosinkinasedomäne 2, TKD 2 (schwarz markiert Sequenzabfolge) und den angrenzenden Introns (hellblau markiert Sequenzabfolge). Genaue Lokalisationsangabe des forward Primers E20A und des reverse Primers E20IR in der Sequenzdarstellung (hier rot dargestellt).

a) PCR (Polymerase-Chain-Reaction)-Amplifikation

Für die Sequenzanalyse wurde als Template genomische DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und den Oligonukleotid-Primern 20A (Forward) (5'-CCA GGA AGG TGC TTG TCA-3') und E20IR (Reverse) (5'-TCA AAA ATG CAC CAC AGT GAG-3') nach Angaben von Abu-Duhier et al. 2001 vervielfältigt. Wie in Abb.2 zu erkennen, sind die Primer in den flankierenden Introns lokalisiert. Somit konnte das gesamte Exon 20 amplifiziert werden.

In jedem PCR-Ansatz von 50 µl befanden sich:

- 2 µl genomische DNA
- 1 µl 20A Primer (Forward-Primer; 10 pmol/µl; Thermo Electron, Ulm)
- 1 µl E20IR Primer (Reverse-Primer; 10 pmol/µl; Thermo Electron, Ulm)
- 1,25 µl dNTP (Desoxynukleosidtriphosphate, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Roche Diagnostics, Mannheim)
- 5 µl 10 x PCR Puffer (Applied Biosystems/Roche, Branchburg, New Jersey, USA)

-
- 5 µl MgCl₂ Solution (25 mM, Applied Biosystems/Roche, Branchburg, New Jersey, USA)
 - 0,25 µl Ampli Taq Gold-Polymerase (Konzentration: 5 U/µl; Applied Biosystems/Roche, Branchburg, New Jersey)
 - 34,5 µl Aqua dest.

Um eine Verunreinigung des Master Mixes auszuschließen, wurde bei jedem Ansatz eine zusätzliche Negativkontrolle mitgeführt, die bis auf die genomische DNA dieselben Reagenzien beinhaltet.

Die PCR-Bedingungen richteten sich nach einem Standardprotokoll (von Abu-Duhier modifiziert). Die PCR-Proben durchliefen 35 Zyklen dieser Amplifikationsschritte mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 Minuten. Daraufhin folgte der eigentliche sich wiederholende Abschnitt des Programms mit Denaturierung bei 95 °C für 20 Sekunden, Annealing bei 56 °C für 60 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 120 Sekunden. Abschließend wurde mit Hilfe des PCR-Gerätes (GeneAmp 9700, Applied Biosystems, Foster City, USA) ein finaler Syntheseschritt bei 72 °C für 5 Minuten durchgeführt.

Zur Überprüfung, ob die Amplifikation des DNA-Fragmentes erfolgreich war, wurde anschließend eine elektrophoretische Auftrennung durchgeführt. Hierzu wurden 8 µl der PCR-Produkte mit 2 µl Gel-Loading-Buffer (10 x Blue Juice; Gibco BRL, Gaithersburg, USA) versetzt und auf ein einprozentiges Agarose-Gel aufgetragen. Zur Kontrolle der richtigen Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes (Länge 196 bp) wurde auf dasselbe Gel 5 µl eines 100 bp Längenstandards (1 µg/µl; Invitrogen, Groningen, Niederlande) aufgetragen.

Für die Herstellung eines einprozentigen Gels wurden je nach Gelgröße 0,5 g bzw. 1,5 g Agarose (Sigma, St. Louis, USA) abgewogen und mit 50 ml bzw. 150 ml TEA-Puffer (TRIS-Puffer, USB, Cleveland, USA; 100 % Essigsäure, Roth, Karlsruhe und 0,5 M EDTA, Merck, Darmstadt) versetzt und durch Aufkochen in der Mikrowelle (Siemens; VWR, Ulm) fertiggestellt. Zum Abkühlen wurde das Gel auf einen Thermomagnetrührer (Heidolph MR3002 S8, VWR, Ulm) gestellt und mit einem Rührfisch versehen. Zur späteren Erkennung der charakteristischen Bandenanordnung der amplifizierten Fragmente (etwa 196 bp) im UV-Licht des

Eagle Eye II (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurde das fertige Gel für etwa 20 Minuten in Ethidiumbromid (Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich) gefärbt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 120-140 V und 500 mA je nach Größe des Gels für 30 bis 45 Minuten in einer mit TEA-Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer (VWR, Ulm, Bestellnr.: 730-0101).

Bei unauffälliger Negativkontrolle und charakteristischer Bandenlänge von etwa 196 bp wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) für die spätere CSR wie folgt aufgereinigt: Zuerst wurden die restlichen 42 µl des PCR-Produktes mit 5-facher Menge an PB-Puffer vermischt und zur Bindung der DNA an die Membran der Qiagen-Säule 1 Minute bei 13.000 U/min Raumtemperatur zentrifugiert. Der abzentrifugierte Rest wurde verworfen. Die Säule wurde mit 700 µl PE-Buffer (mit Ethanol gemischt) zum Spülen des ersten Puffers übergossen und erneut 1 Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Auch dieser Rest wurde verworfen. Reste des PE-Puffer wurden durch eine erneute Zentrifugation entfernt. Um die gebundenen DNA-Fragmente aus der Säule zu eluieren, wurden 30 µl Aqua dest. in die Mitte der Säule pipettiert. Nach einer 1-minütigen Einwirkzeit wurden in einer letzten 1-minütigen Zentrifugation bei 13.000 U/min die DNA-Fragmente frei und standen für die CSR zur Verfügung.

b) CSR (*Cycle-Sequencing-Reaction*)

Diese lineare PCR-Amplifikation (also mit nur einem Primer) findet vor der eigentlichen Sequenzierung statt. Dabei werden von einer Polymerase in die entstehenden DNA-Fragmente auch fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) nach dem Zufallsprinzip eingebaut, die an dieser Stelle den Extensionsschritt der PCR-Reaktion stoppen. Auf diese Weise ergibt sich von dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt eine Vielzahl unterschiedlich langer Fragmente, die sich jeweils um ein Nukleotid unterscheiden und anschließend elektrophoretisch mittels eines automatischen Sequenziergerätes detektiert und computergestützt analysiert werden.

In jedem PCR-Ansatz von 20 µl befand sich:

- 1 µl Primer (3 pmol/µl, für die Forward-Sequenz 20A; Thermo Electron, Ulm und für die Reverse-Sequenz E20IR; Thermo Electron, Ulm)
- 4 µl BigDye (genauere Zusammensetzung siehe unten, Applied Biosystems, Foster City, USA)
- je nach Stärke der DNA-Bande im Agarosegel 0,5 µl bei starken und bis zu 4 µl bei schwachen Banden des aufgereinigten PCR-Produktes
- 11 µl bis 14,5 µl Aqua dest. je nach Menge des PCR-Produktes aufgefüllt auf 20 µl

Der BigDye-Mix enthielt herkömmliche Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) sowie die vier verschiedenen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten ddNTP (G-gelb, C-blau, A-grün, T-rot), MgCl₂ und Tris-HCl Puffer (pH 7,0) und die Ampli Taq DNA-Polymerase.

Die CSR wurde mit einem PCR-Gerät (GeneAmp 9700, Applied Biosystems, Foster City, USA) unter den angegebenen Bedingungen ausgeführt:

Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 96 °C für 45 Sekunden folgten 40 Zyklen mit Denaturierung bei 96 °C für 15 Sekunden, Annealing bei 54 °C für 10 Sekunden und Elongation bei 60 °C für 4 Minuten.

Anschließend wurden die amplifizierte DNA-Fragmente mit Hilfe des DyeEX Spin Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, indem die nicht verbrauchten Nucleoside (fluoreszierende und normale) in der Spin-Kit-Säule abgefangen wurden.

Um die Säulen für die Aufreinigung verwenden zu können, wurden sie 3 Minuten bei 2800 U/min zentrifugiert. Der Zweck dieser Zentrifugation bestand darin, durch Entfernen des Puffers ein Säulenbett zu erhalten. Dieses Bett hält nun die nicht eingebauten Nucleotide in den Poren der Gelsubstanz zurück (Gel-Filtrations-Chromatographie). Die DNA-Fragmente konnten ungehindert den Filter passieren und fanden sich im Eluat wieder.

Um dieses Eluat zu erhalten, wurde das CSR-Produkt in die Mitte der Gelsäule pipettiert und über die Säule laufen lassen. Durch abermaliges Zentrifugieren bei 2800 U/min für 3 Minuten erhielt man das Eluat. Die Aufbewahrung der

gereinigten DNA-Fragmente erfolgt bis zum anschließenden Sequenzierungsschritt bei -20 °C.

c) Sequenzierung

Mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) war es möglich, die genaue Basenabfolge der DNA-Fragmente zu bestimmen. Vor dem Einsetzen der zu analysierenden DNA-Proben in das Sequenziergerät war eine 2-minütige Denaturierung bei 95 °C notwendig. Durch Starten des Sequenziervorganges kam die Probe zuerst mit dem einen Ende mit einer Polymer-gefüllten (Performance Optimized Polymer 6 %, POP-6, Applied Biosystems) Glaskapillare und mit der Kathode (erste Elektrode) in Kontakt. Die Anode (zweite Elektrode) befand sich am Ende der gebogenen Kapillare und war in Elektrophorese-Puffer (in der Verdünnung 1:10 mit HPLC- Wasser; 10 x Genetic Analyzer Buffer mit EDTA, Applied Biosystems) eingetaucht, der mit der Kapillare über ein kurzes Polymer-gefülltes Röhrchen in Verbindung stand.

Die elektrokinetische Injektion eines Teils der Probe in die Kapillare erfolgte nach Anlegen einer Spannung für 15-20 Sekunden zwischen Anode und Kathode. Anschließend wechselten die Kathode und das Ende der Kapillare (Anode) von der Probe in ein mit Elektrophorese-Puffer gefülltes Gefäß. Die elektrophoretische Auftrennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente durch die Polymer-gefüllte Kapillare erlangte man durch erneutes Anlegen einer Spannung. Ein Argon-Ionen-Laser, der am anderen Ende der Kapillare angebracht war, regte die nacheinander passierenden mit je einem der vier Fluoreszenzfarbstoffe markierten DNA-Fragmente an. Dadurch wurde ein Fluoreszenzspektrum emittiert und über eine CCD-Kamera (*Charge-Coupled-Device*) detektiert. Diese Rohdaten wurden mit einem Computerprogramm (ABI PRISM DAS Sequencing Analysis Software Version 3.4, Applied Biosystems) auf einem Dell Intel Pentium 4HT Rechner analysiert und anschließend die DNA-Sequenz graphisch dargestellt. Die Proben-Sequenzen wurden zur Ermittlung der exakten Sequenz der *FLT3*-TKD mit der Basenabfolge einer von einem gesunden Probanden stammenden Kontrollsequenz verglichen. Die Kontrollsequenz wurde zuvor mit der

Basenabfolge aus der *FLT3*-cDNA-Sequenz [GenBank accession number NM_004119]) verglichen. Anschließend wurden alle Proben mit dieser einen Kontrollsequenz abgeglichen.

2.2.3 Nachweis der Punktmutation D835 mittels Restriktionsverfahren

Für die Analyse der D835-Mutationen wurde das Prinzip des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus angewandt. Eco RV, eine Restriktionsendonuklease, erkennt folgende Nukleotid-Sequenz 'GATATC'. Diese Sequenz stimmt genau mit der Abfolge des Codon D835 und dem darauffolgenden I836 des *FLT3*-Gens überein. Durch diese exakte Übereinstimmung ist Eco RV in der Lage an dieser Stelle den DNA-Strang in zwei Fragmente zu spalten. Die Amplifizierung des PCR-Produktes des Exon 20 mit Codon 835 und einer Länge von je 194 bp erfolgte nach demselben Protokoll wie unter 2.2.2 beschrieben. Durch Zugabe des Restriktionsenzym Eco RV wurde das PCR-Produkt verdaut. Entsprachen Codon 835 und I836 dem Wildtyp-Allel, so waren in der Agarose-Gel-Elektrophorese durch die Enzymspaltung zwei DNA-Fragmente mit 65 und 129 bp-Länge nachweisbar. Handelte es sich allerdings um eine Mutation an der Schnittstelle für Eco RV so konnte das Enzym bei Vorliegen der heterozygoten Mutation den mutierten Strang nicht spalten und es wurde gelelektrophoretisch eine zusätzliche Bande des unverdauten PCR-Produktes mit 194 bp erkennbar.

Der Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau wurde wie folgt hergestellt:

- 5 µl SuRe/Cut Puffer B (10 x; 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0; Boehringer, Mannheim)
- 1 µl Eco RV (10 U/µl; Roche Diagnostics, Mannheim)
- 40 µl PCR-Produkt
- 5 µl Aqua dest.

Der sorgfältig gemischte Verdauansatz wurde für zwei bis drei Stunden unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert und anschließend je 50 µl des Restriktionsverdaus mit 10 µl Gel-Loading-Buffer auf ein 2,5-prozentiges Agarose-

Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der vorhandenen Bandenlängen erfolgte wieder im UV-Licht des Eagle Eye II. Diese Daten wurden im Rahmen anderer Projekte generiert und lagen bereits vor der Mutationsanalyse des Exon 20 vor. Die Ergebnisse dieser Restriktionsverdau-Analysen wurden erst nach Abschluss der Sequenzmutationsanalyse von Exon 20 zum Vergleich herangezogen, somit waren diese Daten geblindet.

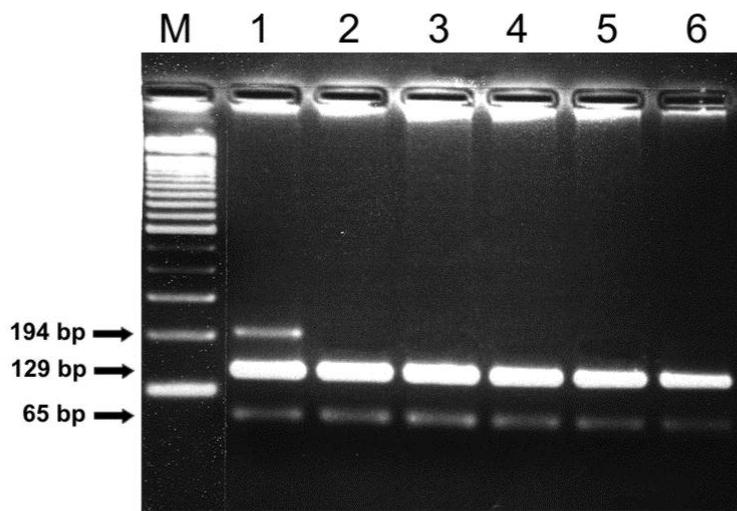


Abbildung 3: Beispiel für den Nachweis einer *FLT3*-TKD Mutation mittels Restriktionsverdau: Nach Amplifikation des Exon 20 mittels PCR und anschließendem Verdau mit Eco RV wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Bei Vorliegen einer D835-Mutation (Fall 1) erschienen nach der Elektrophorese neben den beiden verdauten Fragment-Teilen (129 bp und 65 bp) zusätzlich ein unverdautes, vom mutierten Allel stammendes Fragment mit einer Länge von 194 bp. In den Fällen 2 bis 6 liegt jeweils ein WT für die D835-Mutation vor.

Abkürzungen: bp, Basenpaare; M, 100 bp-Längenstandard; TKD, Tyrosinkinsedomäne; PCR, polymerase chain reaction; WT, Wildtyp.

2.3 Reagenzien und Chemikalien

20A Primer	Fa. Thermo Electron, Ulm
100 bp Längenstandard	Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande
Agarose	Fa. Sigma, St.Louis, USA
Ampli Taq Gold-Polymerase	Applied Biosystems/Roche, Brandenburg, New Jersey, USA
BigDye	Applied Biosystems, Foster City, USA
DNAzol-Reagenz	Fa. Gibco BRL, Gaithersburg, USA

dNTP	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
DyeEx Spin Kit	Fa. Qiagen, Hilden
EDTA	Fa. Merck, Darmstadt
Eco RV	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
E20IR Primer	Fa. Thermo Electron, Ulm
Essigsäure 100 %	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanol 100 %	Rdh, Seelze
Ethidiumbromid	Fa. Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Gel-Loading-Buffer Blue Juice	Fa. Gibco BRL, Gaithersburg, USA
HEL	www.DSMZ.de
HL60	www.DSMZ.de
K562	www.DSMZ.de
Kasumi	www.DSMZ.de
KG1	www.DSMZ.de
Me1-f2	www.DSMZ.de
MgCl ₂ Solution	Applied Biosystems/Roche, Brandenburg, New Jersey, USA
Mono-Mac-1	www.DSMZ.de
NB4-Zelllinie	www.DSMZ.de
PCR-Puffer	Applied Biosystems/Roche, Brandenburg, New Jersey, USA
POP6	Performance Optimized Polymer 6 %, Applied Biosystems
QIA quick PCR Purifikation Kit	Fa. Quiagen, Hilden
RNase A	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
SigM5	www.DSMZ.de
SuRe/Cut Puffer B	Fa. Boehringer, Mannheim
TRIS-Puffer	USB, Cleveland, USA
UT7	www.DSMZ.de

3. ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels molekular genetischer Analyseverfahren Mutationen im Exon 20 des *FLT3*-Gen zu detektieren. Das Patientenkollektiv bestand aus 319 erwachsenen AML-Patienten mit normalem Karyotyp, die in der HD98-A-Studie der AML Study Group (AML5G) erfasst waren. Von allen 319 Patientenproben lagen die Daten zum Restriktionsenzymverdau für Codon 835 geblindet vor.

3.1 Mutationsanalyse von Exon 20 des *FLT3*-Rezeptor-Gens bei gesunden Probanden

In 10 Kontrollproben von jungen gesunden Probanden konnte in keinem der Fälle eine Mutation im Exon 20 gefunden werden.

3.2 Mutationsanalyse von Exon 20 des *FLT3*-Rezeptor-Gens in 10 myeloischen Zelllinien

In keiner der 10 untersuchten myeloischen Zelllinien konnten *FLT3* Exon 20 Mutationen nachgewiesen werden.

3.3 Mutationsanalyse von Exon 20 des *FLT3*-Rezeptor-Gens bei erwachsenen AML-Patienten mit normalem Karyotyp

Insgesamt wurden 319 Patienten mit normalem Karyotyp auf Mutationen von Exon 20 des *FLT3*-Gens untersucht. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

3.3.1 D835-Mutationen

In 23 der 319 Fällen (7,2 %) konnte eine D835-Mutation nachgewiesen werden. Es zeigten sich dabei vier verschiedene heterozygote D835-Mutationen (in der *FLT3*-cDNA-Sequenz entspricht Codon D835 den Nukleotiden 2560 bis 2562 [*GenBank accession number* NM_004119]).

Die häufigste Mutation war ein Austausch des ersten Nukleotids G von Codon D835 durch T, G>T, bei dreizehn der 23 (4,1 % *FLT3*-D835-Fälle). Durch diese Substitution erfolgte ein Aminosäure-(AS)wechsel von Aspartat zu Tyrosin, D835Y. In 5 Fällen (1,6 %) führte die Substitution des ersten Nukleotids G durch C (G>C) zu einer veränderten AS-Abfolge, Aspartat wurde durch Histidin (D835H) ersetzt. Der Ersatz des dritten Nukleotids T durch G (T>G) erfolgte in 4 weiteren Fällen (1,3 %). Dadurch kam es zu einer Substitution der AS Aspartat durch Glutamat (D835E). In 1 Fall (0,3 %) erfolgte eine Transversion des zweiten Nukleotids A zu T (A>T). Daraus resultierte ein AS-Austausch von Aspartat zu Valin (D835V).

Codon 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843
 WT Leu Ala Arg **Asp** Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val
 5` T T G G C T C G A G A T A T G A G T C A T T C C A A C A T A T G T T C T C A G E G C C A T A T G T G A G G C T C C T A 3`

Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Ausschnittes von Exon 20 des *FLT3*-Gens. Gezeigt werden die Codon-Nummern und die Aminosäureanordnung mit ihrem jeweiligen codierenden Nukleotid-Triplet. Hierbei handelt es sich um einen Wildtyp (WT).

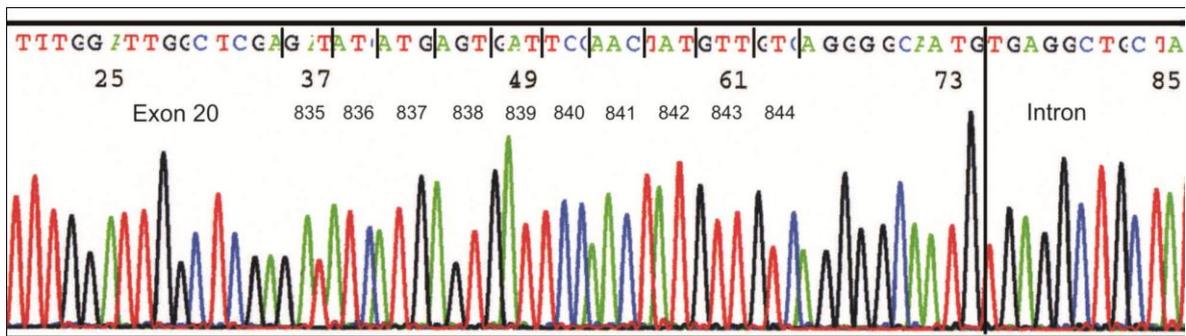


Abbildung 5: DNA-Sequenz von Exon 20 des *FLT3*-Gens. Graphische Darstellung der Basen in Form von farbigen Nukleotid-peaks. Schwarz= G (Guanin), Grün= A (Adenin), Blau= C (Cytosin), Rot= T (Thymin). Hierbei handelt es sich um eine Wildtyp-Sequenz.

Abkürzung : DNA, desoxyribonucleic acid.

Codon 832 833 834 **835** 836 837 838 839 840 841 842 843
D835Y Leu Ala Arg Tyr Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val
 5` TTG GCT CGA IAT ATC ATG AGT GAT TCC AAC TAT GTT 3`

Abbildung 6: Schematische Darstellung der D835Y-Mutation in der Nukleotid-Sequenz mit Austausch des ersten Nukleotids G durch T (fettgedruckt und unterstrichen). Dadurch kommt es zu einem Aminosäure-Wechsel von Aspartat zu Tyrosin (unterstrichen).

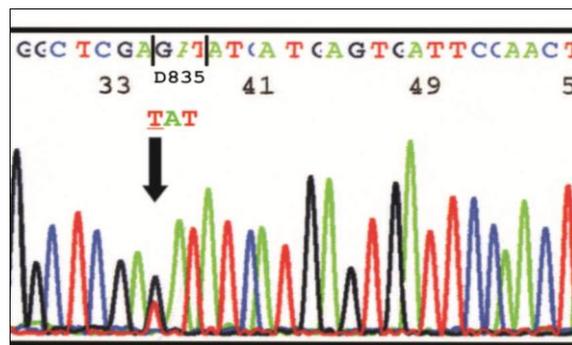


Abbildung 7: DNA-Sequenz eines AML-Patienten mit Mutation im Codon D835. Hier erfolgte die Substitution des ersten Nukleotids G durch T. Dies führt zu einer veränderten Proteinzusammensetzung der TK2-Domäne des *FLT3*-Rezeptors. Da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, erscheint neben dem mutierten Allel auch jeweils ein unverändertes Allel. Deshalb erscheint in der Abbildung neben dem mutierten rote Gipfel auch der normale schwarze Gipfel.
 Abkürzungen: DNA, desoxyribonucleic acid; AML, Akute myeloische Leukämie; TK2, Tyrosinkinase 2.

Codon 832 833 834 **835** 836 837 838 839 840 841 842 843
D835H Leu Ala Arg His Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val
 5` TTG GCT CGA CAT ATC ATG AGT GAT TCC AAC TAT GTT 3`

Abbildung 8: Schematische Darstellung der D835H-Mutation in der Nukleotid-Sequenz mit Austausch des ersten Nukleotids G durch C (fettgedruckt und unterstrichen). Dadurch kommt es zu einem Aminosäure-Wechsel von Aspartat zu Histidin (unterstrichen).

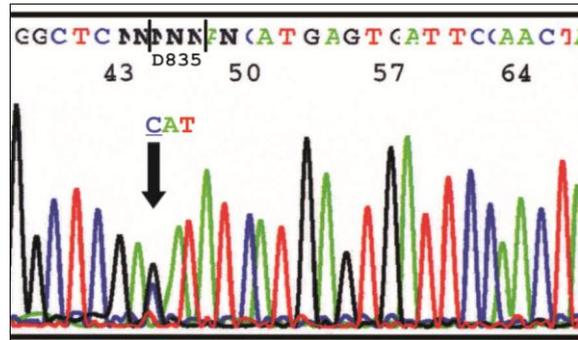


Abbildung 9: DNA-Sequenz eines AML-Patienten mit Mutation im Codon D835. Hier erfolgte die Substitution des ersten Nucleotides G durch C. Durch Vorliegen eines heterozygoten Mutationstypes erscheint neben der unveränderten schwarzen Kurve (Nucleotid G) auch das veränderte Nucleotid C (blaue Kurve) in der Abbildung. Das schwarze N in der Nucleotidsequenz entspricht hier einem nicht erkannten Nucleotid des computergestützten Sequenzanalyseprogrammes. Abkürzungen: DNA, desoxyribonucleic acid; AML, Akute myeloische Leukämie.

Codon 832 833 834 **835** 836 837 838 839 840 841 842 843
D835E Leu Ala Arg Glu Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val
 5` TTG GCT CGA **GAG** ATC ATG AGT GAT TCC AAC TAT GTT 3`

Abbildung 10: Schematische Darstellung der D835E-Mutation in der Nucleotid-Sequenz mit Austausch des letzten Nucleotids T durch G (fettgedruckt und unterstrichen). Dadurch kommt es zu einem Aminosäure-Wechsel von Aspartat zu Glutamat (unterstrichen).

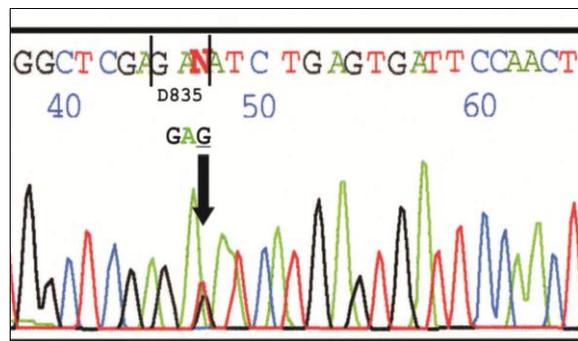


Abbildung 11: DNA-Sequenz mit Mutation im Codon D835. Es erfolgte die Substitution des letzten Nucleotids T durch G. Auch hier liegt eine heterozygote Mutation vor. Neben der regulären roten Kurve (steht für das Nucleotid T) erscheint das auf einem Allel veränderte Nucleotid G, als schwarze Kurve graphisch dargestellt. Abkürzung: DNA, desoxyribonucleic acid.

Codon 832 833 834 **835** 836 837 838 839 840 841 842 843
D835V Leu Ala Arg Val Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val
 5` TTG GCT CGA **GTT** ATC ATG AGT GAT TCC AAC TAT GTT 3`

Abbildung 12: Schematische Darstellung der D835V-Mutation in der Nukleotid-Sequenz mit Austausch des mittleren Nukleotids A durch T (fettgedruckt und unterstrichen). Dadurch kommt es zu einem Aminosäure-Wechsel von Aspartat zu Valin (unterstrichen).

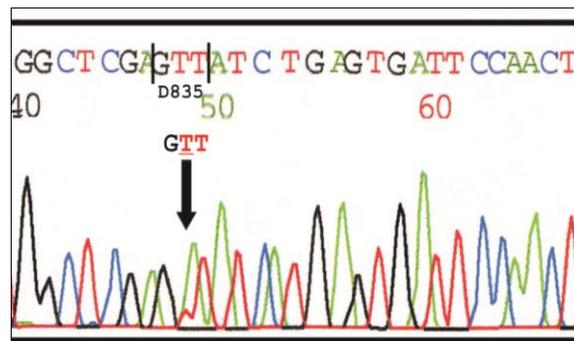


Abbildung 13: DNA-Sequenz mit Mutation im Codon D835. Es erfolgte die Substitution des mittleren Nukleotides A durch T. Neben der unveränderten grünen Kurve (Nukleotid A) erscheint schwach die für das Nukleotid T stehende rote Kurve. Abkürzung: DNA, desoxyribonucleic acid.

3.3.1.1 Vergleich der Ergebnisse der direkten Sequenzanalyse für Exon 20 mit den Ergebnissen der D835-Mutation mittels Restriktionsenzymverdau

Nach Entblindung der Daten aus der Eco RV-Restriktionsanalyse zeigte sich in 11 der insgesamt 319 untersuchten Patientenproben eine Diskrepanz bezüglich des D835-Mutationsstatus. In allen 11 Patientenproben konnte mittels Restriktionsenzymverdau definitiv eine D835-Mutation nachgewiesen werden. Mittels direkter Sequenzierungsmethode war diese D835-Mutation jedoch nicht nachweisbar. Alle 11 diskrepanten Fälle wurden bezüglich Sequenzierung und Restriktionsverdau reevaluiert.

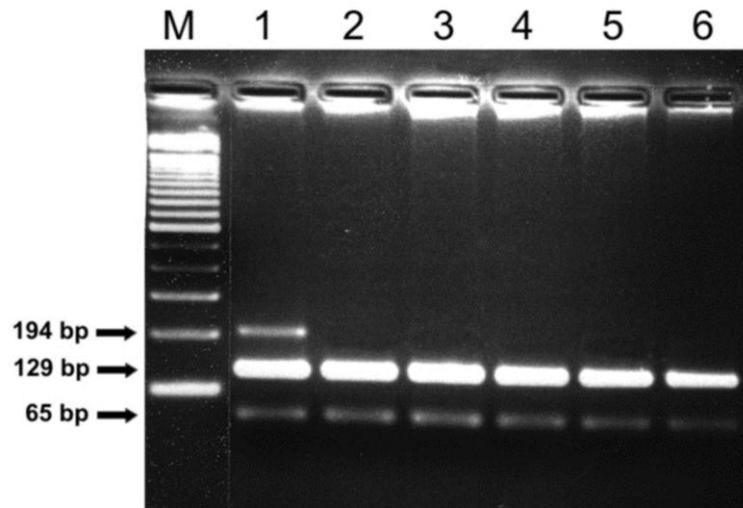


Abbildung 14: Identifizierung einer *FLT3*-D835-Mutation bei Patienten mit normalem Karyotyp mittels Eco RV-Restriktionsverfahren. Nach Amplifikation des Exon 20 mittels PCR und anschließendem Verdau mit Eco RV wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Bei Vorliegen einer D835-Mutation (Fall 1) erschienen nach der Elektrophorese neben den beiden verdauten Fragment-Teilen (129 bp und 65 bp) zusätzlich ein unverdautes, vom mutierten Allel stammendes Fragment mit einer Länge von 194 bp. In den Fällen 2 bis 6 liegt jeweils ein WT für die D835-Mutation vor. In den 11 diskrepanten Fällen war, wie in diesem Beispiel, eine eindeutige Identifizierung des D835-Mutationstatus möglich. Abkürzungen: bp, Basenpaare; M, 100 bp-Längenstandard; PCR; polymerase chain reaction; WT, Wildtyp.

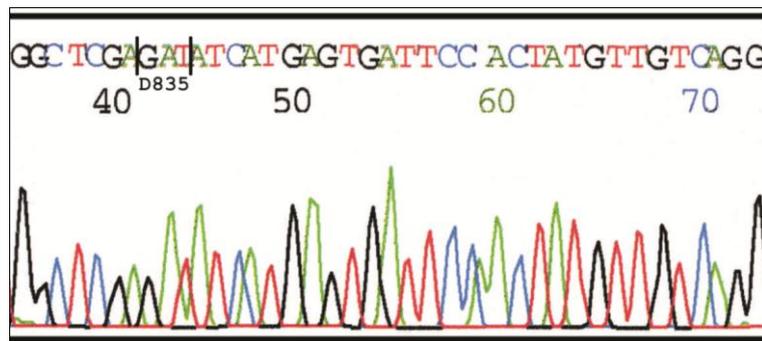


Abbildung 15: DNA-Sequenz eines Patienten mit normalem Karyotyp und Nachweis einer D835-Mutation bei positivem Ergebnis im Eco RV-Restriktionsverfahren. Die Nukleotidsequenz zeigt jedoch einen WT für das Codon D835. Abkürzungen: DNA, desoxyribonucleic acid; WT, Wildtyp.

Tabelle 1: Darstellung aller 11 diskrepanten Fälle, für die sich im Restriktionsverdau ein positiver D835-Mutationsstatus, jedoch in der Sequenzanalyse ein negativer D835-Mutationsstatus ergab, sowie Angaben zur Art des verwendeten Materials mit Angabe der Blasten im Knochenmark (KM, hier rot markiert) und im peripheren Blut (PB, hier gelb markiert).
Abkürzung: k.A., keine Angabe.

Patienten- Nummer	Verwendetes Material Enzymverdau Eco RV	Verwendetes Material Sequenzanalyse	Blastenanteil PB	Blastenanteil KM
1	PB	PB	35 %	/
2	PB	KM	29 %	71 %
3	PB	KM	52 %	52 %
4	KM	KM	/	50 %
5	KM	KM	/	90 %
6	KM	PB	82 %	80 %
7	KM	PB	77 %	90 %
8	KM	KM	/	90 %
9	KM	KM	/	85 %
10	KM	KM	/	k. A.
11	KM	KM	/	51 %

3.3.2 Weitere Mutationen im Exon 20 von *FLT3*

3.3.2.1 D839-Mutation

In einem Fall (0,3 %) konnte eine D839-Mutation beschrieben werden. Diese ist bereits publiziert. Codon D839 entspricht in der *FLT3*-cDNA-Sequenz den Nukleotiden 2572 bis 2574. Es wurde das zweite Nukleotid A gegen G (A>G) ersetzt. Dies bewirkte eine veränderte AS-Konfiguration von Aspartat zu Glycin (D839G). Es handelt sich hierbei um eine heterozygote Mutation.

Codon 832 833 834 835 836 837 838 **839** 840 841 842 843
D839G Leu Ala Arg Asp Ile Met Ser Gly Ser Asn Tyr Val
5` TTG GCT CGA GAT ATC ATG AGT **GGT** TCC AAC TAT GTT 3`

Abbildung 16: Schematische Darstellung der D839G-Mutation in der Nukleotid-Sequenz mit Austausch des mittleren Nukleotids A durch G (fettgedruckt und unterstrichen). Dadurch kommt es zu einem Aminosäure-Wechsel von Aspartat zu Glycin (unterstrichen).

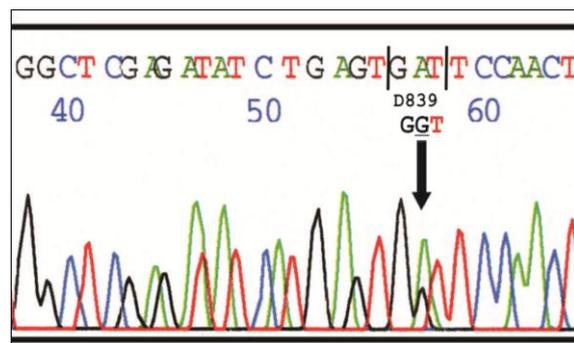


Abbildung 17: DNA-Sequenz mit Mutation im Codon D839. Es erfolgte die Substitution des mittleren Nukleotides A durch G. Da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, erscheint neben der unveränderten grünen Kurve (Nukleotid A) schwach die für das Nukleotid G stehende schwarze Kurve.

Abkürzung: DNA, desoxyribonucleic acid.

3.3.2.2 Y842-Mutation

Des Weiteren wurde in einem Fall (0,3 %) eine bereits bekannte Mutation erfasst, die Codon Y842 betrifft und in der *FLT3*-cDNA-Sequenz den Nukleotiden 2581 bis 2583 entspricht. Hierbei handelt es sich um eine Substitution des zweiten Nukleotids A von Codon Y842 durch G (A>G) und erzeugt dadurch ein AS-Wechsel von Tyrosin zu Cystein (Y842C). Dieser Patient trägt gleichzeitig auch eine D835Y-Mutation. Beide Mutationen sind heterozygot.

```

Codon 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843
D842C Leu Ala Arg Tyr Ile Met Ser Asp Ser Asn Cys Val
5`   TTG GCT CGA TAT ATC ATG AGT GAT TCC AAC TGT GTT 3`
  
```

Abbildung 18: Schematische Darstellung der D842C-Mutation in der Nukleotid-Sequenz mit Austausch des mittleren Nukleotids A durch G (fettgedruckt und unterstrichen). Dadurch kommt es zu einem Aminosäure-Wechsel von Tyrosin zu Cystein (unterstrichen) im Codon D842. Dieser Patient trägt gleichzeitig die bekannte D835Y-Mutation mit Austausch des ersten Nukleotides G durch T, resultierend in dem Aminosäure-Wechsel von Aspartat zu Tyrosin.

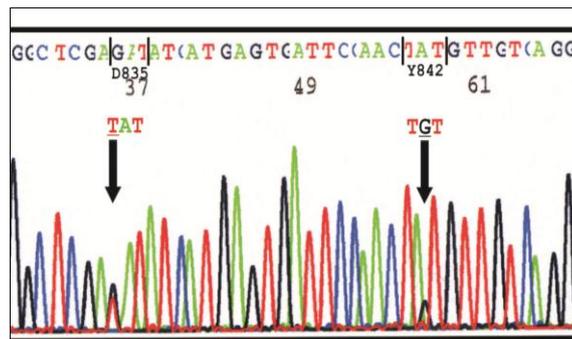


Abbildung 19: DNA-Sequenz eines AML-Patienten mit 2 Mutationen, eine Mutation im Codon D835 und die andere im Codon D842. In Codon D835 erfolgte die Substitution des ersten Nukleotides G durch T. Da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, erscheint neben der unveränderten schwarzen Kurve (Nukleotid G) die für das Nukleotid T stehende rote Kurve. In Codon D842 kam es auf dem mutierten Allel zu einem Austausch des mittleren Nukleotides A (hier grüne Kurve). Anstelle des Nukleotides steht nun das Nukleotid G (hier schwarze Kurve). Da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, erscheinen sowohl das mutierte (schwarze Kurve) als auch das unmutierte Allel (grüne Kurve).

Abkürzungen: DNA, desoxyribonucleic acid; AML, Akute myeloische Leukämie.

3.3.2.3 Deletion 836I

Codon 836 entspricht den Nukleotidnummern 2563 bis 2565 der *FLT3*-cDNA-Sequenz und ist codierend für die AS Isoleucin. Die Mutation im Codon 836 unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Mutationstypen. Es handelte sich dabei nicht um eine Punktmutation, sondern um eine Deletion des Codon 836. Hierbei kommt es zu einem Verlust des kompletten Codon 836, wodurch das Leseraster nicht verschoben wird. Die komplette AS-Sequenz wurde, abgesehen vom Verlust einer AS, regelrecht codiert. Da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, wird die AS-Sequenz nur auf dem mutierten Allel um eine AS verkürzt codiert. Das unmutierte Allel zeigt hingegen die normale AS-Sequenz (normale AS-Sequenz siehe Abb. 4). In der Sequenzanalyse imponiert diese Deletion mit „Doppelpeaks“ ab der Deletion. Diese Mutation ist mittels Eco RV-Restriktionsverfahren erkennbar, da die Erkennungssequenz für Eco RV neben der Nukleotidsequenz des Codon 835 auch die Basenabfolge des Codon 836 beinhaltet. Eine Veränderung des Codon 836, bzw. deren Fehlen, führt zu einer Bindungshinderung für Eco RV, als Folge kann das Enzym seine spezifische Schnittstelle nicht erkennen und kann die DNA nicht in zwei Fragmente schneiden. Diese Deletion 836I konnte bei einem Patienten (0,3 %) identifiziert werden.

Codon	832	833	834	835	837	838	839	840	841	842	843	
<u>Del836I</u>	Leu	Ala	Arg	Asp	<u>Met</u>	<u>Ser</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Val</u>	
5`	TTG	GCT	CGA	GAT	<u>ATG</u>	<u>AGT</u>	<u>GAT</u>	<u>TCC</u>	<u>AAC</u>	<u>TAT</u>	<u>GTT</u>	3`

Abbildung 20: Schematische Darstellung der Deletion 836. Das komplette Codon 836 ging verloren, nachfolgende Aminosäure-Sequenz wurde regelrecht codiert, da es zu keiner Verschiebung des Leserasters kam.

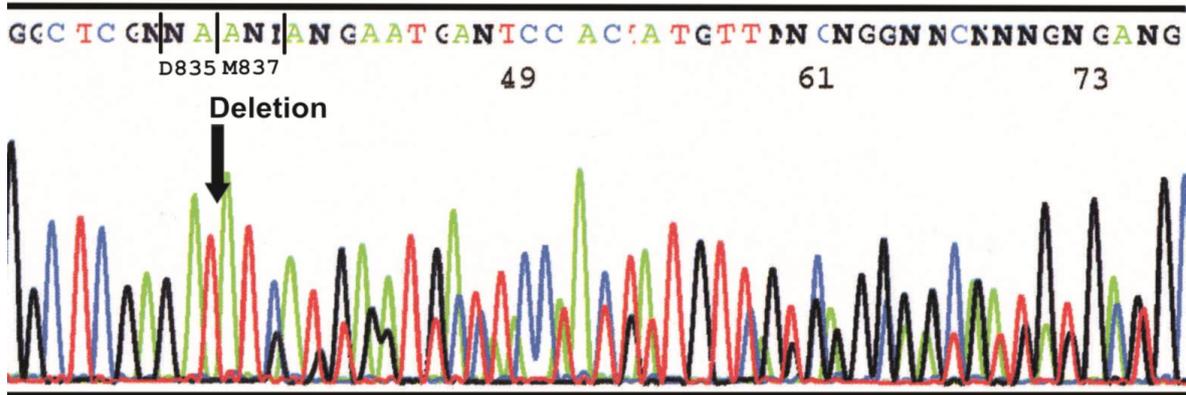


Abbildung 21: DNA-Sequenz eines AML-Patienten mit normalem Karyotyp und einer Deletion 836I. Da Codon 836 und 837 zufällig beide an erster Stelle das Nukleotid A und an mittlerer Stelle das Nukleotid T stehen haben, erscheint der erste „Doppelpeak“ erst ab dem dritten Nukleotid in Codon 837. Als Ausdruck dieser heterozygoten Mutation erscheint dieser Doppelpeak, weil auf dem anderen Allel die unveränderte Nukleotid-Sequenz dargestellt wird, und auf dem mutierten Allel die Nukleotid-Sequenz ohne Codon 836 dargestellt wird.

Abkürzungen: DNA, desoxyribonucleic acid; AML, Akute myeloische Leukämie.

3.3.2.4 R834-Mutation

In einem Fall (0,3 %) konnte eine bisher noch nicht beschriebene heterozygote Punktmutation im Codon 834 gefunden werden. Codon R834 entspricht in der *FLT3*-cDNA-Sequenz den Nukleotiden 2557 bis 2559. Hierbei handelt es sich um eine Substitution des zweiten Nukleotides G zu A (G>A). Dieser Austausch bewirkt einen AS-Wechsel von Arginin zu Glutamin (R834Q). Diese Mutation kann mittels Eco RV-Restriktionsverfahren nicht erfasst werden. Wildtyp siehe Abb.4.

Codon 832 833 **834** 835 836 837 838 839 840 841 842 843
R834Q Leu Ala Gln Asp Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val
 5` TTG GCT **CAA** GAT ATC ATG AGT GAT TCC AAC TAT GTT 3`

Abbildung 22: Schematische Darstellung der R834Q-Mutation in der Nukleotid-Sequenz mit Austausch des mittleren Nukleotids G durch A (fettgedruckt und unterstrichen). Dadurch kommt es zu einem Aminosäure-Wechsel von Arginin zu Glutamin (unterstrichen).

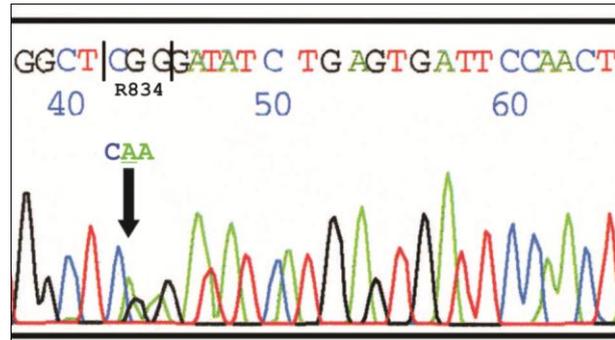


Abbildung 23: DNA-Sequenz mit Mutation im Codon R834. Es erfolgte die Substitution des mittleren Nukleotides G durch A. Auch hier liegt eine heterozygote Mutation vor. Neben der regulären schwarzen Kurve (steht für das Nukleotid G) erscheint das auf einem Allel veränderte Nukleotid A, als grüne Kurve graphisch dargestellt.
Abkürzung: DNA, desoxyribonucleic acid.

3.3.2.5 Deletion 837M

Eine neu beschriebene Deletion betrifft Codon 837, das normalerweise Methionin codiert. Codon 837 entspricht den Nukleotidnummern 2566 bis 2568. Auch hier kam es zu einem Verlust des gesamten Triplet-Codon 837. Durch die Deletion kam es ebenfalls zu keiner Verschiebung des Leserasters und alle nachfolgenden AS wurden normal codiert. Die resultierende komplette AS-Sequenz ist um eine AS kürzer. Diese Deletion 837M konnte bei einem Patienten (0,3 %) nachgewiesen werden.

Codon	832	833	834	835	836	838	839	840	841	842	843
<u>del837M</u>	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	<u>Ser</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Val</u>
5`	TTGGCT	CGA	GAT	ATC	<u>AGT</u>	<u>GAT</u>	<u>TCC</u>	<u>AAC</u>	<u>TAT</u>	<u>GTT</u>	3`

Abbildung 24: Schematische Darstellung der Deletion 837. Das komplette Codon 837 ging verloren, nachfolgende Aminosäure-Sequenz wurde normal codiert, da es zu keiner Verschiebung des Leserasters kam.

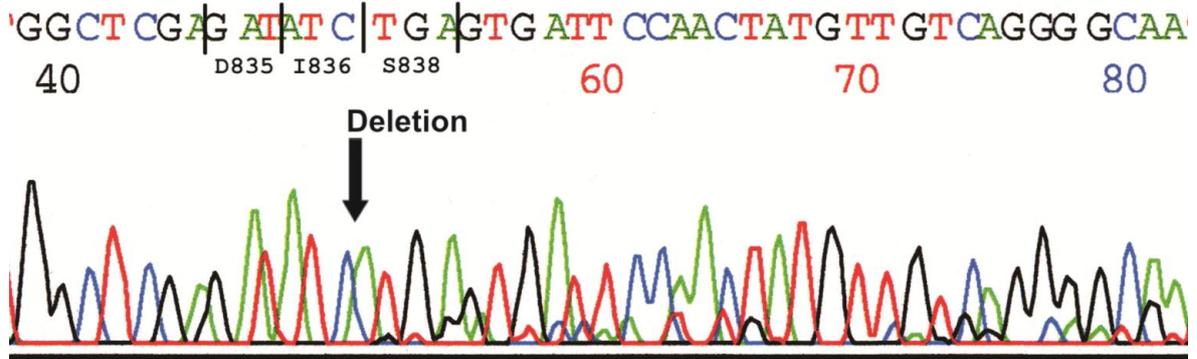


Abbildung 25: DNA-Sequenz eines AML-Patienten mit normalem Karyotyp und einer Deletion M837. Bereits ab dem ersten Nukleotid des Codon 838 erscheinen die „Doppelpeaks“ als Ausdruck der heterozygoten Mutation. Neben der unmutierten Sequenz wird eine Nukleotid-Sequenz ohne Codon 837 abgebildet.
 Abkürzungen: DNA; desoxyribonucleic acid; AML, Akute myeloische Leukämie.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 319 Patienten mit normalem Karyotyp untersucht. Hierbei lag bei 23 Patienten (entspricht 7,2 %) eine klassische D835-Mutation vor. Neben der klassischen D835-Mutation fand sich bei einem Patienten (entspricht 0,3 %) eine Del836-Mutation. Beide Mutationstypen können auch mit der Restriktionsverdau-Analyse nachgewiesen werden und wurde somit für den direkten Vergleich mit dieser Methode herangezogen: Beim Abgleich des mittels Eco RV Verdau ermittelten Mutationsstatus mit der Sequenzanalyse zeigte sich eine Diskrepanz bei 11 der 319 untersuchten Patienten (11 Patienten entsprechen 3,4 % der Gesamtpopulation). In diesen 11 Fällen lag mittels Restriktionsverdau eine D835-Mutation vor, die mittels direkter Sequenzanalyse nicht detektiert werden konnte. Unter Berücksichtigung der zusätzlichen Daten aus dem Restriktionsverdau liegt die eigentliche Inzidenz der D835-Mutation in der von uns untersuchten Kohorte mit 319 Patienten bei 34 Patienten, dies entspricht 10,65 % (23 Patienten wurden mittels Sequenzanalyse detektiert; 11 zusätzlich durch den Restriktionsverdau). Hinsichtlich der Sensitivität unterliegt somit die Methode der Sequenzanalyse der Restriktionsenzymanalyse.

Über das Codon 835 hinaus konnten mittels Sequenzanalyse zusätzliche Mutationen im Exon 20 nachgewiesen werden. In einem Fall (0,3 %) konnte die D839G-Mutation nachgewiesen werden. Hierbei kam es zu einem Austausch der Aminosäure Aspartat zu Glycin. In einem weiteren Fall (0,3 %) konnte die Y842C-Mutation nachgewiesen werden. Hierbei kam es zu einem AS-Wechsel von Tyrosin zu Cystein. Beide Mutationen sind bereits in zahlreichen Arbeiten vorbeschrieben und publiziert. Sie stellen somit keine neu entdeckten Mutationen dar. Darüber hinaus konnten mittels Sequenzanalyse zwei bislang nicht publizierte Mutationen identifiziert werden. Hierbei handelt es sich in einem Fall (0,3 %) um eine Deletion 837, hierbei kam es zu einem Verlust des gesamten Codon 837 mit daraus resultierender verkürzter Aminosäuresequenz (Del837M). Im zweiten Fall (0,3 %) zeigte sich eine heterozygote Punktmutation im Codon 834. Dies bewirkte ein AS-Wechsel von Arginin zu Glutamin (R834Q). Mit der oben bereits beschriebenen und ebenfalls bereits bekannten und publizierten Deletion 836 konnten durch Anwendung der Sequenzanalyse neben den bekannten D835-Mutationen insgesamt 5 weitere Mutationen (teils bekannt, teils neu beschrieben)

im Bereich des Exon 20 des *FLT3* identifiziert werden, wobei 4 (1,2 %) davon nur mit Hilfe der Sequenzanalyse nachweisbar waren.

4. DISKUSSION

Mutationen des *FLT3*-Gens spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der AML und haben einen großen Einfluss auf die prognostische Bedeutung. Sie besitzen ebenso eine therapeutische Relevanz. Im *FLT3*-Gen gibt es neben der häufig beschriebenen Internen Tandemduplikation (ITD) auch die Tyrosinkinasedomäne (TKD) Mutationen. Beides sind aktivierende Mutationen.

Die ITD liegt im Exon 14 und durch das Einfügen von internen Genduplikationen kommt es zur Aufhebung der autoinhibitorischen Funktion der juxtamembranären Domäne von *FLT3*. Der Aktivierungs-Loop ist normalerweise für die Stabilisierung der Kinase und ihre inaktive Konfiguration verantwortlich. Durch die *FLT3*-ITD wird nun die Interaktion zwischen der juxtamembranären Domäne und dem Aktivierungs-Loop zerstört und das aktive Zentrum des Proteins wird frei. Dadurch kann vermehrt ATP und Substrat im aktiven Zentrum gebunden werden, was zu einer Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen wie z.B. von Ras, MAPK und STAT5 führt (Kiyoe et al. 2002, Griffith et al. 2004). Des Weiteren führt die Anwesenheit einer *FLT3*-ITD zu einer Suppression von c/EBP α und PU.1. Diese beiden Proteine spielen in der myeloiden Differenzierung eine wichtige Rolle.

Die TKD-Mutation liegt im Exon 20, das für die Codierung der Aktivierungsschleife verantwortlich ist. Bei der TKD-Mutation kommt es in der Regel zu einem Austausch eines einzelnen Nukleotids (Punktmutation) und dadurch zu einer Änderung der Aminosäure-(AS)sequenz. Durch die TKD-Mutation verändert sich die Konfiguration der Aktivierungsschleife in ähnlicher Weise, wie dies durch die Liganden-induzierte Konformationsänderung zustande kommt. Die TKD-Mutation ist jedoch nicht wie *FLT3*-ITD in der Lage, die STAT5-Targetgene zu aktivieren. Auch führt eine TKD-Mutation nicht wie die *FLT3*-ITD zu einer Suppression von c/EBP α und PU.1 (Choudhary et al. 2005).

Somit resultieren die unterschiedlichen Mutationstypen und die unterschiedlichen Mutationsmechanismen von ITD und TKD zwar in einer Aktivierung des *FLT3*-Rezeptors, jedoch führen sie letztendlich zu unterschiedlichen *downstream-signalling-pathways*. In vivo werden diese unterschiedlichen Effekte auf *downstream targets* durch die Ausbildung unterschiedlicher Maus-Phänotypen belegt. Bislang unklar ist, ob neben der typischen D835-Mutation in der TKD2-

Domäne von *FLT3* noch weitere Mutationen lokalisiert sind, die in Analogie zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von *FLT3* und den nachgeschalteten Signalwegen führen.

Ziel der Arbeit war es, neben den bereits beschriebenen TKD-D835-Mutationen noch weitere Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne II im Exon 20 zu identifizieren. Deshalb erfolgte die molekulargenetische Untersuchung einer großen Kohorte von 319 Patienten mit normalem Karyotyp aus der HD98A-Studie mittels PCR und anschließender direkter Sequenzierung des Exon 20. Es sollte die Prävalenz der bereits beschriebenen TKD-D835-Mutation bestätigt und weitere Mutationen aufgesucht werden. In der vorliegenden Arbeit fanden sich mittels Sequenzanalyse in 7,2 % der Fälle D835-Mutationen. Diese Inzidenz ist im Vergleich zu bereits vorliegenden Arbeiten z.B. von Abu-Duhier et al. 2001 nahezu identisch; in dieser Arbeit lag die Inzidenz bei 7,2 %. In der vorliegenden Arbeit fand sich auch hier am häufigsten die D835Y-Mutation. Berücksichtigt man jedoch alle Daten, d.h. sowohl die Ergebnisse der Sequenzanalyse als auch die Ergebnisse des Restriktionsverdau, so liegt die Inzidenz der D835-Mutation in der untersuchten Kohorte bei 10,6 %. Auch hierzu finden sich vergleichbare Daten in der Literatur. Shih et al. 2004 wies in der untersuchten Patientengruppe bei 10,8 % der Patienten eine D835-Mutation nach, auch hier war die D835Y-Mutation die häufigste Mutation. Die von Smith et al. 2005 mit 1,7 % beschriebene D839-Mutation fand sich in der vorliegenden Arbeit nur in 0,3 % der Fälle, obwohl in der vorliegenden Arbeit eine größere Patientenkohorte untersucht wurde (319 Patienten vs. 175 Patienten bei Smith et al.). Die ebenfalls bereits beschriebene D842-Mutation fand sich bei Smith et al. 2005 wie bei uns auch in 0,3 % der Fälle (Smith et al. 0,57 %). Jedoch handelt es sich bei Smith et al. um eine Y842H-Mutation. Diese konnten wir nicht nachweisen. In einer Arbeit von Kindler et al. 2005 wurde in 1,8 % der Fällen eine Y842C-Mutation detektiert. Dies entspricht derselben Mutation, die auch wir detektierten. Die von Scholl et al. 2005 beschriebene Deletion 836 zeigten sich wie auch bei uns nur bei einem sehr geringen Anteil der Fälle (0,8 % bei Scholl et al. vs. 0,3 % in unserer Kohorte). Zu den beiden jeweils in einem Fall neu detektierten Mutationen R834Q und Del837 können keine weiteren Aussagen bezüglich der Inzidenz getroffen werden, da

diese noch nicht in der Literatur publiziert wurden. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die beiden Methoden, d.h. die klassische Sequenzierung von Exon 20 und die Methode der Restriktionsenzymanalyse, miteinander zu vergleichen. Es zeigte sich, dass mittels klassischer Sequenzanalyse in 3,4 % der Fälle (entspricht den 11 diskrepanten Fällen) die D835-Mutation nicht erkannt wurde. Die eigentliche Inzidenz der D835-Mutation in dieser Kohorte lag bei 10,6 % (entspricht 34 Patienten, die mittels Restriktionsenzymverdau eine D835-Mutation aufwiesen). Somit wird deutlich, dass die Sequenziermethode durch ihre geringere Sensitivität der Restriktionsenzymmethode unterlegen ist. Jedoch konnten durch die Sequenzierungsmethode 4 weitere Mutationen (jeweils ein Fall: Y842, R834, Del837 und D839; entspricht 1,25 % der Gesamtkohorte) im Exon 20 identifiziert werden. Diese Mutationen sind jedoch insgesamt sehr selten. Aufgrund der geringeren Sensitivität für den Nachweis der häufigsten *FLT3*-TKD-835-Mutation und der geringen Inzidenz von weiteren Mutationen im Exon 20, die nicht mittels Restriktionsverdau-Analyse nachgewiesen werden können, ist die Sequenzierungsmethode als Screeningverfahren zum Nachweis von *FLT3*-TDC Mutationen nicht geeignet.

4.1 Diskrepanz bezüglich Detektierbarkeit der D835-Mutation im Restriktionsanalyseverfahren und in der direkten Sequenzanalyse

Alle HD98A-Studienpatienten sind im Rahmen der Studie auf das Vorliegen einer D835-Mutation mittels PCR und Restriktionsenzymverfahren untersucht worden. Die Ergebnisse aus dieser Analyse standen zum Vergleich mit den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit mittels Sequenzanalyse generiert wurden, zur Verfügung.

In 11 Fällen, die im Restriktionsverfahren eine D835-Mutation aufwiesen, konnte die Mutation in der Sequenzanalyse nicht detektiert werden. Da mit beiden Methoden vergleichbares Patientenmaterial verwendet wurde, liegt die Ursache für die schlechtere Nachweisbarkeit der D835-Mutation nicht an der Art und Qualität des Untersuchungsmaterials, sondern an der Methode selbst (siehe Tab.1). In einer Arbeit von Thiede et al. 2006 konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze für eine Mutation mittels Sequenzanalyse bei ca. 10-20 % des

gesamten mutierten Allels liegt. Das entspricht einer Ratio von 0,1 bis 0,2. Dies bedeutet, man benötigt einen Anteil von mindestens 10-20 % mutierter Zellen, damit eine Darstellung mittels Sequenzanalyse noch möglich ist. Da es sich bei der D835-Mutation um eine heterozygote Mutation handelt, und somit der Wildtyp immer noch vorhanden ist, benötigt man einen Blastenanteil von ca. 20-40 % der mutierten Zellen, um einen Nachweis der D835-Mutation mittels Sequenzanalyse zu erzielen. Für den Restriktionsenzymverdau zeigten sich hingegen in anderen Assays (Murphy et al. 2003) bereits bei Vorliegen von 5-10 % des mutierten Allels in Bezug auf das Gesamttellel ein Nachweis der D835-Mutation in der Gelelektrophorese. Dies ergibt eine Ratio von 0,05. Somit ist im Restriktionsenzymverdau nur ein Blastenanteil von ca. 10 % mutierter Zellen zum Nachweis der D835-Mutation nötig.

Da die Spezifität des Assays für den Restriktionsenzymverdau sehr hoch ist, eben weil das Enzym eine spezifische Schnittstelle erkennt, kann im Gegensatz dazu die Sequenzanalyse mit einer eher niedrigeren Spezifität die Restriktionsenzymverdaumethode nicht überbieten.

4.2 Gegenüberstellung der D835-Mutationsanalyseverfahren mittels Restriktionsverfahren und direkter Sequenzierung bezüglich Sensitivität und Spezifität

Anhand dieser 11 mittels Sequenzanalyse nicht detektierten Fälle wird deutlich, dass die Sequenzierung im Hinblick auf die Sensitivität dem Restriktionsverfahren deutlich unterlegen ist. Die Sensitivität ist hierbei von verschiedenen Faktoren abhängig: Zum einen ist das verwendete Material bzw. der Anteil der Blasten im verwendeten Material von Bedeutung. Aber auch hier gibt es wiederum Aspekte, die beachtet werden müssen, da selbst bei hohem Blastenanteil im KM die D835-Mutation durch die Sequenzierung nicht immer sicher erfasst werden kann. Umgekehrt existieren Fälle mit niedrigerem Blastenanteil, die trotz Verwendung der Sequenzanalyse die Mutation nachweisen konnten. Entscheidend hierfür ist, ob die Mutation in einem Klon oder Subklon vorliegt. In der Arbeit von Shih et al. 2004 wurde gezeigt, dass Patientenproben mit hohem Blastenanteil nur in einer kleinen Fraktion der Leukämiezellen die D835-Mutation aufwiesen.

Möglicherweise war in den 3 Fällen, in denen PB für die Sequenzierung verwendet wurde, die TKD-Mutation nur in einem Subklon vorhanden.

Ein bedeutender Nachteil der Sequenzanalyse liegt darin, dass es bei der klassischen Sequenzierung immer zu Überlagerungen der mutierten Sequenz und der Sequenz des Wildtyps kommt, sofern nicht eine homozygote Mutation vorliegt. Je nachdem wie stark die mutierte Sequenz repräsentiert ist, kann dies evtl. zu einem Nichterkennen der Mutation führen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die hohe Spezifität, die durch das Restriktionsverfahren erreicht wird, da hier ganz spezifisch die Nukleotid-Sequenz 'GATATC', die im Codon 835 liegt, erkannt wird. So wird verständlich, dass auch bei Proben mit nur geringem Blastenanteil oder bei Vorliegen von Subklonen, das Restriktionsverfahren eine D835-Mutation sensitiver erkennen kann als die Sequenzanalyse. Ein Nachteil des Restriktionsverfahrens ist, dass keine weiteren Mutationen im Exon 20 erfasst werden können. Selbst die neu gefundene R834Q-Mutation, die in enger Lokalisation zum Codon 835 liegt, wird durch das Restriktionsverfahren nicht erfasst. Da aber die anderen Mutationen im Exon 20 nur sehr selten vorkommen (1,25 %) und die häufige D835-Mutation mittels Restriktionsverfahren sehr zuverlässig erkannt wird, sollte diese Methode für den diagnostischen Nachweis von TKD-Mutationen eingesetzt werden.

4.3 Punktmutationen im Exon 20 des *FLT3*-Gens: Häufigkeiten, strukturelle und funktionelle Aspekte

Von den insgesamt 319 untersuchten AML-Patienten mit normalem Karyotyp zeigte sich mittels Sequenzanalyse in 23 Fällen (7,2 %) eine Mutation im *FLT3*-Codon 835. Mittels Restriktionsverfahren lag bei 34 Patienten (10,6 %) eine *FLT3*-D835-Mutation vor. Die Inzidenz von D835-Mutationen in der Patientengruppe, die mittels Sequenzanalyse untersucht wurde lag somit niedriger als die der mittels Restriktionsverfahren identifizierten Patientengruppe. Die Inzidenz, die mit der Sequenzanalysemethode ermittelt wurde, ist nahezu identisch mit den Ergebnissen aus anderen Studien, jedoch beziehen sich die Daten der anderen Studien auf alle AML's, also ohne Bezug auf zytogenetisch definierte Subgruppen (Abu-Duhier et al. 2001 b 7,2 %; Yamamoto et al. 2001 7 %; Jiang et al. 2004 7 %,

Bacher et al. 2008 6 %). Eine genauere Untersuchung der AML mit zytogenetisch normalen Karyotyp erfolgte in diesen Studien nicht.

In einer Arbeit von Fröhling et al. 2002 wurden AML-Patienten mit normalem Karyotyp auf Mutationen im Exon 20 mittels Restriktionsverfahren untersucht. Da die TKD-Mutation im Wesentlichen bei normal karyotypen AML's vorkommt, lag die Inzidenz bezüglich einer D835-Mutation höher (14 %) als bei den Studien, die keine zytogenetisch definierten Subgruppen untersuchten. Eine mögliche Ursache für die Inzidenzunterschiede zwischen der Fröhling-Studie und der vorliegenden Arbeit könnte darin liegen, da in dieser Arbeit eine gewisse Patientenselektion vorgenommen wurde, da z.B. nur Patienten untersucht wurden, bei denen zum Zeitpunkt der Durchführung der Sequenzanalyse genügend Patientenmaterial vorlag. Ein erneutes Gewinnen von fehlendem Patientenmaterial erfolgte nicht. Auch wurden nur Patienten untersucht, bei denen bereits eine *FLT3*-D835-Mutation mittels herkömmlicher PCR und Restriktionsenzymverdau nachgewiesen war.

Folgende Mutationen im Codon D835 wurden in dieser Arbeit mittels Sequenzanalyse ermittelt: Am häufigsten konnte die klassische D835Y-Mutation mit 13 von 23 bzw. 34 Patienten, wenn man die Anzahl der tatsächlich vorliegenden Mutationen berücksichtigt, gezeigt werden. Wie viele Patienten von den restlichen 11 diskrepanten Fällen ebenfalls eine D835Y-Mutation aufwiesen, ist nicht bekannt. In fünf weiteren Fällen zeigte sich die D835H-Mutation. Vier Patienten wiesen die D835E-Mutation und ein Fall die D835V-Mutation auf. Somit lag als häufigster Mutationstyp die D835Y Mutation vor, was mit publizierten Daten gut übereinstimmt.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich 4 der 6 bereits durch andere Arbeitsgruppen identifizierten Mutationstypen im Codon 835. Die ebenfalls vorbeschriebenen Mutationen D835A und D835N konnten in diesem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden.

Der exakte Einfluss der *FLT3*-D835-Mutation auf die Transformation myeloischer Zellen ist bislang noch nicht bekannt. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie mitogenes und antiapoptotisches Potential besitzen und möglicherweise zusammen mit Mutationen, welche die Zelldifferenzierung blockieren, an der

Entstehung der AML beteiligt sind. In leukämischen Zellen von AML-Patienten und in Zelllinien humaner Mastzell-Leukämien konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Bereich des Codon D816 des *KIT*-Rezeptors zu einer Aktivierung führen. Dieser Bereich des Codon D816 des *KIT*-Rezeptors entspricht dem Codon D835 des *FLT3*-Gens (Beghini et al. 2000, Furitsu et al. 1993), sodass es aufgrund der sehr ähnlichen Struktur der beiden *KIT* und *FLT3*-Rezeptoren vorstellbar ist, dass die D835-Mutation zu einer Aktivierung des Rezeptors im humanen System führt. Die Arbeit von Yamamoto et al. 2001 macht deutlich, dass die D835-Mutationen in einer Liganden-unabhängigen Autophosphorylierung der *FLT3*-Rezeptoren mit autonomer Proliferation zytokinabhängiger 32D-Zellen resultieren. In der Arbeit von Fenski et al. 2000 wurden Mutationen im korrespondierenden murinen Aspartat-Codon mit einem AS-Austausch im *FLT3*-Rezeptor transferiert. Anschließend zeigten diese 32D-Zelllinien eine Liganden-unabhängige Autophosphorylierung der Rezeptoren und führten zu einer Proliferation von myeloischen 32D-Zelllinien.

Bei einem Patienten (0,3 %) wurden 2 Mutationen im Exon 20 detektiert: Einmal die bereits oben beschriebene D835Y-Mutation und andererseits eine Mutation im Codon 842. Hier resultiert die Punktmutation im Exon 20 in einem Austausch der AS Tyrosin gegen Cystein (Y842C). Diese aktivierende Mutation befindet sich in der gut konservierten Aktivierungsschleife und wurde bereits von Kindler et al. 2005 (Y842C) beschrieben und funktionell untersucht. Zur weiteren funktionellen Aussagekraft der Y842C-Mutation wurden von Kindler et al. 2005 32D-Zellen mit einer *FLT3*-Y842C-Mutation generiert. Diese *FLT3*-Y842C transfizierten 32D-Zellen zeigten eine konstitutive *FLT3*-Tyrosin-Phosphorylierung sowie ein Interleukin 3 (IL-3)-unabhängiges Wachstum. Primäre AML-Blasten, die eine *FLT3*-Y842C-Mutation beinhalten, zeigten eine Tyrosin-Phosphorylierung von STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*). Strukturelle Untersuchungen des Codon Y842 haben aufgezeigt, dass diese Region eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivierungsschleifen-Konformation vom geschlossenen zum offenen (aktiven) Zustand spielt. Da diese Y842C-Mutation ebenso wie die D835-Mutation in der Aktivierungsschleife lokalisiert ist, könnten auch Patienten mit dieser Mutation von einer Therapie mit dem *FLT3*-

Tyrosinkinase-Inhibitor PKC412 profitieren. Bei AML-Patienten, die eine Y842C-Mutation aufweisen, führt eine Behandlung mit PKC412 zu einer Inhibition der Proliferation sowie zur Induktion der Apoptose.

Bei einem weiteren Patienten (0,3 %) wurde die bereits von Smith et al. 2005 beschriebene Mutation im Codon 839 nachgewiesen. In dieser Arbeit zeigte sich eine Häufigkeit der Mutation von 1,7 %. Hierbei erfolgt eine AS-Konfigurationsänderung von Aspartat zu Glycin (D839G). Dieselbe Mutation, mit Wechsel der AS von Aspartat zu Glycin, wurde in dem analogen Codon im *KIT* (D820G) bei einem Patienten mit aggressiver Mastozytose gefunden (Pignon et al. 1997). Die Auswirkung auf die Funktion des *FLT3* ist bisher unbekannt.

In einem weiteren Fall (0,3 %) wurde keine Punktmutation, sondern eine Deletion mit Verlust des Codon 836 detektiert (Del836I). Diese Deletion wurde bereits von Fröhling et al. 2002 und 2005 von Scholl et al. beschrieben. Welche Auswirkung diese Deletion auf die Funktion des *FLT3* hat, ist nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine weitere (0,3 %), neue Deletion gefunden werden. Hierbei kam es wie bei der Deletion 836 zu einem Verlust des ganzen Codons, nämlich des Codons 837 (Del837M). Durch das Restriktionsverfahren mittels Eco RV ist diese Deletion nicht zu erfassen. Die funktionelle und strukturelle Bedeutung dieser Deletion ist bislang nicht untersucht.

Eine weitere, bislang nicht beschriebene Punktmutation im Exon 20 des *FLT3*-Gens, die im Rahmen der Promotionsarbeit gefunden werden konnte, ist die R834Q-Mutation, bei der es zu einem AS-Austausch im Codon 834 von Arginin gegen Glutamat kommt. Von den insgesamt 319 untersuchten Patienten entspricht dies einer Prävalenz von 0,3 %. Diese Mutation liegt außerhalb der spezifischen Schnittstelle des Eco RV und kann somit durch das Standardverfahren nicht erfasst werden. Die funktionelle und strukturelle Auswirkung dieser Mutation auf den *FLT3*-Rezeptor ist bislang nicht bekannt.

Die beiden in dieser Arbeit neu identifizierten Mutationen, nämlich die Deletion 837 (Del837M) und die Punktmutation im Codon 834 (R834Q), sind bislang auf ihre

funktionelle Bedeutung noch nicht untersucht worden. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass diese beiden Mutationen aufgrund der räumlichen Nähe zu Codon 835 ähnliche Auswirkungen haben wie die klassische D835-Mutation.

Wie zu erwarten, zeigte sich in den Kontrollproben von 10 jungen gesunden Probanden keine Mutation in Exon 20. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei den oben diskutierten *FLT3*-Mutationen um Polymorphismen (SNP) handelt.

4.4 Modifizierte Verfahren zur Mutationsanalyse der D835-Mutation im Exon 20 des *FLT3*-Gens

Mittlerweile gibt es neuere und technisch ausgereifere Verfahren zur Detektion einer D835-Mutation. Murphy et al. präsentierten 2003 einen neuen Assay. Bei dieser Methode können die prognostisch relevanten ITD-Mutationen und die D835-Mutation ermittelt werden. Diese Methode beinhaltet die Auftrennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Diese Fragmentanalyse, auch Gene-Scan-Analyse genannt, hat den Vorteil, dass bei Vorliegen einer Mutation die Menge an mutiertem Allel mitbestimmt werden kann. Dies geschieht durch die Bestimmung der „Area under the curve“. Die Bestimmung der D835-Mutation erfolgt, wie bei der bisherigen Standardrestriktionsenzymmethode, durch das Enzym Eco RV. Für die PCR werden markierte Primer verwendet; am forward PCR-Primer (M13F) befindet sich ein fluoreszenzmarkiertes Molekül (TET) am 5`-Ende. Der reverse D835-PCR-Primer wurde dabei so gewählt, dass zusätzlich zur Schnittstelle in der codierenden Sequenz eine artifizielle Erkennungssequenz für Eco RV in den reverse Primer eingebaut wurde. Bei Verwendung dieses Primer-Paares erhält man nach der initialen PCR-Amplifikation ein 150 bp langes Produkt. Liegt nun ein WT des Codons D835 vor, so führt die Digestion mit Eco RV zu einem 80-Basen langen TET-markierten Fragment, zusätzlich entstehen 2 nicht markierte Fragmente mit einer Größe von 51 und 21 bp. Die Detektion erfolgt mittels Kapillarelektrophorese. Eine D835-Mutation zerstört die Schnittstelle für Eco RV, somit resultiert bei Vorliegen einer Mutation für das mutierte Allel ein längeres TET-markiertes Fragment mit 129 Basen. Wie man sieht, besitzt diese

Methode durch die Verwendung des Enzyms Eco RV dieselbe Spezifität wie die herkömmliche Standardrestriktionsenzymmethode. Ein großer Vorteil dieser neuen Methode ist die Vereinfachung und Verkürzung der Arbeitsschritte. Die einzelnen Arbeitsschritte und die Auswertung kann automatisiert werden. Möglicherweise kann die Sensitivität durch diese Methode gesteigert werden, da hier eine bessere Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente in Abhängigkeit ihrer Länge erfolgt. Durch die Bestimmung der fluoreszenzmarkierten Fragmente, die definierte Basenlängen aufweisen, gewinnt die Kapillarelektrophorese an Aussagekraft. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass durch den Einbau der Eco RV-Schnittstelle in den reverse Primer eine zusätzliche Kontrolle über die Vollständigkeit des stattgefundenen Digestionsvorgangs erfolgen kann. Bei inkompletter Digestion entsteht ein 150-Basen langes Fragment, das sehr gut von einer D835-Mutation mit einer Fragmentlänge von 129 Basen unterschieden werden kann. Der Nachweis der ITD-Mutation kann mit derselben Methode (Fragmentanalyse) nachgewiesen werden. Hier erfolgt jedoch, wie bei der klassischen PCR-Methode, kein Restriktionsenzymverdau.

Eine Arbeitsgruppe aus Saudi-Arabien (Gari et al.) benutzte 2008 eine andere Methode zur Detektion von *FLT3*-Mutationen im Exon 11, 14, 15 und 20, die *conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE)*. Diese Methode wurde erstmals von Ganguly et al. 1993 beschrieben. Sie basiert auf dem unterschiedlichen Migrationsverhalten von DNA-Heteroduplexmolekülen im Vergleich zu Homoduplexmolekülen während der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Heteroduplexmoleküle werden bei der Denaturierung und anschließenden Renaturierung der Polymerasekettenreaktion gebildet. Unter milden denaturierenden Bedingungen wird bei einem Basenaustausch eine Biegung der Doppelhelix bewirkt, somit kommt es zu einem besser nachweisbaren Mobilitätsunterschied von DNA-heteroduplex und homoduplex-Molekülen während der Gel-Elektrophorese. Die einfache Anwendung und Vielseitigkeit, kombiniert mit einem hohen Erkennungspotential von Mutationen, macht diese Methode durchaus geeignet zur Untersuchung von DNA-Fragmenten. Es kann neben der *FLT3*-ITD-Mutation auch das komplette Exon 20 auf Mutationen untersucht werden und nicht nur die D835-Mutation wie es mittels Restriktionsanalyse der Fall ist. Eine Schwachstelle dieser Methode ist jedoch, dass eine Mutation zum

Nachweis sich weniger als 50 Basenpaaren vom Fragmentende befinden sollte. Auch vermindert sich die Sensitivität dieser Methode mit Zunahme der Größe des PCR-Produktes. Am effektivsten erscheint diese Methode bei einer Fragmentlänge von 200 und 800 bp zu sein. In oben erwähnter Arbeit zeigte sich diese Methode als ein schnelles und sensitives Screeningverfahren zur Detektion von Nukleotidveränderungen im *FLT3*-Gen.

Ein weiteres Problem stellt die Detektion von somatischen low-level Mutationen bei gleichzeitigem Vorliegen einer großen Anzahl von WT-DNA dar. Um dieses Problem zu untersuchen, nutzten Warshawsky und Mularo 2011 die Methode der „locked nucleic acid (LNA)-PCR“ zur Detektion einer TKD-Mutation, insbesondere der häufigen *FLT3* D835/I836. Eine „locked nucleic acid (LNA)“ ist ein modifiziertes RNA-Nukleotid, bei dem eine zusätzliche Brücke zwischen dem 2`Sauerstoff und dem 4`Kohlenstoffmethylen eingefügt wurde. Die Brücke „sperrt“ die Ribose in der 3`Endo-Konformation. Die LNA-Base erhöht die Thermostabilität mit der komplementären DNA. LNA-Basen können in jedes DNA-Oligonukleotid eingebaut werden. Wenn Oligonukleotide Wildtyp-spezifische LNA-Basen enthalten, so wird ein LNA/DNA-Hybrid mit hoher Thermostabilität geformt und dadurch wird die Amplifikation des Wildtyp-Allels unterdrückt. Wenn jedoch eine Mutation vorliegt, kann die LNA-Base nicht an das mutierte Allel binden, somit kann das mutierte Allel bevorzugt amplifiziert werden. Die Daten von Warshawsky und Mularo zeigten, dass die zusätzliche Verwendung von LNA-Basen die Detektion von einem mutierten Allel unterstützen kann. Auch kann sie bei der Differenzierung zwischen einem inkompletten EcoRV-Restriktionsverdau und einer low-level Mutation weiterführend sein. Es konnte dadurch auch gezeigt werden, dass die Prävalenz der D835/I836 TKD-Mutation, vor allem der low-level Mutationen höher liegt als bisher angenommen. Es ist zu überlegen, ob die Methode der „locked nucleic acid PCR“ als zusätzliches Verfahren bei inkompletter EcoRV-Restriktionsverdau angewandt werden sollte.

4.5 Prognostische Bedeutung der aktivierenden Mutationen des *FLT3*-Rezeptors (ITD/TKD)

In der initialen Diagnostik der AML spielt die Bestimmung von prognostisch bedeutsamen Faktoren zur Stratifizierung der weiteren Therapie eine wichtige Rolle. Neben den bereits bekannten klinischen Prognosefaktoren der AML, wie das Alter sowie dem Erreichen einer kompletten Remission, können auch biologische Faktoren wie chromosomale Veränderungen und Genmutationen einen Einfluss auf die Prognose haben. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine *FLT3*-ITD mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist (Kiyoi et al. 1999, Abu-Duhier et al. 2000, Kottaridis et al. 2001, Thiede et al. 2002, Fröhling et al. 2002, Schnittger et al. 2002, Stirewalt 2006, Han et al. 2009, Santos et al. 2010, Sino-US Shanghai Leukemia Cooperative Group 2010 oder Park et al. 2011).

Fröhling et al. untersuchte 2002 insgesamt 523 erwachsene Patienten, hiervon hatten 224 einen normalen Karyotyp. Bezogen auf die Patienten mit normalen Karyotyp zeigte sich eine signifikant kürzere mediane Remissionsdauer für Patienten mit einer *FLT3*-Mutation (*FLT3* Asp835-Mutation, *FLT3*-ITD oder beide Mutationen) im Vergleich zu Patienten, die keine *FLT3*-Mutation aufwiesen. Das mediane Gesamtüberleben war für Patienten mit *FLT3*-ITD signifikant kürzer als bei Patienten ohne *FLT3*-Mutation.

In einer Arbeit von Schnittger et al. 2002 wurden 1003 erwachsene Patienten mit heterogenen Karyotypen untersucht. Es erfolgte eine Aufteilung in 9 Gruppen, dabei hatte die größte Gruppe mit 428 Patienten einen normalen Karyotyp. Zu den restlichen Gruppen zählten neben seltenen Translokationen auch t(8;21) mit 69 Patienten und inv(16)/t(16;16) mit 46 Patienten. Von 1003 Patienten hatten 234 Patienten eine *FLT3*-ITD Mutation. Von diesen hatten wiederum 165 Patienten einen normalen Karyotyp. Patienten mit einem normalen Karyotyp gehören zur intermediären Risikogruppe und wurden separat untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Vorhandenseins oder des Fehlens einer *FLT3*-ITD Mutation in der Intermediärrisikogruppe im Hinblick auf die komplette Remissionsrate oder das Gesamtüberleben. Das Vorhandensein einer *FLT3*-ITD Mutation zeigte sich jedoch prognostisch ungünstig im Hinblick auf das

ereignisfreie Überleben sowie das krankheitsfreie Überleben. Ebenfalls konnte in der Arbeit von Abu-Duhier et al. 2000 in einer Untersuchung von 106 Patienten mit de novo AML und Vorliegen von heterogenen Karyotypen (abnormale Karyotypen, inv (16), t(8;21), t(15;17)) gezeigt werden, dass Patienten ohne eine *FLT3*-ITD Mutation signifikant länger leben als Patienten, die eine *FLT3*-ITD Mutation aufweisen.

Eine weitere wichtige Arbeit von Kottaridis et al. 2001 zeigte ebenfalls, dass es keinen signifikanten Unterschied im Erreichen der kompletten Remission bei Vorhandensein oder Fehlen der *FLT3*-ITD Mutation gibt. Insgesamt wurden 854 Patienten mit heterogenem Karyotyp untersucht. Auch hatte hier das Vorhandensein einer *FLT3*-ITD Mutation das Rückfallrisiko und das krankheitsfreie Überleben signifikant nachteilig beeinflusst. Ebenso wirkte sich die ITD-Mutation nachteilig auf das Gesamtüberleben aus.

Einen sehr wichtigen Beitrag zur Beurteilung der prognostischen Bedeutung der *FLT3*-ITD Mutation stellt die Arbeit von Whitman et al. 2001 dar. Hier wurden insgesamt 82 erwachsene Patienten mit normalem Karyotyp untersucht. Schon damals wurde von Whitman et al. postuliert, dass es Unterschiede im klinischen Verlauf in Abhängigkeit davon gibt, ob beide *FLT3*-Allele mutiert sind oder ob eine heterozygote Mutation vorliegt. Die Arbeit zeigte, dass die Anwesenheit eines Wildtyp-Allels einen weiteren prognostischen Faktor darstellt. Eine molekulare Analyse ergab die Einteilung in 3 Genotypen: normal *FLT3* WT/WT, heterozygot *FLT3* ITD/WT und hemizygot *FLT3* ITD/- (d.h. Verlust des Wildtyp-Allels). Die komplette Remissionsrate unterschied sich in allen 3 *FLT3*-Genotypengruppen nicht. Das krankheitsfreie Überleben war signifikant kürzer für *FLT3* ITD/- im Vergleich zu *FLT3* WT/WT und geringfügig kürzer im Vergleich zur *FLT3* ITD/WT Gruppe. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem hemizygoten *FLT3* ITD/- Genotyp im Vergleich zu einem heterozygoten *FLT3* ITD/WT oder normalem *FLT3* WT/WT eine signifikant kürzere Überlebenszeit haben. Das Vorhandensein eines *FLT3* ITD/- Genotyps ist somit ein ungünstiger Prognosefaktor, resultierend in einer kürzeren Überlebenszeit, für die de novo AML bei normalem Karyotyp.

Die Daten von Whitman korrelieren sehr gut mit der Arbeit von Thiede et al. aus dem Jahr 2002. Hier wurden 979 unselektierte erwachsene AML-Patienten untersucht. Das Vorliegen einer ITD-Mutation war mit einem geringeren

Gesamtüberleben, einem geringeren krankheitsfreiem Überleben sowie mit einer vermehrten Rückfallrate assoziiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Menge des mutierten Allels, berechnet an der Ratio Mutante zu Wildtyp, eine prognostische Bedeutung hat. Hier zeigten sich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben, ein kürzeres krankheitsfreies Überleben sowie ein erhöhtes relatives Rückfallrisiko für Patienten mit einer erhöhten Ratio (> 0.78) im Vergleich zur medianen Ratio. D.h., diejenigen Patienten, die eine erhöhte Mutationslast besitzen, haben eine schlechtere Prognose. Diese Daten bestätigen somit die Aussage von Whitman et al. aus dem Jahr 2001.

Die Untersuchungen von Santos et al. 2010 konnten diese Daten bestätigen. Hier wurden insgesamt 481 AML-Patienten untersucht. Von diesem Patientenkollektiv wiesen 57 % einen normalen Karyotyp auf. Ein schlechteres ereignisfreies Überleben und das Gesamtüberleben wurden insbesondere bei Patienten mit normalen Karyotyp und höherer ITD-Last beobachtet.

In der Arbeit von Stirewalt et al. 2006 wird die Länge der ITD-Mutation als ein wichtiger Einflussfaktor auf die Gesamtüberlebenszeit gesehen. Es ergab sich die schlechteste Prognose für Patienten mit langen ITD's. Es konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende ITD-Größe mit einem abnehmenden Gesamtüberleben assoziiert ist.

Eine weitere wichtige Information bezüglich eines Prognosefaktors der ITD-Mutation legt die Arbeit von Kayser et al. aus dem Jahr 2009 dar. Hier konnte gezeigt werden, dass neben der Länge der ITD-Mutation auch die Lokalisation der ITD-Mutation im Bereich der funktionellen Region des *FLT3*-Rezeptors eine wichtige Rolle im Hinblick auf den klinischen Verlauf spielt. Insgesamt wurden 241 *FLT3*-ITD-mutierte erwachsene Patienten mit hauptsächlich normalem Karyotyp (86,3 %) untersucht. Eine ITD-Mutation im Bereich der Beta-1-Faltblattstruktur zeigte sich bei Patienten mit normalem Karyotyp als nachteiliger Prognosefaktor bezüglich einer kompletten Remission, eines rückfallfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens im Vergleich zu Patienten, bei denen die ITD-Insertionsstelle an einer anderen funktionellen Region des *FLT3*-Rezeptors lokalisiert ist. Ebenso korrelierte die Größe der ITD-Mutation mit der Insertionsstelle der ITD. Je länger die ITD-Mutation war, desto häufiger wurde die ITD-Mutation im Bereich des C-terminalen Endes eingebaut.

Park et al. untersuchte 2011 die prognostische Bedeutung der *FLT3*-ITD-Mutation in Zusammenhang eines Rezidivs. Insgesamt wurden 69 AML-Patienten mit normalem Karyotyp untersucht. 40 Patienten zeigten durchgehend einen Wildtyp-Genotyp. 11 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und im Rezidiv eine *FLT3*-ITD-Mutation. 9 Patienten verloren und 9 andere Patienten entwickelten eine ITD-Mutation im Rezidiv. Es hat sich gezeigt, dass eine *FLT3*-ITD-Mutation zum Zeitpunkt des Rezidivs, unabhängig vom initialen Mutationsstatus, mit einer signifikant schlechteren Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben und Überleben nach dem Rezidiv vergesellschaftet ist. Eine *FLT3*-ITD-Mutation bei Diagnosestellung zeigte keine signifikante prognostische Auswirkung auf das Gesamtüberleben oder das Überleben nach dem Rezidiv.

Durch diese Arbeiten wird also deutlich, dass nicht nur das Vorhandensein einer Mutation per se für die Prognose entscheidend ist, sondern dass letztendlich auch die Menge an mutiertem Allel und auch die Insertionsstelle der ITD im Bereich der funktionellen Region des *FLT3*-Rezeptors, die mit der Länge des intern mutierten Fragments korreliert, einen entscheidenden Prognosefaktor darstellt.

Die prognostische Bedeutung der *FLT3*-TKD ist nicht so umfangreich untersucht wie die der *FLT3*-ITD und nach aktuellem Wissensstand derzeit noch unklar und wird kontrovers diskutiert. Eine Meta-Analyse von Yanada et al. 2005 zeigte ein ähnliches outcome für ITD- und TKD-Mutationen. Ein großer Nachteil dieser Studie war jedoch die ausgeprägte Heterogenität der Daten im Hinblick auf die Patientenpopulation und die Therapie. Die Daten für diese Meta-Analyse stammten aus vier unterschiedlichen Studien. Diese Heterogenität der Daten macht es nur bedingt möglich, eine aussagekräftige Analyse durchzuführen. In einer britischen Arbeit von Mead et al. 2007 wurden 1107 Patienten auf das Vorliegen einer TKD-Mutation untersucht. Es zeigte sich, dass bei Patienten mit *FLT3*-TKD Mutationen die kumulative Inzidenz für ein Rezidiv (CIR, *cumulative incidence of relapse*) signifikant niedriger war. Ebenfalls wiesen diese Patienten ein signifikant besseres rezidivfreies Überleben auf (RFS, *relapse-free survival*) und hatten eine signifikant bessere 5-Jahres-Überlebensrate (*overall survival at 5 years*). Ebenso scheint die Menge an mutiertem Allel eine bedeutende Rolle zu spielen. Je mehr TKD-Mutante vorlag, desto besser war die Prognose des

Patienten. Bei Patienten war eine signifikant niedrigere Rückfallrate nur bei gleichzeitigem Vorliegen eines höheren Mutationslevels assoziiert (Mead et al. 2008).

In einer Arbeit von Whitman et al. aus dem Jahr 2008, konnte wiederum kein prognostischer Effekt für die TKD-Mutation hinsichtlich der Prognose nachgewiesen werden. Jedoch hatten die Patienten mit einer TKD-Mutation ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben als Patienten mit einem *FLT3*-TKD-Wildtyp.

Bacher et al. untersuchte 2008 insgesamt 3082 Patienten auf das Vorliegen einer TKD-Mutation. Ein normaler Karyotyp fand sich bei 1472 Patienten. Von diesen war bei 88 Patienten (6 %) eine *FLT3*-TKD Mutation nachweisbar. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass sowohl das Gesamtüberleben als auch das ereignisfreie Überleben nicht signifikant durch Anwesenheit einer *FLT3*-TKD Mutation beeinflusst wurde.

Weitere Untersuchungen von Han et al. aus dem Jahr 2009 und der Sino-US Shanghai Leukemia Cooperative Group 2010 konnten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der TKD-Mutation auf die Prognose zeigen.

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag in der genetischen Diagnostik der AML, da sie an einer großen Kohorte von AML-Patienten die Anwendung der Sequenzanalyse als Screeningmethode zum Nachweis von *FLT3*-TKD Mutationen validiert hat: Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inzidenz weiterer Mutationen im Exon 20 sehr gering ist. Dies ist für die Auswahl des Screeningsverfahrens von Bedeutung.

Zusammenfassend lässt sich aus der vorliegenden Arbeit folgendes Fazit ziehen: Da die TKD-Mutationen durch ihre konstitutive Aktivierung des Rezeptors mit Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen eine funktionelle Bedeutung in der Leukämogenese haben und das leukämogene Potential dieser Mutationen in zahlreichen Zelllinien und Maus-Modellen gezeigt werden konnte, erscheint ein Screening auf TKD-Mutationen im Rahmen von Studien sinnvoll.

Des Weiteren ist das Wissen über das Vorhandensein einer *FLT3*-Mutation, sowohl die ITD- als auch die TKD-Mutation, von hoher klinischer Relevanz, da mittlerweile eine ganze Reihe von AML-Studien existieren, bei denen Patienten

mit einer *FLT3*-Mutation, ITD und TKD, mit *FLT3*-Inhibitoren behandelt werden. Somit ist der Nachweis einer *FLT3*-Mutation als Einschlusskriterium in solche Studien mit *FLT3*-Inhibitoren von hoher klinischer Relevanz. Daher ist es umso wichtiger zu wissen, mit welcher Nachweismethode die *FLT3*-TKD Mutation identifiziert wurde und wie sensitiv und spezifisch die einzelnen Methoden sind.

Als Methode eignet sich, aufgrund der hohen Spezifität, die Restriktionsenzymanalyse. Mit Hilfe von Genfragmentanalysen, wie die Gene-Scan-Analyse von Murphy et al., kann die Sensitivität dieser Methode noch weiter gesteigert werden. Deshalb ist dieser halb-automatisierte sehr zuverlässige Assay mit seiner hohen Spezifität und Sensitivität derzeit die Screening-Methode der Wahl. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die direkte Sequenzanalyse aus dem PCR-Produkt nicht sensitiv genug ist, um eine TKD-Mutation zuverlässig nachzuweisen. 3,4 % der D835-Mutationen konnten mittels Sequenzanalyse nicht erkannt werden. Im Exon 20, also in der Tyrosinkinasedomäne 2 des *FLT3*-Gens, lassen sich weitere Mutationen nur sehr selten nachweisen. Aufgrund dieser niedrigen Inzidenz von weiteren Mutationen scheint ein Screening der gesamten Tyrosinkinasedomäne 2 mittels Sequenzanalyse nicht gerechtfertigt.

Bisher ist die prognostische Bedeutung der TKD-Mutationen umstritten. Die Mehrzahl der publizierten Arbeiten zeigte keine prognostische Bedeutung dieser TDK-Mutation. Dies liegt zum einen an der geringeren Inzidenz der Mutation, sodass hier große Fallzahlen notwendig sind, um letztendlich eine prognostische Relevanz aufzeigen zu können. Zum anderen liegt dies aber auch an der Vielzahl anderer prognostisch relevanter Marker, die im multivarianten Modell Gewicht haben. Eine mögliche Perspektive wäre, die prognostische Bedeutung der TKD-Mutationen im Rahmen von Meta-Analysen prospektiv zu evaluieren. Hierzu müssten Daten aus mehreren großen Studiengruppen, die ähnliche Therapiekonzepte verfolgen, zusammengelegt werden.

5. Zusammenfassung

Die Rezeptor-Tyrosinkinase *FLT3* ist an der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen beteiligt. Durch Mutationen im Codon D835 des *FLT3*-Gens wurde bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) eine konstitutive Liganden-unabhängige Aktivierung des *FLT3*-Rezeptors mit Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege nachgewiesen. In zahlreichen Zelllinien und Mausmodellen wurde das leukämogene Potential dieser Mutationen mit Ausbildung eines lymphatischen Phänotyps aufgezeigt.

In dieser Arbeit sollten die Häufigkeit der bislang bekannten TKD-D835 Mutation (Tyrosinkinasedomäne) sowie die Häufigkeit weitere Mutationen im Exon 20 von *FLT3* bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp untersucht werden. Dazu wurden insgesamt 319 Patienten mit normalen Karyotyp aus der HD98A-Studie mittels Sequenzanalyse untersucht. Des Weiteren sollte ein Methodenvergleich im Hinblick auf die Spezifität und Sensitivität erfolgen. Bei allen 319 Patienten war vor Analysebeginn der *FLT3*-TKD Mutationsstatus mittels Restriktionsenzymverdau untersucht worden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Sequenzanalyseverfahrens bei 7,2 % der Patienten eine Veränderung im Bereich des *FLT3*-Codon D835 nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt 4 verschiedene Missense-Mutationen detektiert. Die häufigste unter ihnen war, wie bisher in anderen Arbeiten auch beschrieben, die D835Y-Mutation. Hierbei kam es zu einer Substitution des ersten Nukleotids G durch T, resultierend in einem Aminosäureaustausch von Aspartat gegen Tyrosin. Neben den weiteren bekannten Mutationen wie D839G, Y842C und der bereits beschriebenen Deletion 836I zeigte sich im Exon 20 eine neue bislang noch nicht beschriebene Mutation, nämlich die R834Q-Mutation. Hier fand ein Austausch des zweiten Nukleotid G zu A statt, resultierend in einem Aminosäurewechsel von Arginin zu Glutamin. Darüber hinaus wurde eine weitere bislang noch nicht beschriebene Deletion detektiert, nämlich die 837M-Deletion. Hierbei kam es zu einem Verlust des Codon 837.

Der Methodenvergleich bezüglich Spezifität und Sensitivität ergab für das Restriktionsenzymverfahren deutliche Vorteile. Durch Vergleich der beiden

Methoden Restriktionsenzymverdau und Sequenzanalyseverfahren zeigte sich, dass mittels Sequenzanalyseverfahren bei 11 Patienten die D835-Mutation nicht detektiert werden konnte. Die Sequenzanalyse ist somit hinsichtlich der Sensitivität dem Restriktionsenzymverdau gegenüber eindeutig unterlegen.

Da sich die Restriktionsenzymanalyse zum Nachweis der TKD-Mutation mit Hilfe der Gene-Scan-Analyse, wie z.B. von Murphy et al. beschrieben, noch weiter verbessern lässt, sollte diese Methode als Screening-Methode verwendet werden.

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag im Hinblick auf folgende Aspekte: Erstens konnte die Inzidenz der Exon 20 Mutationen im *FLT3*-Gen exakt evaluiert werden. Des Weiteren konnten zwei unterschiedliche Assays (Restriktionsenzymverdau vs. Sequenzierungsmethode) zum Nachweis der Exon 20 Mutationen validiert werden und somit die Vorteile der Screeningmethode mittels Restriktionsenzymverdau gegenüber der Sequenzanalyse aufgezeigt werden. Da die TKD-Mutation funktionell relevant ist und ein wichtiges Einschlusskriterium für klinische Studien mit *FLT3*-Inhibitoren darstellt, ist es sinnvoll, ein TKD-Screening im Rahmen von Studien durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass hierfür der Restriktionsenzymverdau eingesetzt werden sollte.

Die prognostische Bedeutung der TKD-Mutation bleibt trotz zahlreicher Studien weiterhin umstritten. Derzeit zeigt sich in der Mehrzahl der publizierten Arbeiten keine prognostische Bedeutung. Eine Möglichkeit zur Untersuchung der prognostischen Bedeutung der TKD-Mutation wäre, diese im Rahmen von Meta-Analysen zu evaluieren. Hierzu sollten Daten aus mehreren großen Studiengruppen, die ähnliche Therapiekonzepte verfolgten, zusammengelegt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, Relly JT:** FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000; 111: 190-195.
- 2 **Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT:** Genomic structure of human FLT3: Implications for mutational analysis. *Br J Haematol* 2001; 113: 1076-1089.
- 3 **Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT:** Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 983-988.
- 4 **Advani AS:** FLT3 and acute myelogenous leukemia: biology, clinical significance and therapeutic applications. *Current Pharmaceutical Design* 2005; 11: 3449-3457
- 5 **Agnès F, Shamoon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F:** Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* 1994; 145: 283-288.
- 6 **Ahmad F, Mandava S, Das BR:** Analysis of FLT3-ITD and FLT3-Asp835 mutations in de novo acute myeloid leukemia: evaluation of incidence, distribution pattern, correlation with cytogenetics and characterization of internal tandem duplication from Indian population. *Cancer Invest.* 2010; 28: 63-73.
- 7 **Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S:** Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters - an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008; 111: 2527-2537.
- 8 **Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, Larizza L, Cairoli R, Morra E, Mecucci C:** C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood* 2000; 95: 726-727.
- 9 **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C:** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103: 620-625.
- 10 **Bienz M, Ludwig M, Mueller BU, Opplinger Leibundgut E, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T:** Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1416-1424.

-
- 11 **Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC:** Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998; 58: 4173-4179.
 - 12 **Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, Tigaud I, Castaigne S, Raffoux E, De Botton S, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C:** Prevalence, clinical profile and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3618-3620.
 - 13 **Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA:** Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 1989; 56: 379-390.
 - 14 **Brady SN, Yu Y, Maggi LB Jr, Weber JD:** ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9327-9338.
 - 15 **Caligiuri MA, Schichman SA, Strout MP, Mrozek K, Bear MR, Frankel SR, Barcos M, Herzig GP, Croce CM, Bloomfield CD:** Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* 1994; 54: 370-373.
 - 16 **Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D:** Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Ftk2) in human leukemias. *Blood* 1996; 3: 189-1096.
 - 17 **Chan PM:** Differential signalling of FLT3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. *Protein Cell* 2011; 2: 108-115.
 - 18 **Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H:** AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 2005; 106: 265-273.
 - 19 **Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J:** Internal tandem duplications of the FLT3 and MLL genes are mainly observed in atypical cases of therapy-related acute myeloid leukemia with a normal karyotype and are unrelated to type of previous therapy. *Leukemia* 2001; 15: 1848-1851.
 - 20 **Döhner K, Tobis K, Ulrich R:** Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3254-3261.
 - 21 **Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H:** Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts

favourable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106: 3740-3746.

- 22 **Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, Benthaus T, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Braess J, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K:** Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol* 2010; 28: 570-577.
- 23 **Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Psqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF:** Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemias with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352: 254-266.
- 24 **Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, Kienast J, Leo R, Schwartz S, Berdel WE, Serve H:** Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol* 2000; 108: 322-330.
- 25 **Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K:** Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100: 4372-4380.
- 26 **Fröhling S, Schlenk RF, Stolz I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K:** CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22: 624-633.
- 27 **Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y:** Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993; 92: 1736-1744.
- 28 **Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ:** Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10325-10329.
- 29 **Gari M, Abuzenadah A, Chaudhary A, Al-Qahtani M, Banni H, Ahmad W, Al-Sayes F, Lary S, Damanhouri G:** Detection of FLT3 oncogene mutations

in acute myeloid leukemia using conformation sensitive gel electrophoresis. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 2194-2204.

- 30 **Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S, Takeuchi S, Krug U, Kwok SH, Larsen RJ, Asou H, Miller CW, Hoelzer D, Koefler HP:** Mutations in the gene coding for the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein α in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood* 2002; 99: 1332-1340.
- 31 **Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K:** The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular Cell* 2004; 13: 169-178.
- 32 **Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A:** The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322-2333.
- 33 **Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett A:** Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354-365.
- 34 **Griswold IJ, Shen LJ, La Rosée P, Demehri S, Heinrich MC, Braziel RM, McGreevey L, Haley AD, Giese N, Druker BJ, Deininger MW:** Effects of MLN518, a dual FLT3 and KIT inhibitor, on normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 2004; 104: 2912-2918.
- 35 **Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J:** FLT3-ITD and tyrosin kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005; 105: 4792-4799.
- 36 **Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, Testoni N, Rege-Cambrin G, Santucci A, Vignetti M, Fazi P, Martelli MP, Haferlach T, Falini B:** AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* 2009; 114: 3024-2032.
- 37 **Han YL, Zhang SJ, Qiao C, Dai D, Sun XM, Xu YL, Qian SY, Xu W, Wang JS, Li JY:** FMS-like tyrosine kinase 3 gene mutations in acute myeloid leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009; 17: 1135-1139.
- 38 **Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, Kastelein R, Hudak S, Wagner J, Mattson J:** Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of hematopoietic stem cell and is encoded by variant RNAs. *Nature* 1994; 368: 643-648.

-
- 39 **Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T:** Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 624-631.
- 40 **Jiang J, Paez JG, Lee JC, Bo R, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I, Wolpin BM, Jonasova A, Herman P, Fox EA, Boggon TJ, Eck MJ, Weisberg E, Griffin JD, Gilliland DG, Meyerson M, Sellers WR:** Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood* 2004; 104: 1855-1858.
- 41 **Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Fischer T, Döhner K:** Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114: 2386-2391.
- 42 **Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG:** FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2002; 99: 310-318.
- 43 **Kindler T, Breitenbuecher F, Kaspar S, Estey E, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller G, Klimek V, Nimer SD, Gratwohl A, Choudhary CR, Mueller-Tidox C, Serve H, Gschaidmeier H, Cohen PS, Huber C, Fischer T:** Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2005; 105: 335-340.
- 44 **Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R:** Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutation in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-3080.
- 45 **Kiyoi H, Naoe T:** FLT3 in human hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 1541-1547.
- 46 **Kottaridis PD, Gale RE, Frew M, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC:** The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-1759.
- 47 **Lyman SD, James L, Zappone J, Sleath PR, Beckmann MP, Bird T:** Characterization of the protein encoded by the flt3 (flt2) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene* 1993; 8: 815-822.

-
- 48 **Lyman SD, Jacobsen SE:** c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; 91: 1101-1134.
- 49 **Mattews W, Jordan CT, Wiegand WG, Pardoll D, Lemischka IR:** A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991; 65:1143-1152.
- 50 **McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ:** Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000; 95: 3489-3497.
- 51 **Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE:** FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favourable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukaemia. *Blood* 2007; 110: 1262-1270.
- 52 **Mead AJ, Gale RE, Hills RK, Gupta M, Young BD, Burnett AK, Linch DC:** Conflicting data on the prognostic significance of FLT3/TKD mutations in acute myeloid leukemia might be related to the incidence of biallelic disease. *Blood* 2008; 112: 444-445.
- 53 **Meierhoff G, Dehmel U, Gruss HJ, Rosnet O, Birnbaum D, Quentmeier H, Dirks W, Drexler HG:** Expression of FLT3 receptor and FLT-3 ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995; 9: 1368-1372.
- 54 **Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, Kaspars GJL, Heerema NA, Gerbing R, Lange BJ, Radich JP:** Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 2006; 108: 3654-3661.
- 55 **Millne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, Hess JL:** MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 2002; 10: 1107-1117.
- 56 **Moore AS, Faisal A, de Castro DG, Bavetsias V, Sun C, Atrash B, Valenti M, de Haven Brandon A, Avery S, Mair D, Mirabella F, Swansbury J, Pearson AD, Workman P, Blagg J, Raynaud FI, Eccles SA, Linardopoulos S:** Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD(+) acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a model for emerging clinical resistance patterns. *Leukemia advance online publication*, March 2012; doi:10.1038/leu.2012.52.
- 57 **Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, Small D, Berg KD:** Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *Journal of Molecular Diagnostics* 2003; 5: 96-102.

-
- 58 **Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S:** Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-1918.
- 59 **O`Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA, Yeun HA, Louie SG, Kim H, Nicholas S, Heinrich MC, Berdel WE, Bello C, Jacobs M, Scigalla P, Manning WC, Kelsey S, Cherrington JM:** An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5465-5476.
- 60 **Pabst T, Mueller BU, Zang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddenmann W, Tenen DG:** Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001; 27: 263-270.
- 61 **Parcells BW, Ikeda AK, Simms-Waldrup T, Moore TB, Sakamoto KM:** FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cell* 2006; 24: 1174-1184.
- 62 **Park SH, Chi HS, Min SK, Cho YU, Jang S, Park CJ, Lee JH, Lee JH, Lee KH, Im HJ, Seo JJ:** Prognostic significance of the FLT3ITD mutation in patients with normal-karyotyp acute myeloid leukemia in relapse. *Korean J Hematol* 2011; 46: 88-95.
- 63 **Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, Louault H, Imbert M, Vainchenker W, Vernant JP, Tulliez M:** A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol* 1997; 96: 374-376.
- 64 **Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H:** Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002; 100: 2717-2723.
- 65 **Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K:** Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006; 107: 3700-3707.
- 66 **Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B, Ploemacher RE:** Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *Flt3* gene. *Leukemia* 2000; 14: 675-683.
- 67 **Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, Birg F, Birnbaum D:** Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993; 82: 1110-1119.

-
- 68 **Sallmyr A, Fan J, Datta K, Kim KT, Grosu D, Shapiro P, Small D, Rassool F:** Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* 2008; 111: 3173-3182.
- 69 **Santos FP, Jones D, Qiao W, Cortes JE, Ravandi F, Estey EE, Verma D, Kantarjian H, Borthakur G:** Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2011; 117: 2145-2155.
- 70 **Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, del Valle F, Weber C, Pralle H, Fischer JTh, Gunzer U, Pezzutto A, Weber W, Grimminger W, Preiß J, Hensel M, Fröhling S, Döhner K, Haas R, Döhner H:** Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the german multicenter AML HD 93 treatment trial. *Leukemia* 2003; 17: 1521-1528.
- 71 **Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H:** Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Eng J Med* 2008; 358: 1909-1918.
- 72 **Schlessinger, J:** Signal transduction. Autoinhibition control. *Science* 2003; 300: 750-752.
- 73 **Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Buchner T, Wormann B, Hiddemann W, Griesinger F:** Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavourable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14: 796-804.
- 74 **Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W:** Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtypes, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59-66.
- 75 **Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B:** Nucleophosmin gene mutations are predictors of favourable prognosis in acute myelogenous leukaemia with normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733-3739.
- 76 **Schnittger S, Bacher U, Kern W, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T:** Prognostic impact of FLT3-ITD loading NPM1 mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 1297-1304.
- 77 **Scholl S, Krause C, Loncarevic IF, Müller R, Kunert C, Wedding U, Sayer HG, Clement JH, Höffken K:** Specific detection of Flt3 point mutations by highly sensitive real-time polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia. *J Lab Clin Med* 2005; 145(6): 295-304.

-
- 78 **Shen Y, Zhu YM, Fan X, Shi JY, Wang QR, Yan XJ, Gu ZH, Wang YY, Chen B, Jiang CL, Yan H, Chen FF, Chen HM, Chen Z, Jin J, Chen SJ:** Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2011; 118: 5593-5603.
- 79 **Shih LY, Huang CF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Chou MC, Kuo MC, Tang CC:** Heterogeneous patterns of FLT3 Asp835 mutations in relapsed de novo acute myeloid leukemia: a comparative analysis of 120 paired diagnostic and relapse bone marrow samples. *Clin Cancer Res* 2004; 1: 1326-1332.
- 80 **Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y:** Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 264-269.
- 81 **Sino-US Shanghai Leukemia Cooperative Group:** LT3 gene mutation and its prognostic implication in patients with acute leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2010; 31: 1-5.
- 82 **Small D:** FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology* 2006; 178-184.
- 83 **Smith ML, Arch R, Smith LL, Bainton N, Neat M, Taylor C, Bonnet D, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J:** Development of a human acute myeloid leukemia screening panel and consequent identification of novel gene mutation in FLT3 and CCND3. *Br J Haematol* 2005; 128: 318-323.
- 84 **Solanilla A, Grosset C, Duchez P, Legembre P, Pitard V, Dupouy M, Belloc F, Viallard JF, Reiffers J, Boiron JM, Coulombel L, Ripoche J:** Flt3-ligand induces adhesion of haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)-4- and VLA-5-dependent mechanism. *Br J Haematol* 2003; 120:782-786.
- 85 **Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogosova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP:** Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2004; 124: 481-484.
- 86 **Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogosova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP:** Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724-3726.
- 87 **Tenen DG:** Abnormalities of the CEBP α transcription factor: a major target in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 688-689.

-
- 88 **Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T:** 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: 4326-4335.
- 89 **Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G:** Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107: 4011-4020.
- 90 **Thiede C, Creutzig E, Illmer T, Schaich M, Heise V, Ehninger G, Landt O:** Rapid and sensitive typing of NPM1 mutations using LNA-mediated PCR clamping. *Leukemia* 2006; 20: 1897-1899.
- 91 **Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Bueau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD:** The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-951.
- 92 **Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CAJ, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJM:** 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.
- 93 **Warshawsky I, Mularo F:** Locked nucleic acid probes for enhanced detection of FLT3 D835/I836, JAK2 V617F and NPM1 mutations. *J Clin Pathol* 2011; 64: 905-910.
- 94 **Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Kollitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA:** Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer research* 2001; 61: 7233-7239.
- 95 **Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Vukosavljevic T, Powell BL, Carroll AJ, Kollitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD:** Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2007; 109: 5164-5167.
- 96 **Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kollitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD:** FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression

signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood* 2008; 111: 1552-1559.

- 97 **Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, van Putten WLJ, Valk PJM, Delwel R:** Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113: 3088-3091.
- 98 **Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T:** Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97: 2434-2439.
- 99 **Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T:** Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 2005; 19: 1345-1349.
- 100 **Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, Naoe T:** Internal tandem duplication of FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various haematological malignancies: a study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997; 11: 1605-1609.
- 101 **Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, Karaman MW, Pratz KW, Pallares G, Chao Q, Sprankle KG, Patel HK, Levis M, Armstrong RC, James J, Bhagwat SS:** AC220 is an uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2009; 114: 2984-2992.
- 102 **Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, Beran M, Zhu Z, Ludwig D, Hicklin D, Witte L, Li Y, Small D:** FLT3 ligand causes autocrine signalling in acute myeloid leukemia cell. *Blood* 2004; 103: 267-274.

7. DANKSAGUNGEN

Viele Personen haben dazu beigetragen, dass die vorliegende Dissertation in dieser Form möglich war.

Frau Prof. Dr. K. Döhner danke ich für die Bereitstellung des Themas, die vielen wichtigen Anregungen und für die hervorragende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich allen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Innere Medizin III der Universität Ulm der Arbeitsgruppe AML, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Marianne Habdank, Herrn Stefan Heinrich sowie Frau Karina Eiwien für die hervorragende Betreuung im Labor bedanken.

Auch möchte ich mich bei meinem Ehemann Michael für die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, die stetig an mich geglaubt haben, meinen größten Dank aussprechen und ihnen für ihre großzügige Unterstützung danken. Ohne sie wäre mein Studium so nicht möglich gewesen. Ihnen widme ich diese Arbeit.

8. LEBENSLAUF

Viola Kurz, geb. Mayer

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

Seit 10/02	Studium der Humanmedizin, Universität Ulm
09/2004	Ärztliche Vorprüfung
08/07 – 12/07	1. Tertial Praktisches Jahr, Universität Ulm, Wahlfach Dermatologie
12/07 – 04/08	2. Tertial Praktisches Jahr, Lehrkrankenhaus der Universität Ulm, Kreisklinik Biberach, Innere Medizin
04/08 – 07/08	3. Tertial Praktisches Jahr, Kreisklinik Biberach Chirurgie
09.12.2008	Approbation zur Ärztin

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 01.01.09	Assistenzärztin Innere Medizin II, Gastroenterologie, Klinikum Memmingen
seit 05.08.11	in Elternzeit