

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

**Quantitative Mutationsanalyse des *FLT3*-Gens bei
der akuten myeloischen Leukämie mit normalem
Karyotyp**

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

vorgelegt von
Verena Maria Nuber
geboren in Kempten (Allgäu)

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

Meinen Eltern,
Anne und Karl Nuber

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Akute myeloische Leukämie	- 1 -
1.2 Bedeutung der Zytogenetik und Molekulargenetik bei der AML ...	- 2 -
1.3 Prognostische Bedeutung chromosomaler Aberrationen bei der AML	- 3 -
1.4 Molekulargenetische Heterogenität der AML mit normalem Karyotyp	- 4 -
1.5 Pathogenese der AML	- 5 -
1.6 Die Rezeptortyrosinkinase <i>FLT3</i>	- 7 -
1.7 <i>FLT3</i> bei der AML	- 8 -
1.8 Interne Tandemduplikationen des <i>FLT3</i> -Rezeptors.....	- 9 -
1.9 Prognostische Bedeutung der <i>FLT3</i> -ITD bei AML	- 11 -
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	- 13 -
2 Material und Methoden	- 15 -
2.1 Material.....	- 15 -
2.1.1 Reagenzien- und Geräteverzeichnis	- 15 -
2.1.2 Patientenkollektiv und Therapie	- 17 -
2.1.3 Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung ..	- 20 -
2.1.4 Materialgewinnung	- 20 -
2.2 Methoden.....	- 21 -
2.2.1 DNA-Extraktion.....	- 21 -
2.2.2 Nachweis interner Tandemduplikationen mittels konventioneller PCR	- 22 -
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	- 23 -
2.2.4 Nachweis von internen Tandemduplikationen mittels GeneScan-Analyse	- 25 -
2.2.5 Konventioneller PCR-Nachweis bei diskrepanten Proben.....	- 29 -
2.2.6 Statistische Analyse	- 29 -
3 Ergebnisse	- 32 -
3.1 Nachweis einer <i>FLT3</i> -ITD anhand der GeneScan Analyse	- 33 -
3.2 Sensitivitätsvergleich der GeneScan Analyse mit der konventionellen PCR	- 33 -
3.3 Quantifizierung und Anzahl der <i>FLT3</i> -ITD-Klone	- 35 -
3.4 Patienten mit mehreren verschiedenen <i>FLT3</i> -ITD-Klonen.....	- 35 -
3.5 Prognostischer Stellenwert der <i>FLT3</i> -ITD/Wildtyp-Ratio bei AML mit normalem Karyotyp	- 36 -
3.5.1 Korrelation mit klinischen Charakteristika.....	- 36 -
3.5.2 Ansprechen auf die Induktionstherapie	- 39 -
3.5.3 Überlebensanalysen.....	- 40 -

3.5.4 Überleben in Korrelation zum <i>NPM1</i> -Mutationsstatus	- 42 -
4 Diskussion.....	- 45 -
4.1 Inzidenz Interner Tandemduplikationen des <i>FLT3</i> -Gens	- 45 -
4.2 Stellenwert der Quantität von <i>FLT3</i> -ITD	- 45 -
4.3 Bedeutung mehrerer <i>FLT3</i> -ITD Mutationen innerhalb eines Patienten	- 48 -
4.4 Bedeutung der Länge von <i>FLT3</i> -ITD	- 48 -
4.5 Sensitivität der Nachweismethode mittels GeneScan.....	- 51 -
4.6 Perspektiven in der AML-Diagnostik und -Therapie	- 52 -
5 Zusammenfassung.....	- 54 -
6 Literaturverzeichnis	- 56 -
Danksagung	- 65 -
Lebenslauf.....	- 66 -

Abkürzungsverzeichnis

6-JÜR	6-Jahresüberlebensrate
6-FAM	6-carboxy-fluorescein
A	Adenosin
Abn	Abnormalität
A-HAM	all-trans Retinsäure, Hochdosis-Cytarabin und Mitoxantron
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMLSG	AML-Studiengruppe
APL	akute Promyelozytenleukämie
ATRA	all trans retinoic acid
AUC	area under the curve
BAALC	brain and acute leukemia cytoplasmic
B-ALL	b-lineage acute lymphoblastic leukemia
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CCD	charge-couplet device
CBFB	core-binding factor, beta subunit
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein alpha
<i>c-FMS (FMS)</i>	formerly McDonough feline sarcoma viral oncogene homolog
<i>c-KIT (KIT)</i>	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
CML	chronische myeloische Leukämie
CR	complete remission
CRi	incomplete remission
Del	Deletion
DFS	disease-free survival
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	double stranded deoxyribonucleic acid
ED	early death
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EFS	event-free survival
<i>ERG</i>	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
<i>EVI1</i>	ecotropic viral integration site 1
FAB	French-American-British
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	<i>FLT3</i> -Ligand
<i>FLK2</i>	fetal liver kinase 2
<i>FLT3</i>	FMS-related tyrosine kinase 3
G	Guanin
G-CSF	Granulozyten colony-stimulating factor
HAM	Hochdosis-Cytarabin und Mitoxantron
HLA	humanes Leukozytenantigen
<i>HOX</i>	homeobox
HPLC	high pressure liquid chromatography
ICE	Idarubicin, Cytarabin, Etoposid
Inv	Inversion
ISCN	International System for Cytogenetic Nomenclature
ITD	interne Tandemduplikation
i.v.	intravenös
<i>JAK2</i>	Januskinase 2
JM	juxtamembranär
<i>KRAS</i>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
kDa / kD	Kilo Dalton
KI	Kinasen Insertion
KM	Knochenmark
KMP	Knochenmarkspunktion
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCL	Myeloid cell leukemia
<i>MKL1</i>	mypcardin-like protein 1
<i>MLL</i>	mixed-lineage leukemia
<i>MLLT3</i>	mixed-lineage leukemia translocated to 3
MRD	minimal residual disease
MUT	Mutation

<i>MYH11</i>	myosin heavy chain 11
N	Negativkontrolle
NBL	nucleotide binding loop
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin 1
<i>NRAS</i>	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NTP	Nukleosidtriphosphat
<i>NUP214</i>	nucleoporin 214
OD	optical density
OS	overall survival
PB	peripheres Blut
PCR	polymerase chain reaction
<i>PDGFR</i>	platelet derived growth factor receptor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PML	Promyelozytenleukämie
p.o.	per os
POP-6	performance optimized Polymer 6
PR	partielle Remission
PTD	partielle Tandemduplikation
<i>RARA</i>	retinoic acid receptor alpha
<i>RAS</i>	Rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>RBM15</i>	putative RNA-binding protein 15
RFS	rezidivfreies Überleben
RD	resistant disease
RNA	ribonucleic acid
<i>RPN</i>	Dolichyl-diophosphooligosaccharide-proteinglycosyl transferase
<i>RUNX1</i>	runt-related transcription factor 1
<i>RUNX1T1</i>	runt-related transcription factor 1, translocated to, 1 (cyclin D-related)
SCT	stem cell transplantation
<i>SOCS1</i>	suppressor of cytokine signaling 1
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
<i>STK1</i>	stem cell tyrosine kinase 1
s-AML	sekundäre akute myeloische Leukämie
t	Translokation

T	Thymin
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
T-ALL	t-lineage acute lymphoblastic leukemia
t-AML	Therapie-assoziierte akute myeloische Leukämie
TK1 / TK2	Tyrosinkinase 1 / Tyrosinkinase 2
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TM	transmembranär
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne klonale Erkrankung der hämatopoetischen Zellen, wobei sich „akut“ auf den klinischen Verlauf der Erkrankung bezieht (Fröhling et al., 2005). Bei dieser Erkrankung verlieren unreife hämatopoetische Vorläuferzellen die Fähigkeit zur normalen Ausdifferenzierung und Proliferation (Löwenberg et al., 1999). Dies führt zum charakteristischen Anstieg der unreifen myeloiden Zellen im Knochenmark und zur Störung der Hämatopoese. Hierbei können alle drei Zellreihen betroffen sein; klinisch präsentiert sich das Bild der AML durch eine Knochenmarkinsuffizienz und Suppression der normalen Hämatopoese aufgrund der blastären Knochenmarkinfiltration mit konsekutiver Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie (Estey u. Döhner, 2006).

Obwohl die AML weniger als 1% aller Krebsarten ausmacht, spielt sie unter den Leukämien mit einem Anteil von insgesamt 34% eine große Rolle. Vor allem mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz dieser Erkrankung (Ferrara u. Pinto, 2007). Diese beträgt ca. 4/100.000 Einwohner pro Jahr; innerhalb der Personengruppe über 65 Jahre steigt die Inzidenz bis auf 12,6/100.000 Einwohner pro Jahr. Somit ist die AML eine Erkrankung des älteren Menschen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren (Estey u. Döhner, 2006).

Substanzen, die das Erbgut verändern (wie z.B. Benzol) sowie radioaktive Strahlung können das Risiko, an einer AML zu erkranken, erhöhen (Estey u. Döhner, 2006). Insbesondere nach vorangegangenen Strahlen- und Chemotherapien aufgrund einer zurückliegenden Krebserkrankung kommt es gehäuft zum Auftreten sogenannter therapieassoziierter Leukämien. Des Weiteren kann sich aus einer bereits bestehenden Knochenmarkserkrankung, wie z.B. dem myelodysplastischen Syndrom oder myeloproliferativen Neoplasien, eine sekundäre AML entwickeln.

1.2 Bedeutung der Zytogenetik und Molekulargenetik bei der AML

Die AML ist klinisch und biologisch eine sehr heterogene Erkrankung (Estey u. Döhner, 2006). Bei etwa 55% der Erwachsenen mit AML lassen sich chromosomale Veränderungen nachweisen (Döhner u. Döhner, 2008). Während in der Vergangenheit die Erkrankung vor allem nach mikroskopisch auffälligen Kriterien sowie Oberflächenmerkmalen (Immunphänotypisierung) eingeteilt wurde (sog. FAB-Klassifikation), erfolgt die Klassifizierung mittlerweile anhand zytogenetischer und molekulargenetischer Veränderungen (World Health Organization- (WHO-) Klassifikation). In dieser werden zusätzlich zytogenetische, molekularbiologische und klinische Merkmale berücksichtigt (Vardiman et al., 2002). Bei einer 2008 veröffentlichten Aktualisierung der WHO-Klassifikation wurden die in letzter Zeit gewonnenen genetischen Informationen integriert. In dieser revidierten Fassung erfolgt die Klassifikation der AML sowohl anhand zytogenetischer Aberrationen als auch anhand der beiden molekularen Marker *Nucleophosmin 1 (NPM1)* und *CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)* (Swerdlow et al., 2008).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (Swerdlow et al., 2008)

Abkürzungen: AML = akute myeloische Leukämie; *CBFB* = core-binding factor subunit beta; *CEBPA* = CCAAT/enhancer-binding protein alpha; *EVI1* = ecotropic viral integration site 1; *MKL1* = myocardin-like protein; *MLL* = mixed-lineage leukemia; *MLLT3* = mixed-lineage leukemia translocated to 3; *MYH11* = myosin heavy chain 11; *NPM1* = Nucleophosmin 1; *NUP214* = nucleoporin 214; *PML* = Promyelozytenleukämie; *RARA* = Retinolsäure-Rezeptor alpha; *RBM15* = putative RNA-binding protein 15; *RPN1* = Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1; *RUNX1* = runt-related transcription factor 1; *RUNX1T1* = runt-related transcription factor 1, translocated to, 1 (cyclin D-related); WHO = World Health Organization.

AML mit rekurrenten, genetischen Aberrationen
AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22), <i>CBFB-MYH11</i>
AML mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2), <i>RPN1-EVI1</i>
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
AML mit mutiertem <i>CEBPA</i>

Fortsetzung Tabelle 1:

AML mit myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapieassoziierte myeloide Neoplasien
AML, nicht anderweitig charakterisiert
AML mit minimaler Differenzierung
AML ohne Ausreifung
AML mit Ausreifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monoblastische und monozytäre Leukämie
Akute erythroide Leukämie
Akute megakryoblastische Leukämie
Akute basophile Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom
Myeloische Proliferationen bei Down Syndrom
Vorübergehende abnormale Myelopoese
Mit Down Syndrom assoziierte myeloische Leukämie
Blastische plasmazelluläre dendritische Zell Neoplasie

1.3 Prognostische Bedeutung chromosomaler Aberrationen bei der AML

Unter den prognostischen Markern wie Leukozytenzahl und Alter zählt der Karyotyp zu einem der wichtigsten unabhängigen prognostischen Faktoren hinsichtlich Gesamtüberleben und Therapieansprechen (Mrózek et al., 2004; Grimwade, 2001; Löwenberg, 2001). In verschiedenen Studien konnte einheitlich belegt werden, dass unterschiedliche chromosomale Aberrationen mit der Rate an kompletten Remissionen und den Überlebensraten assoziiert sind (Byrd et al., 2002; Grimwade et al., 1998; Mrózek et al. 2001; Slovak et al., 2000). Anhand der Zytogenetik lassen sich Patienten mit AML in drei Risikogruppen einteilen: Niedrig-, Intermediär- und Hoch-Risikogruppe (Döhner et al., 2010).

Patienten mit normalem Karyotyp, welcher sich bei 40 bis 50% der erwachsenen AML-Patienten findet (Mrózek et al., 2007), werden in die intermediäre Risikogruppe klassifiziert (Döhner et al., 2010). Dabei lassen sich innerhalb dieser Grup-

pe deutliche Unterschiede hinsichtlich des klinischen Verlaufs beobachten; nur ein Teil dieser Patienten weist eine lange Überlebenszeit auf.

1.4 Molekulargenetische Heterogenität der AML mit normalem Karyotyp

In den letzten Jahren wurden innerhalb der AML-Patienten mit normalem Karyotyp etliche molekulargenetischen Veränderungen oder Dysregulationen der Genexpression entdeckt (Bullinger et al., 2004; Mrózek et al. 2007). Am häufigsten finden sich hierbei *Nucleophosmin 1 (NPM1)*-Genmutationen in 53%, interne Tandemduplikation (ITD) des *Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)*-Gens in 31%, *CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)*-Genmutationen in 13% sowie partielle Tandemduplikation (PTD) des mixed lineage leukemia (*MLL*)-Gens in 7% der Fälle (Schlenk et al., 2008). Dabei können mehrere dieser genetischen Veränderungen gleichzeitig auftreten. Abbildung 1 verdeutlicht die molekulare Heterogenität der Gruppe der AML-Patienten mit normalem Karyotyp.

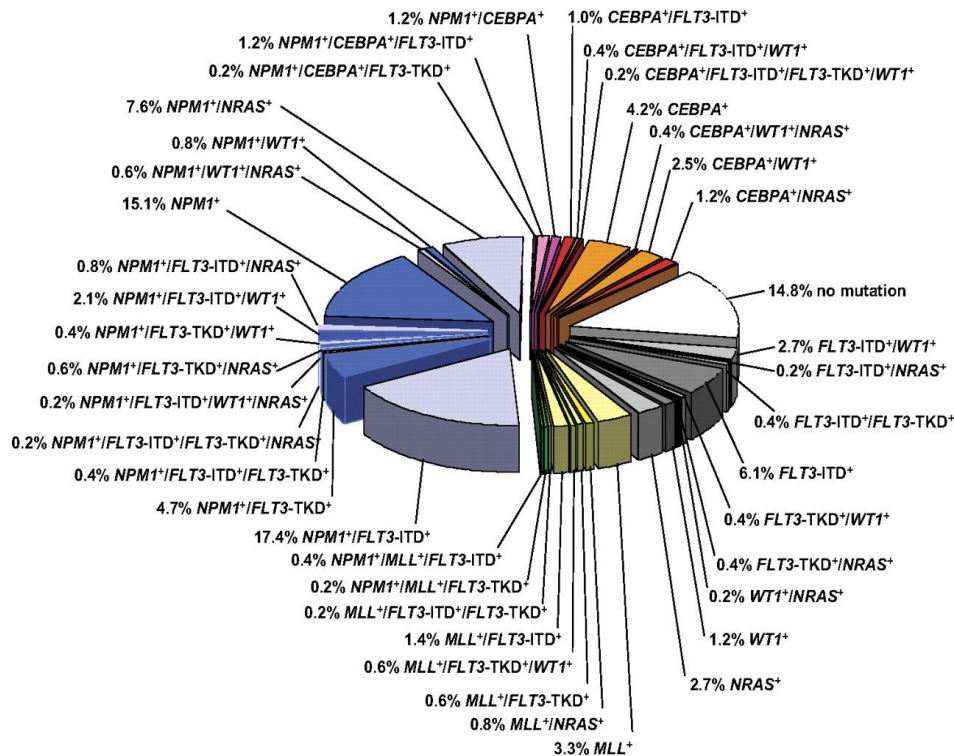


Abbildung 1: Kreisdiagramm zur Darstellung der molekularen Heterogenität der akuten myeloischen Leukämie mit normalem Karyotyp, basierend auf Mutationen des *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *FLT3* (ITD und TKD- Mutationen an D835 und I836), *NRAS* und *WT1*-Gen.

(Döhner et.al., 2010)

Blau: *NPM1*-Mutationen, orange/rot: *CEBPA*-Mutationen, gelb/grün: *MLL*-Mutationen, grau: keine Mutation der Klasse II, weiß: keine der genannten Mutationen. Die Daten basieren auf Analysen von 485 erwachsenen AML-Patienten der AMLSG Ulm mit normalem Karyotyp. Abkürzungen: AML = akute myeloische Leukämie; AMLSG = AML-Studiengruppe; *CEBPA* = CCAAT/enhancer-binding protein alpha; *FLT3* = FMS-related tyrosine kinase 3; ITD = internal tandem duplication; *MLL* = mixed-lineage leukemia; *NPM1* = Nucleophosmin 1; *NRAS* = neuroblastoma RAS viral oncogene homolog; TKD = tyrosine kinase domain; *WT1* = Wilms tumor 1.

1.5 Pathogenese der AML

Das derzeit gängige Modell zur Pathogenese der AML ist durch zwei komplementäre Klassen an Mutationen charakterisiert, die koexprimiert sein müssen, um eine akute Leukämie hervorzurufen (Gilliland et al., 2004). Hierbei aktivieren Klasse-I-Mutationen Signaltransduktionskaskaden mit konsekutivem Proliferations- und/oder Überlebensvorteil für hämatopoetische Vorläuferzellen. In einem murinem Knochenmark-Transplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von *FLT3*-ITD (Kelly et al., 2002; Lee et al., 2007) sowie das konstitutiv aktivierte *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*)-Gen (Chan et al., 2003) einen myeloproliferativen Phänotyp hervorriefen, beide alleine jedoch nicht ausreichten, um das Vollbild einer AML zu verursachen. Weitere Beispiele

für Klasse-I-Mutationen sind *FLT3*-TKD, *KIT* und *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS)*-Mutationen (Gilliland u. Griffin, 2002b).

Bei den Klasse-II-Mutationen sind Transkriptionsfaktoren oder Bestandteile des Koaktivierungskomplexes der Transkription mutiert und beeinträchtigen überwiegend die Zelldifferenzierung. Ein Beispiel hierfür ist die Translokation *t(8;21)(q22;q22)* mit Expression des Fusionsgens *RUNX1/RUNX1T1* (*runt-related transcription factor*), die im Mausmodell zur Anhäufung unreifer myeloischer Vorläuferzellen (Fenske et al., 2004; de Guzman et al., 2002) führt. Per se sind jedoch auch Klasse-II-Mutationen nicht ausreichend, um eine AML im Mausmodell zu verursachen (Schessl et al., 2005).

Äquivalente Auswirkungen hinsichtlich der Zelldifferenzierung können bei der Expression des Fusionsproteins *PML/RARA* bei der Translokation *(15;17)(q22;q12)* beobachtet werden (Grisolano et al., 1997; He et al., 1997). Weitere Klasse-II-Mutationen sind *HOX*-Fusionsgene (Dash u. Gilliland, 2001), *MLL*-Fusionsgene (Gilliland u. Griffin, 2002a), *CEBPA*-Mutationen (Pabst et al., 2001) und sehr wahrscheinlich auch *NPM1*-Mutationen (Döhner, 2007).

Nach diesem Pathogenese-Modell der AML führt nur die Koexistenz der beiden Mutationsklassen zur Ausbildung einer AML. So konnte die funktionelle Interaktion von einer Klasse-I-Mutation wie die *FLT3*-ITD mit einer Klasse-II-Mutation wie dem Fusionsgen *RUNX1/RUNX1T1* an einem „in vivo“ Mausmodell nachgewiesen werden, da nur durch das gemeinsame Auftreten beider Mutationen eine aggressive akute Leukämie induziert werden konnte, durch eine einzelne Mutation jedoch nicht (Schessl et al., 2005).

Demnach werden Aberrationen, die einen Proliferationsvorteil und/ oder Überlebensvorteil der Zellen verursachen, komplementiert von weiteren Veränderungen, die eine normale Zelldifferenzierung verhindern und damit letztlich den Phänotyp der AML bedingen (Dash u. Gilliland, 2001).

Die zunehmende Erforschung von molekulargenetischen Markern führt nicht nur zur besseren Risikostratifizierung der Patienten und somit zu besseren therapeutischen Optionen und der Möglichkeit prognostischer Vorhersagen, sondern ermöglicht auch ein zunehmendes Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung.

1.6 Die Rezeptortyrosinkinase *FLT3*

Eine der häufigsten Mutationen mit prognostischer Bedeutung bei AML sind aktivierende Mutationen des *FLT3*-Gens, welches für den FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*)-Rezeptor kodiert. Dieses Gen liegt auf Chromosom 13q12-q13 (Carow et al., 1995) und besteht aus insgesamt 24 Exons, mit jeweils einer Größe zwischen 83 und 562 Basenpaaren (Abu-Duhier et al., 2001). Das gesamte Gen besteht auf genomischer Ebene aus etwa 100 Kilobasenpaaren und kodiert für ein Protein aus 993 Aminosäuren (Rosnet et al., 1991).

Der *FLT3*-Rezeptor, auch bekannt als fetal liver kinase 2 (*FLK2*) oder stem cell kinase 1 (*STK1*), gehört zur Gruppe III der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Diese membrangebundenen Rezeptoren sind durch fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen in der extrazellulären Region charakterisiert, eine transmembranäre Domäne (TMD), eine zytoplasmatische juxtamembranäre Domäne (JMD) und eine Tyrosinkinase-Domäne (TKD), welche durch ein Kinase-Insert (KI) in zwei Teile (TK1 und TK2) geteilt ist (Agnès et al., 1994; Rosnet et al., 1991). Zur Gruppe der Wachstumsfaktor-Rezeptoren zählen neben *FLT3* auch *c-KIT* (Rezeptor für stem cell factor), *c-FMS* (Rezeptor für macrophage colony-stimulating factor) sowie *PDGFR* (platelet derived growth factor receptor) A und B (Matthews et al., 1991).

Tyrosinkinase-Rezeptoren werden durch Bindung von Liganden aktiviert und wandeln extrazelluläre Signale in intrazelluläre um. Durch Bindung des *FLT3*-Liganden (FL) an die extrazelluläre Domäne kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors, Stabilisierung der offenen Konformation des Rezeptors und anschließender Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste (Turner et al., 1996). Dies führt zur Aktivierung der *FLT3*-Kinase und nachgeschalteter Signalwege über STAT5, RAS/mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT (Zhang et al., 2000). Dies resultiert in einer Zellproliferation und -aktivierung.

Als Kontrollmechanismus der Aktivierung steht die Funktion der juxtamembranären Domäne zur Verfügung. Durch Tyrosin-Phosphatasen, welche die Tyrosinreste in der JM-Domäne wieder dephosphorylieren, kann diese Domäne ihre autoinhibitorische Struktur annehmen. In dieser Konformation hemmt die

JM-Domäne während der inaktiven Phase des Rezeptors die katalytische Funktion der Kinasen-Domäne (Griffith et al., 2004; Chan et al., 2003).

Der *FLT3*-Rezeptor wird überwiegend in unreifen Zellen der Hämatopoese wie $CD34^+$ -Zellen und lymphatischen Vorläuferzellen exprimiert, jedoch auch in Zellen der Plazenta, der Gonaden und des Gehirns (Maroc et al., 1993). Er spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und im Immunsystem. Neben der Stammzellproliferation und Aufrechterhaltung des Stammzellpools ist er bei der Differenzierung von Zellen, sowohl der hämatopoetischen als auch der lymphatischen Reihe, ein wichtiger Bestandteil (Christensen u. Weissman, 2001; Adolfsson et al., 2001; Sitnicka et al., 2003). In der Untersuchung von McKenna et al. (2000) am Mausmodell zeigte sich bei fehlendem *FLT3*-Liganden eine verminderte Hämatopoese mit niedrigen hämatopoetischen Vorläuferzellen, niedrigen dendritischen Zellen und niedrigen Killerzellen. Harada et al. (2007) konnten im in-vitro Zellkultursystem nachweisen, dass *FLT3* mit seinem Liganden die Proliferation von $CD34^+$ -Zellen sowie den Reifungsprozess von dendritischen Vorläuferzellen unterstützt.

Zusammengefasst spielt der *FLT3*-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von hämatopoetischen Zellen.

1.7 *FLT3* bei der AML

Neben der physiologischen *FLT3*-Expression auf hämatopoetischen Vorläuferzellen zeigen leukämische Blasten eine hohe Expression von *FLT3*. So sind in mehreren Studien bei 70 bis 100% der AML-Patienten, B-ALL, einem Teil der T-ALL und bei CML hohe Expressionslevel nachweisbar (Drexler, 1996; Rosnet et al., 1996). Sowohl *FLT3*-RNA als auch *FLT3*-Protein waren in der Studie von Carow et al. (1996) bei AML- und ALL-Patienten im Gegensatz zu gesundem Knochenmark erhöht. Die meisten der myeloischen Leukämiezellen zeigen entweder vermehrt *FLT3* oder *FLT3*-Ligand. Kuchenbauer et al. (Kuchenbauer et al., 2005) untersuchten mittels „Real Time PCR“ *FLT3* Transkriptions-Level. Hierbei konnte eine hohe Expression von *FLT3* bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Knochenmarkspendern nachgewiesen werden, die signifikant mit der Anzahl myeloischer Blasten sowie der Leukozyten korrelierte.

Da die Stimulation von *FLT3* durch seinen Liganden auch zur Proliferation von leukämischen Blasten führt und zudem einen antiapoptotischen Effekt zeigt, spielt *FLT3* eine wichtige Rolle bei AML (Drexler, 1996), vor allem wenn Mutationen von *FLT3* die physiologische Funktion stören (Minden et al., 1996).

1.8 Interne Tandemduplikationen des *FLT3*-Rezeptors

Bei etwa 30% der Patienten mit AML lassen sich Mutationen des *FLT3*-Gens nachweisen. Hierbei finden sich drei aktivierende Mutationen: interne Tandem-Duplikationen des *FLT3*-Gens (*FLT3*-ITD) in 20 - 25% der erwachsenen AML-Patienten, Punktmutationen in der Tyrosinkinase-Domäne (*FLT3*-TKD) bei etwa 7% der AML-Patienten (Thiede et al., 2002) sowie Punktmutationen der juxtamembranären Domäne in etwa 2% (*FLT3*-JM-PM) (Reindl et al., 2006).

FLT3-ITDs sind in-frame Duplikationen mit einer Größe von 3 bis über 400 Basenpaare, wobei die Duplikationen immer ein Vielfaches von drei Basenpaaren darstellen (Abu-Duhier et al., 2000; Meshinchi et al., 2001). Diese befinden sich in den Exons 14 und 15 des *FLT3*-Gens (Kiyoi et al., 1998). Bislang war man der Ansicht, dass *FLT3*-ITDs ausschließlich in der JM-Domäne inserieren, jedoch konnte unsere Arbeitsgruppe und andere (Kayser et al. 2009; Breitenbücher et al. 2009) nachweisen, dass etwa 30% der ITDs außerhalb der JM-Domäne inserieren, und zwar überwiegend im B1-Faltblatt der TKD1. Hierbei konnte unsere Arbeitsgruppe (Kayser et al., 2009) nachweisen, dass AML-Patienten mit einer ITD-Insertionsstelle im B1-Faltblatt ein signifikant schlechteres rezidivfreies und Gesamtüberleben aufweisen im Vergleich zu allen anderen Insertionsstellen. Breitenbücher et al. (2009a) konnten nachweisen, dass eine Insertionsstelle außerhalb der JM-Domäne zur Hoch-Regulation des anti-apoptotischen Proteins MCL1 führt, welches möglicherweise zur Therapieresistenz beiträgt.

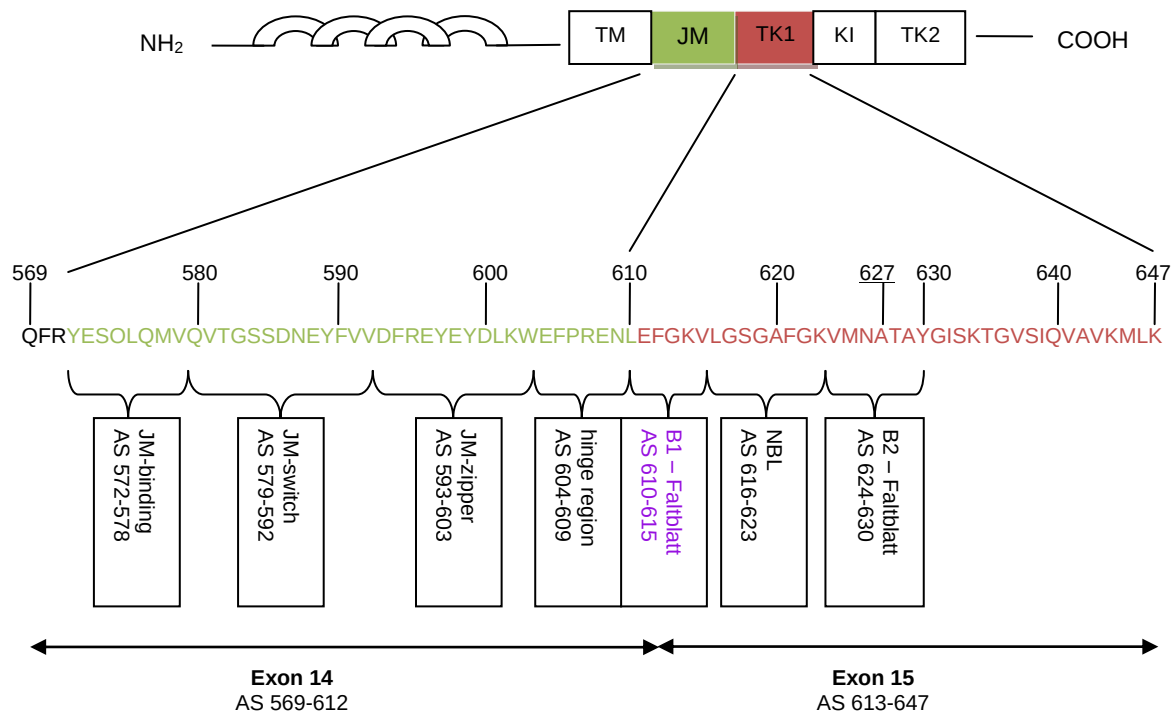


Abbildung 2: Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors (Breitenbuecher et al., 2009b; Kayser et al., 2009).

Einteilung in die 5 immunoglobulin-ähnliche Domänen mit ihren jeweiligen Untergliederungen; ca. 30% der FLT3-ITD sind in der TK1-Domäne lokalisiert.

Abkürzungen: AS = Aminosäure; JM = juxtamembranäre Domäne; KI = Kinasen Insertion; NBL = nucleotide binding loop; TK1 = Tyrosin-Kinasen-Domäne 1; TK2 = Tyrosin-Kinasen-Domäne 2; TM = transmembranäre Domäne.

Eine FLT3-ITD führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz und bedingt dadurch eine Unterbrechung der Autoinhibition des Rezeptors (Griffith et al., 2004). Hierdurch wird eine ligandenunabhängige Dimerisierung und Autophosphorylierung erreicht und konsekutiv nachgeschaltete Signalkaskaden wie STAT5, RAS/AKT und MAPK aktiviert (Choudhary et al., 2007; Kiyoi et al., 2002; Okamoto et al., 2007; Tse et al., 2000). Hierbei scheint sich der Signaltransduktionsweg einer FLT3-ITD von demjenigen des FLT3-Wildtyps zu unterscheiden (Quentmeier et al., 2003): Im Gegensatz zu mutierten FLT3-Zellen führte der FLT3-Ligand in Wildtyp-Zellen nicht zur Phosphorylierung von STAT5. Choudhary und Mitarbeiter konnten nachweisen (Choudhary et al., 2007), dass STAT5 ein direktes Ziel von FLT3-ITD darstellt, unabhängig von Kinasen aktiviert wird und diese Aktivierung nicht durch SOCS1 (einem Jak Kinasen Inhibitor) gehemmt wird. FLT3-ITDs scheinen hierbei STAT5 in größerem Ausmaß als der Wildtyp zu aktivieren (Rocnik et al., 2006), wobei bei der Aktivierung die Tyrosinreste der Aminosäuren an Position 589 und 591 eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. In einer Publika-

tion von Vempati und Mitarbeiter führten darüber hinaus *FLT3*-ITDs mit einer Duplikationen von Arginin der Aminosäurenposition 595 ebenfalls zur STAT5-Aktivierung, sowie zum Wachstum von Ba/F3-Zellen. Diese finden sich bei 77% der *FLT3*-ITD-positiven Patienten (Vempati et al., 2007).

Durch Aktivierung von STAT5 und *RAS* werden CD32-Zellen zu Wachstum und Transformation angeregt (Mizuki et al., 2000). *FLT3*-ITDs führen ligandenunabhängig zu gesteigerter unkontrollierter Zellproliferation, fehlender Zelldifferenzierung und fehlender Apoptose (Kelly et al., 2002).

Klinisch sind *FLT3*-ITD mit erhöhter Leukozyten- und Blastenzahl in Blut und Knochenmark (Fröhling et al., 2002a) assoziiert und finden sich sowohl in Blasten als auch in Stammzellen (Levis et al., 2005). Jedoch kann *FLT3*-ITD nicht in normalen hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden. *FLT3*-ITDs treten hauptsächlich bei der AML (insbesondere de novo AML) aber auch beim Myelodysplastischen Syndrom und selten auch bei der ALL (Yokota et al., 1997; Fenaux, 2001) auf.

Weiterhin lassen sich *FLT3*-ITDs insbesondere bei Patienten mit einem normalen Karyotyp nachweisen sowie bei der APL mit einer balancierten Translokation t(15;17)(q22;q12) (Nakao et al., 1996; Kottaridis et al., 2001; Schnittger et al., 2002). Die AML mit einem normalen Karyotyp ist mit einer ungünstiger Prognose assoziiert (Schlenk et al., 2008).

1.9 Prognostische Bedeutung der *FLT3*-ITD bei AML

In verschiedenen Publikationen konnte für *FLT3*-ITD eine erhöhte Rezidivrate und eine deutlich schlechtere Rate an progressionsfreiem Überleben nachgewiesen werden (Kiyoi et al., 1999; Rombouts et al., 2000; Abu-Duhier et al., 2000; Kottaridis et al., 2001). In einigen Publikationen war darüber hinaus auch ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (Fröhling et al., 2002a; Kottaridis et al., 2001) nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Prognose finden sich ebenfalls in pädiatrischen Studien (Iwai et al., 1999; Zwaan et al., 2003). Bei Patienten mit einer *FLT3*-ITD und einem normalen Karyotyp lassen sich möglicherweise weitere Unterschiede im Hinblick auf die Prognose nachweisen. Unter anderem scheint die Länge der *FLT3*-ITD eine Rolle hinsichtlich der Prognose zu spielen. In ver-

schiedenen Publikationen werden hierzu jedoch kontroverse Ergebnisse diskutiert: In einer Studie an 151 AML-Patienten konnte ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben (RFS) nachgewiesen werden, bei einer *FLT3*-ITD Länge von mehr als 40 Nukleotiden (Stirewalt et al., 2006). In zwei weiteren Untersuchungen konnte hingegen ein signifikant besseres Überleben für längere *FLT3*-ITDs bzw. keine prognostische Signifikanz nachgewiesen werden (Kusec et al., 2006; Ponziani et al., 2006; Gale et al., 2008).

Darüber hinaus scheint auch das Verhältnis der Mutation zum Wildtyp von prognostischer Bedeutung zu sein. Erste Hinweise hierzu lieferten im Jahre 2001 Kottaridis et al. und Whitman et al. (Kottaridis et al., 2001; Whitman et al., 2001) sowie Thiede et al. (Thiede et al. 2002). Letztere setzten 2002 mit ihren Untersuchungen einen Schwerpunkt auf die Quantifizierung und bekräftigten die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Kottaridis und Whitman. Kottaridis et al. war eine der ersten Arbeitsgruppen, welche sowohl die Anzahl als auch das Verhältnis der Mutation zum Wildtyp beschrieben. Sie zeigten, dass bei 23% der ITD positiven Patienten mehr als eine Mutation nachgewiesen werden konnte, und die Anzahl der Mutationen der wichtigste unabhängige Faktor für die Remissionsrate und das krankheitsfreie Überleben und nach der Zytogenetik der zweitwichtigste Faktor für das ereignisfreie Überleben und Gesamtüberleben war. 10% der ITD-positiven Patienten wiesen einen partiellen oder kompletten Verlust des Wildtyp-Allels auf. Diesen Verlust konnten auch Whitman et al. (Whitman u. a., 2001) in 35% der *FLT*-ITD-positiven Patienten nachweisen. Nach Einteilung der Patienten in drei Gruppen anhand der Mutationsratio (Wildtyp, heterozygot, homozygot) wiesen homozygote (hohe Mutationsratio) *FLT3*-ITD Patienten die schlechteste Prognose mit einem schlechterem erkrankungsfreien Überleben und schlechterem Gesamtüberleben auf.

Ein Jahr später konnten Thiede et al. (Thiede et al., 2002) in ihrer Studie an 979 Patienten (Alter < 60 Jahre) mit neu diagnostizierter AML (alle Karyotypen) mittels GeneScan-Fragmentanalyse den Mutationslevel quantifizieren und die Bedeutung der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio mit Hilfe eines cut-offs herausarbeiten. In ihrer Arbeit verwiesen sie jedoch auf die Notwendigkeit, weitere Studien zur Beurteilung des prognostischen Wertes der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio durchzuführen. Als cut-off-point wurde der Median der Ratio von Mutante zu Wildtyp definiert. Dieser lag bei

0,78. Es wurde ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit einem *FLT3*-ITD/WT-Verhältnis oberhalb einer Ratio von 0,78 nachgewiesen. Desweiteren wurde bei weiterer Untergliederung (< 25. Perzentile, zwischen 26. und 74. Perzentile und >75. Perzentile) gezeigt, dass mit ansteigender Ratio die Prognose der Patienten schlechter wird.

Auch bei Gale et al. (2008) findet sich ein signifikanter Trend zur Verschlechterung des krankheitsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens sowie des Rezidivrisikos bei steigendem *FLT3*-ITD/Wildtyp-Verhältnis. In der multivariaten Analyse war die Ratio der *FLT3*-ITD sogar ein stärkerer Prognosefaktor als der Karyotyp. Gale et al. führten ihre Untersuchungen wie Thiede et al. an AML-Patienten aller Karyotypen durch, definierten ihre Cut-offs jedoch different: hier wurden die 1425 Patienten nicht anhand des Medians, sondern in drei Gruppen, nämlich *FLT3*-ITD/WT <25%, *FLT3*-ITD/WT 25-50% und *FLT3*-ITD/WT >50% für die Analysen unterteilt. Die Ergebnisse waren jedoch bezüglich des Einflusses des Mutante/Wildtyp-Levels im Einklang.

Somit spielt nach heutigem Wissenstand nicht nur das Vorhandensein einer *FLT3*-ITD, sondern auch die Menge des mutierten Allels eine Rolle.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

FLT3-ITDs sind sehr heterogen, was ihre Länge, das Verhältnis der Mutation zum Wildtyp, die Insertionsstelle sowie die Anzahl der einzelnen Klone pro Patient betrifft. Derzeit ist noch nicht geklärt, ob die ungünstige Prognose einer *FLT3*-ITD durch ihre reine Anwesenheit oder durch ihre biologischen Unterschiede oder durch andere bislang nicht bekannte genetische Läsionen verursacht wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erwachsene AML-Patienten (im Alter von 16 bis 60 Jahren) mit normalem Karyotyp aus den drei konsekutiven multi-zentrischen Behandlungsstudien AML HD93, AML HD98-A und AMSG 07-04 der AML-Studiengruppe (AMLSG) mit Hilfe molekulargenetischer Analysen auf interne Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens untersucht. Folgende Fragestellungen sollten hierbei bearbeitet werden:

- Die Ermittlung der Inzidenz von *FLT3*-ITD bei der AML mit normalem Karyotyp.
- Der Vergleich der beiden Methoden konventionelle PCR und GeneScan-Analyse zur Detektion von *FLT3*-ITD Mutationen.
- Die Quantifizierung des mutierten Allels bzw. die Bestimmung der Ratio aus mutiertem Allel und Wildtyp-Allel.
- Die Evaluation der prognostischen Bedeutung der Mutante/Wildtyp-Ratio.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien- und Geräteverzeichnis

Material	Hersteller
10x Blue Juice Gel loading buffer	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
10x Genetic Analyser Buffer mit EDTA	Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarose ROTI GAROSE	Carl Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
DNAzol-Reagenz	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR	GradRoche Diagnostics GmbH, Penzberg
Ethanol (70% / 100%)	RdH, Seelze
Ethidiumbromidlösung	Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich
Foreward-Primer FLT3-11F	Thermo Electron GmbH, Ulm
GeneScan-500 ROX Standard	Applied Biosystems, Foster City, USA
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Foster City, USA
Hot Star Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
10x Puffer mit 15 mM MgCl ₂	
5x Q-Solution	
HPLC-Wasser (Li-Chrosolv Wasser)	Merck, Darmstadt
Performance Optimized Polymer 6%	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ready-load 100bp DNA-ladder	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
Reverse-Primer FLT3-12R	Thermo Electron GmbH, Ulm
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim

TAE-Puffer (1x)	USB, Cleveland, USA
100% Essigsäure	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Tris-Acetate	USB, Cleveland, USA

Gerät / Computersoftware

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
 BioPhotometer 6131
 Blockthermosat digital

Computersoftware:

Data Collection Software
 GeneScan Analysis 2.0.2 Software
 SAS 6.12
 StatXact

Electrophoresis Power Supply 301
 GeneAmp PCR System 2700

GeneGenius, Transilluminator 8000-Systems
 Mikrowelle
 MR 3002 Magnetrührer
 Power Macintosh Computer 7500/100
 Thermomixer 5437
 Vortex Reax 1
 Waage: Precisa 220M
 Zentrifuge: Biofuge fresco

Hersteller

Applied Biosystems, Darmstadt
 Eppendorf, Hamburg
 Grant Instruments Ltd., Cambridge,
 Großbritannien

Applied Biosystems, Foster City,
 USA

SAS Institute Inc., Cary, USA
 Cytel Software Corp., Cambridge
 Amersham pharmacia biotech
 Applied Biosystems, Foster City,
 USA

Syngene, USA
 Siemens, München
 Heidolph, Schwabach
 Apple Computer, Ismaning
 Eppendorf, Hamburg
 Heidolph, Schwabach
 Oerlikon AG, Zürich, Schweiz
 Heraeus Instruments, Osterode

2.1.2 Patientenkollektiv und Therapie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwischen Januar 2008 und Februar 2010 264 DNA-Proben von Patienten mit AML und normalem Karyotyp im Alter von 16 bis 60 Jahren analysiert. Alle Patienten waren in einer der drei prospektiven multi-zentrischen Phase-II/III-Studien AML HD93 (n=8), AML HD98-A (n=86) oder der AMLSG 07-04 (n=170) eingeschlossen und wurden im Rahmen der jeweiligen Studie therapiert. Hiervon hatten 236 Patienten (89%) eine de novo AML, 9 Patienten (3%) eine s-AML nach einem myelodysplastischen Syndrom und 12 Patienten (4,5%) eine t-AML infolge der Behandlung eines Primärmalignoms. Bei 7 Patienten lagen diesbezüglich keine Daten vor. Die Diagnose einer AML beruhte in allen drei Studien auf morphologischen, zytochemischen und immunphänotypischen Analysen. Diese wurden anhand der Kriterien der French-American-British Cooperative Group (FAB) (Bennett et al., 1985) und ab 2004 anhand der WHO-Kriterien (Vardiman et al., 2002) beurteilt.

Alle Patienten wurden über die Therapie, die jeweiligen Studienmodalitäten und die Kryokonservierung ihrer Knochenmark- bzw. Blutproben aufgeklärt und bestätigten schriftlich ihr Einverständnis zur Studienteilnahme gemäß der Deklaration von Helsinki.

Therapie

Bei allen drei Studien basierte die Therapie auf einer Doppelinduktionstherapie mit nachfolgender risikoadaptierter Postremissionstherapie.

Im Rahmen der AML HD93 bestand die Doppelinduktionstherapie aus ICE (Idarubicin 12 mg/m² i.v. an Tag 1, 3 und 5; Cytosin-Arabinosid 100 mg/m² kontinuierlich i.v. an den Tagen 1 bis 7; Etoposid 100 mg/m² i.v. an den Tagen 1 bis 3). Der Remissionsstatus wurde vor jedem neuen Therapiezyklus anhand einer Knochenmarkspunktion erhoben. Bei Patienten in kompletter oder partieller Remission wurde zwischen Tag 21 und 28 ein zweiter Zyklus ICE durchgeführt. Patienten mit einer refraktären Erkrankung (keine Blastenreduktion <50% im Knochenmark gegenüber dem Ausgangswert, bzw. persistierende extramedulläre Manifestationen) erhielten eine salvage Therapie mit einem Zyklus HAM wie unten beschrieben. Nach Rekonstitution erhielten Patienten in kompletter Remission

(CR; KMP: <5% Blasten) eine Konsolidierungstherapie mit HAM (Hochdosis-Cytosin-Arabinosid 3 mg/m² i.v. alle zwölf Stunden von Tag 1 bis 3 und Mitoxantron 12 mg/m² i.v. an Tag 2 und 3) sowie G-CSF (Granulozyten colony-stimulating factor 5 µg/kg/d von Tag 5 bis maximal Tag 43). Im Anschluss erfolgte eine risikoadaptierte intensivste Konsolidierungstherapie nach zytogenetischem Befund.

Patienten der zytogenetisch definierten niedrigen Risikogruppe Translokationen t(8;21), t(15;17), t(16;16) und mit inv(16) sowie alle Patienten zwischen 55 und 60 Jahren erhielten einen zweiten Zyklus HAM. Der intermediären Risikogruppe (Patienten mit normalem Karyotyp) wurde bei Verfügbarkeit eines HLA-identen Familienspenders allogenes Knochenmark transplantiert. Alternativ erfolgte ein Zyklus mit S-HAM (Hochdosis-Cytosin-Arabinosid 3 mg/m² i.v. alle zwölf Stunden an Tag 1, 2, 8 und 9, Mitoxantron 10 mg/m² an Tag 3, 4, 10 und 11). Patienten der Hoch-Risikogruppe (alle anderen numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen) wurden bei Verfügbarkeit eines passenden Spenders so früh wie möglich einer allogenen oder autologen Knochenmarkstransplantation unterzogen.

AML HD98-A: Patienten dieser Studie erhielten wie in der Studie AML HD93 zwei Induktionszyklen ICE und die erste Konsolidierungstherapie mit HAM. Im Folgenden unterschied sich die Therapie im Gegensatz zu AML HD93: Zur intermediären Risikogruppe zählten neben Patienten mit normalem Karyotyp auch Patienten mit inv(16), t(v;11)(v;q23) und anderen Aberrationen. Patienten mit normalem Karyotyp bekamen randomisiert entweder einen Zyklus HAM oder eine autologe Stammzelltransplantation nach myeloablativer Therapie (Ganzkörperbestrahlung / Cyclophosphamid oder Busulfan / Cyclophosphamid). Bei HLA-identischem Spender wurde eine allogene Knochenmarkstransplantation angestrebt. Lag kein normaler Karyotyp vor, wurde den Patienten entweder allogene oder autologe Knochenmark transplantiert. Zur Hoch-Risikogruppe zählten hier abn(3q), -5/5q-, -7/7q-, abn(12p), abn(17p) und komplexe Karyotypen. Bei diesen Patienten war eine allogene Knochenmarkstransplantation intendiert.

AMLSG 07-04: Auch in dieser Studie erhielten alle Patienten zunächst randomisiert eine Doppelinduktionstherapie mit entweder ICE (Idarubicin 12 mg/m² i.v. an Tag eins, drei und fünf, Cytarabin 100 mg/m² kontinuierlich i.v. von Tag 1 bis 7, Etoposid 100 mg/m² i.v. von Tag 1 bis 3) oder ICE mit ATRA (zusätzlich All-trans-

Retinsäure 45 mg/m² p.o. an Tag 6 bis 8 und ATRA 15 mg/m² p.o. an Tag 9 bis 21). Patienten mit einer CR, CRi oder PR nach dem ersten Zyklus starteten mit dem zweiten Induktionszyklus ICE bzw. ICE mit ATRA (jedoch Idarubicin 12 mg/m² nur an Tag 1 und 3) zwischen Tag 22 und 29. Lag kein Ansprechen auf den ersten Therapiezyklus vor, wurden die Patienten zur Hoch-Risikogruppe gezählt und wie diese behandelt. Zwischen Tag 36 und 42 begann die Konsolidierungstherapie nach erneuter Evaluation des Therapieansprechens im Knochenmark. Patienten mit niedrigem Risiko (t(8;21), inv(16)/t(16;16)), molekularem Nachweis von *RUNX1-CBFA2T1* oder *CBFB-MYH11*, sowie normalem Karyotyp mit *NPM1*-Mutation ohne Nachweis einer *FLT3*-ITD) erhielten je nach Kohorte und Randomisation drei Konsolidierungszyklen. Kohorte I: Cytarabin 3g/m² 2x/Tag i.v. an Tag 1, 3 und 5; Pegfilgrastim 6 mg s.c. an Tag zehn und je nach Randomisation zusätzlich ATRA 15 mg/m² p.o. von Tag 6 bis 21 und Valproinsäure p.o. mit Zielplasmaspiegel von 100 mg/l. Kohorte II: Cytarabin 3g/m² 2x/Tag i.v. an Tag 1, 2 und 3; Pegfilgrastim 6 mg an Tag 8 und nach Randomisation zusätzlich ATRA 15 mg/m² p.o. von Tag 4 bis 21. Bei Hochrisiko-Patienten mit RD, abn(3q), -5/5q-, -7/7q-, abn(12p), abn(17p), komplexem Karyotyp (mehr als drei chromosomale Aberrationen) oder *FLT3*-ITD war eine allogene oder autologe Knochenmarkstransplantation intendiert. Alle anderen Patienten wurden zu der intermediären Risikogruppe gezählt. Bei diesen wurde eine allogene Knochenmarkstransplantation vom HLA-identen Familienspender angestrebt oder alternativ eine Behandlung mit den oben beschriebenen Konsolidierungszyklen.

2.1.3 Zytogenetische und molekulargenetische Charakterisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit normalem Karyotyp auf das Vorhandensein von *FLT3*-ITD analysiert. Die zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen wurden in einem der beiden zentralen Referenzlaboren der AMLSG durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Diagnose wurden hierfür heparinisierte KM- und PB-Proben von den Patienten entnommen und zur zytogenetischen und molekularen Diagnostik von den teilnehmenden Zentren zu den zentralen Referenzlaboren versandt. Im Rahmen der beiden Studien AML HD93 und AML HD98-A wurden die Analysen im zentralen Referenzlabor der AMLSG Ulm durchgeführt. Bei der AMLSG 07-04 erfolgten die zytogenetischen und molekulargenetischen Analysen zusätzlich in der Medizinischen Hochschule Hannover.

Der Karyotyp wurde anhand der konventionellen Chromosomenbänderung bestimmt und vorhandene Chromosomenaberrationen nach den Richtlinien des International System for Cytogenetic Nomenclature (ISCN; (Mitelman, 1995)) beschrieben. Ergänzend zur zytogenetischen Analyse wurden molekularzytogenetische Analysen mittels „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“ (FISH; (Fröhling et al., 2002b)) mit spezifischen Sonden zur Detektion der wichtigsten Chromosomenaberrationen, Western-Blot-Analysen sowie Polymerase-Kettenreaktion und Frequenzanalysen durchgeführt.

Molekulargenetisch wurden alle Proben auf aktivierende *FLT3*-Mutationen (ITD und TKD) sowie auf Mutationen des *NPM1*-Gens untersucht (Döhner et al., 2005).

2.1.4 Materialgewinnung

Alle Proben wurden zum Zeitpunkt der Diagnose vor Beginn der Chemotherapie entnommen. Knochenmark- (KM-) Proben wurden durch Punktion des Beckenkamms und Proben aus peripherem Blut (PB) durch Venenpunktion gewonnen. Unmittelbar nach der Probenentnahme wurden diese mit Heparin-Natrium versetzt (im Verhältnis Heparin-Natrium : KM 1:10 bzw. Heparin-Natrium : Blut 1:20). Zur Selektion mononukleärer Zellen für molekulargenetische Analysen wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Zur Aufbewahrung der Proben wurden diese bei -80 °C eingefroren.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Um eine Untersuchung der Patientenproben durchzuführen, musste zunächst eine Isolierung der DNA aus den mononukleären Zellpellets aus KM- bzw. PB-Proben erfolgen. Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden aufgetaut und mit 2 ml DNAzol-Reagenz (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) vermischt, um das Pellet zu lösen und Zellwandbestandteile zu lysieren. Mit 2 ml 100% Alkohol (RdH, Seelze) wurde die DNA ausgefällt und die kondensierte DNA vorsichtig in 2-ml-Tubes pipettiert. Darauf wurde die Probe 15 min (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Osterode) bei 4 °C und 13.000 U/min zentrifugiert, wodurch sich die DNA am Boden des Tubes ablagerte. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment zweimalig mit 1 ml 70% Alkohol gewaschen sowie 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur und offenem Deckel wurde das nun getrocknete Pellet in ca. 200 µl destilliertem Wasser (Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen) resuspendiert und über Nacht im Thermomixer (Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg) bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben kurz zentrifugiert und anschließend gepoolt, um möglichst viel gelöste DNA zu erhalten.

Um die Reinheit der Proben zu sichern, wurde 5 µl RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben und unter Abdeckung durch eine Alufolie 30 min auf dem Thermomixer bei 37 °C inkubiert, anschließend kurz zentrifugiert und die Absorption mit Hilfe eines Photometers (BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg) gemessen. Hierfür wurden 3 µl Probe mit 67 µl destilliertem Wasser verdünnt und nach Eichung des Photometers mittels destillierten Wassers gemessen. Als Maß der Reinheit diente die Relation von OD 260/ OD 280 (optical density für DNA von 260 nm und RNA von 280 nm), wobei Werte zwischen 1,50 und 2,37 auftraten. Zur Messung der DNA-Konzentration wurde die OD 260 herangezogen mit Werten zwischen 0,014 µg/µl und 3,21 µl/µl.

Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

2.2.2 Nachweis interner Tandemduplikationen mittels konventioneller PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der raschen *in-vitro* Vervielfältigung von geringen Mengen spezifischer DNA (Mullis et al., 1992). Einer thermostabilen DNA-Polymerase / Taq-Polymerase, (Saiki et al., 1988) werden als Ansatzpunkte (Primer) für die Synthese zwei für das interessierende Gen spezifische Oligonukleotide angeboten. In sich wiederholenden Zyklen von DNA-Denaturierung, Primer-DNA-Bindung und DNA-Kettenelongation wird die zwischen den beiden Primern liegende Sequenz in Gegenwart der thermostabilen DNA-Polymerase und der DNA-Vorstufen (die vier Desoxynucleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP) exponentiell amplifiziert. Hierbei erfolgt die Vermehrung bei der üblichen Zyklenzahl von 30 etwa milliardenfach. In dieser Arbeit fand die PCR zwei Anwendungsbereiche. Zum einen diente sie dem Nachweis von internen Tandemduplikationen (ITD) des *FLT3*-Gens auf konventionelle Weise, zum anderen wurden die PCR-Produkte in die anschließende GeneScan eingesetzt (siehe 2.2.4).

Das *FLT3*-Gen wurde mittels PCR und der dabei verwendeten Oligonukleotid-Primer 11F und 12R nach Angaben von Kiyoi et al. (1997) vervielfältigt.

DNA-Proben dienten als Template für die PCR.

Der PCR-Ansatz enthielt:

- 5 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden)
- 15 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden),
- 10 µl 5x Q-Solution (Qiagen, Hilden) zur Verbesserung des Schmelzverhaltens der DNA,
- 0,5 µl 10 mM dNTP mit jeweils 10 µl von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg),
- je 1 µl forward und reverse Primer (in einer Konzentration von 10 pmol/µl),
- 2,5 U HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) und
- 32 µl Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen).

Als Primer wurden der Foreward-Primer FLT3-11 F (Thermo Electron GmbH, Ulm) und der Reverse-Primer FLT3-12R (Thermo Electron GmbH, Ulm) eingesetzt:

- 11 F: 5'-GCA ATT TAG GTA AAG CCA GC-3'
- 12 R: 5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CC-3'

Um eine Kontamination des PCR-Ansatzes durch DNA ausschließen zu können, wurde bei jeder PCR-Reaktion eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Reagenzien enthielt jedoch ohne DNA-Template.

Die PCR wurde anhand des GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt:

Tabelle 2: Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion

Reaktionsschritt	Temperatur [°Celsius]	Zeit [Minuten]
Initiale Denaturierung	95	10
Denaturierung	95	1
Annealing	56	1
Extension	72	1
Finaler Syntheseschritt	72	10
Abkühlung	4	∞

35 Zyklen

Nach Abkühlung auf 4 °C konnten die PCR-Produkte mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend sichtbar gemacht werden.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die mit Hilfe der PCR vervielfältigte DNA wurde mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Hierbei wanderten die Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu.

Auf ein 4% Agarose-Gel wurden jeweils 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl Gel Loading Buffer (10x BlueJuice, Invitrogen life technologies, Karlsruhe) neben einem 100 Basenpaaren-Längenstandard (Ready-load, Invitrogen life technologies, Karlsruhe) aufgetragen. Das Gel wurde durch Aufkochen (2 min bei 900 W in der Mikrowelle der Firma Siemens, München) von 16 g Agarose (ROTI GAROSE, Carl Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe) in 400 ml 1x TEA-Puffer (Tris-Puffer, USB, Cleve-

land, USA, mit EDTA, Merck, Darmstadt, und Essigsäure, Roth, Karlsruhe) und anschließend Abkühlen zunächst auf einem Magnetrührer (MR 3002, Heidolph, Schwabach) und schließlich im Kammerschlitten hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung wurde in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (Electrophoresis Power Supply 301, Amersham pharmacia biotech) für 3,5 h bei 150 V und 500 mA durchgeführt. Nach anschließender ca. 20-minütiger Färbung in Ethidiumbromidlösung (Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich) konnte die Bandenanordnung der DNA-Fragmente mittels UV-Licht auf einem Transilluminator (Gene Genius, Syngene, USA, Bio Imaging System) sichtbar gemacht werden: das sich in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurde durch das UV-Licht zur Emission von Fluoreszenzstrahlung angeregt. Zur Dokumentation wurde das hierbei gewonnene Bild fotografiert.

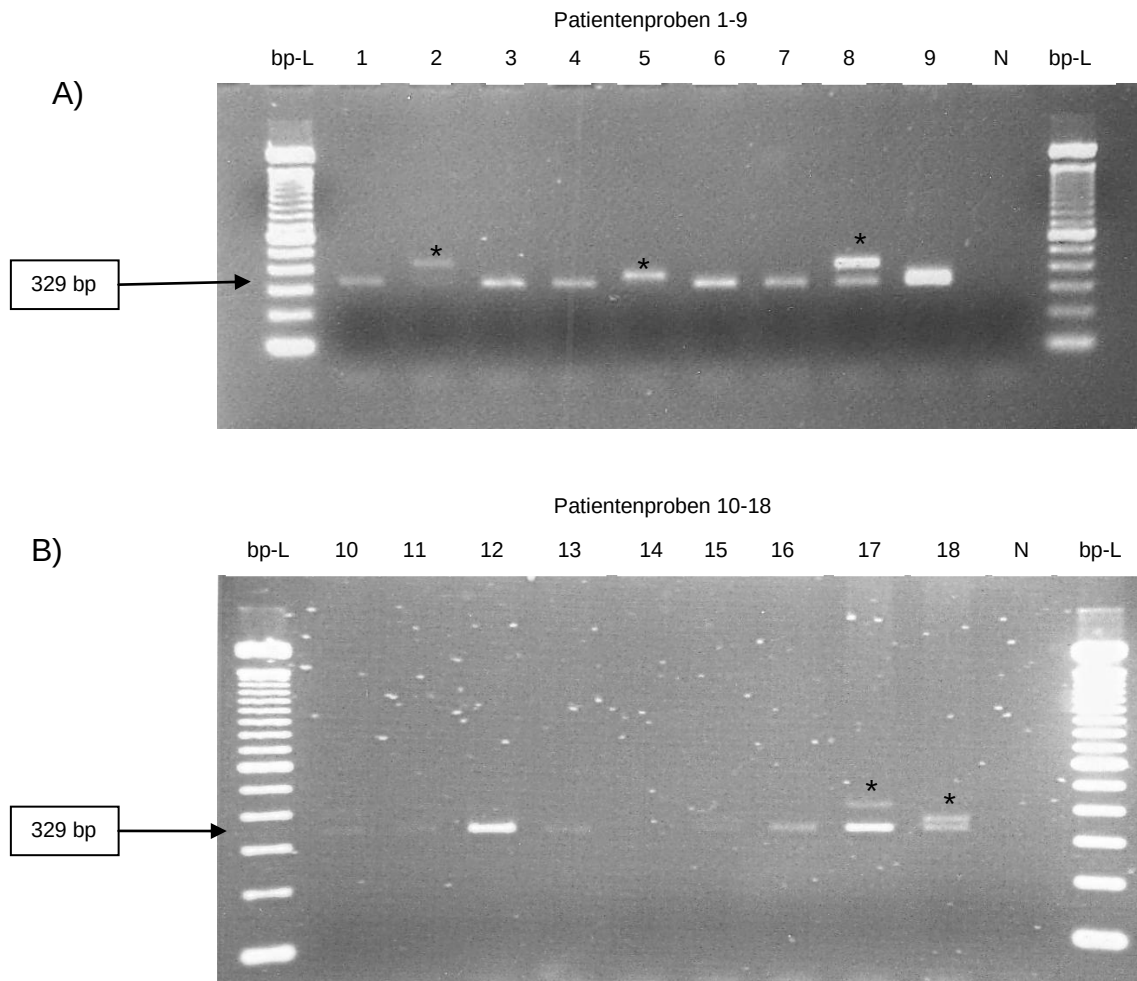


Abbildung 3: Beispiele für Gelelektrophoresen

Ein in zwei Reihen aufgetragenes Gelbild gelelektrophoretisch separierter DNA-Fragmente nach der Polymerase-Kettenreaktion. Hierbei stellt sich bei allen 18 Patientenproben in Höhe von 329 bp der Wildtyp dar (untere Bande durch die Pfeile markiert). Die darüberliegenden Banden (mit * markiert) enthalten entweder die reinen *FLT3*-ITDs oder Heteroduplices aus einer *FLT3*-ITD mit dem Wildtyp. Flankierend ist der 100 bp-Längenstandard dargestellt.

Abkürzungen: bp = Basenpaare; *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; 100bp-L. = 100 Basenpaar-Längenstandard; N = Negativkontrolle.

2.2.4 Nachweis von internen Tandemduplikationen mittels GeneScan-Analyse

Die mittels konventioneller PCR-Analysen gewonnenen Ergebnisse sollten auf ihre Sensitivität im Vergleich zu den Ergebnissen anhand der GeneScan-Analysen verglichen werden.

Während die Sensitivität der konventionellen PCR etwa 0,05 beträgt, weist die Analyse mittels GeneScan eine Sensitivität von 0,02 bis 0,01 auf (basierend auf Verdünnungsreihen). Mögliche Gründe hierfür sind, dass bei Vorhandensein von verschiedenen kleinen *FLT3*-ITD-Klonen bei einem Patienten das konventionelle

Gel die einzelnen *FLT3*-ITD-Fragmente nicht auftrennen kann. Bei einer *FLT3*-ITD mit großer Basenpaarlänge stellt das Hauptproblem eine ineffiziente PCR dar.

FLT3-ITD Gene Scan PCR

Vor der Untersuchung mittels GeneScan musste ebenfalls eine PCR durchgeführt werden, um genügend Kopien des DNA-Fragments zu erhalten. Für die GeneScan-Analyse wurde die DNA-Konzentration der Proben, wie in 2.1.1 beschrieben, bestimmt und die Proben auf eine Konzentration von 5 ng mit destilliertem Wasser verdünnt. Im 50 µl PCR-Ansatz befanden sich 1 µl 5 ng DNA-Template und der wie in 2.2.3 beschriebene HotStar Taq Polymerase Mix. Jedoch musste in dieser PCR-Reaktion der Reverse-Primer 12R für die anschließende Detektion mittels GeneScan am 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Farbstoff versehen sein, um die erwünschten DNA-Fragmente zu markieren. Hier kam 6-FAM (6-carboxy-fluorescein), ein Fluoreszenz-Amidit mit der Kennfarbe Blau, das ein Absorptionsmaximum von 519 nm und einem Emissionsmaximum von 539 nm besitzt, zum Einsatz.

12 R: 5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CC-3'

5': 6-FAM

Nach dem in 2.2.3 beschriebenen PCR-Protokoll wurde die Reaktion durchgeführt und die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Als Gel wurde ein 2% Agarose-Gel (2g Agarose in 100 ml 1x TEA-Puffer) verwendet. Die Elektrophoresedauer betrug 45 bis 60 min bei 100 V und 300 mA. Nach Färbung mit Ethidiumbromid erfolgte die Detektion unter UV-Licht.

Gene Scan-Analyse

Nach Detektion von PCR-Produkten konnten diese für die GeneScan-Analyse vorbereitet werden. Ziel dieser Analysemethode waren der Nachweis, die Größenbestimmung und die Bestimmung der *FLT3*-ITD Ratio.

Hierbei wurden je nach Bandenintensität 1 bis 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl GeneScan-500 ROX Standard (Applied Biosystems, Foster City, USA) und 23 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster City, USA) zur Denaturierung versetzt. Nach Denaturierung auf einem Heizblock (Blockthermosat digital, Grant Instruments Ltd, Cambridge, Großbritannien) für 2 min bei 95 °C und anschließendem

Abkühlen auf Eis wurden die Proben in den ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt) platziert.

Der ABI PRISM 310 ist ein durch einen Mikroprozessor gesteuertes Kapillar-Elektrophorese-Fluoreszenz-Detektions-System, mit dem Fluoreszenz markierte DNA detektiert, deren Fragmentlänge bestimmt und quantifiziert werden kann. Nach Start der Fragmentanalyse wurden die Proben automatisch durch den Autosampler zu einer Glaskapillare, die mit einem spezifischen Polymer (Performance Optimized Polymer 6% (POP-6), Applied Biosystems, Foster City, USA) gefüllt ist, transferiert. Am selben Kapillarende befand sich die Kathode des Systems, am gegenüberliegenden Ende die Anode, eingetaucht in Elektrophoresepuffer (10x Genetic Analyser Buffer mit EDTA, Applied Biosystems, Foster City, USA, verdünnt mit HPLC-Wasser, Merck, Darmstadt, Verdünnung: 1:10). Es folgte die sog. elektrokinetische Injektion: Durch Anlegen einer Spannung für 20 bis 30 s zwischen Kathode und Anode wurde ein Teil der Probe in die Kapillare injiziert. Anschließend wurde das Kathoden-Ende der Kapillare in Puffer getaucht, um mit der Auftrennung fortzufahren. Durch erneutes Anlegen von Spannung wurden die denaturierten DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, indem die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung Anode mit dem Polymer in Interaktion traten und der Größe nach selektiert wurden. Die Auftrennung erfolgte unter konstanten Elektrophoresebedingungen: Spannung von 15,0 kV, Laufzeit von 60 min und konstanter Temperatur. Die Temperatur von 60 °C wurde gewährleistet, indem die Kapillare einer Heizplatte anlag.

Als Detektionssystem kurz vor Ende der Kapillare befand sich ein 10 mW Argon-Ionen-Laser mit Hauptemissionen bei 488 nm und 514,5 nm. Der durch Spiegel auf das Trennsystem gerichtete Laser regte die durch den Laserstrahl laufenden 6-FAM-markierten DNA-Fragmente zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlung an. Diese wurde nach Fokussierung durch eine Linse und anschließender prismatischer Aufspaltung mittels eines Hohlspiegels mit einer CCD-Kamera (charge-coupled device) detektiert.

Die Rohdaten wurden zunächst mit der Data Collection Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) gespeichert und anschließend mit der GeneScan Analysis 2.0.2 Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) auf einem Power Macintosh Computer (7500/100 Apple Computer, Ismaning) analysiert, graphisch darge-

stellt und gespeichert. Die Länge der DNA-Fragmente konnte anhand des in jeder Probe mitlaufenden Standards GeneScan-500 ROX analysiert werden: Jedes Fragment wird mit dem Standard verglichen zu dem Zeitpunkt, an dem es den Laser erreicht. Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung gab Auskunft über die Quantität. In der graphischen Darstellung der erhaltenen Daten konnte die Länge durch die Position und die Quantität durch Berechnung der „area under the curve“ (AUC) (Höhe, Breite und Fläche der Mutations-Peaks im Verhältnis zum Wildtyp-Peak) abgelesen werden. Zur Berechnung der Länge der einzelnen ITD wurde die von GeneScan ermittelte Basenpaar-Anzahl des Wildtyp-Peaks von der Basenpaar-Anzahl des Mutations-Peaks subtrahiert.

Bei Proben, die im GeneScan eine interne Tandemduplikation aufwiesen, jedoch nicht in der konventionellen PCR, wurden zur Verifizierung der Analyse beide Verfahren wiederholt (PCR und Analyse auf ABI PRISM 310 Genetic Analyser).

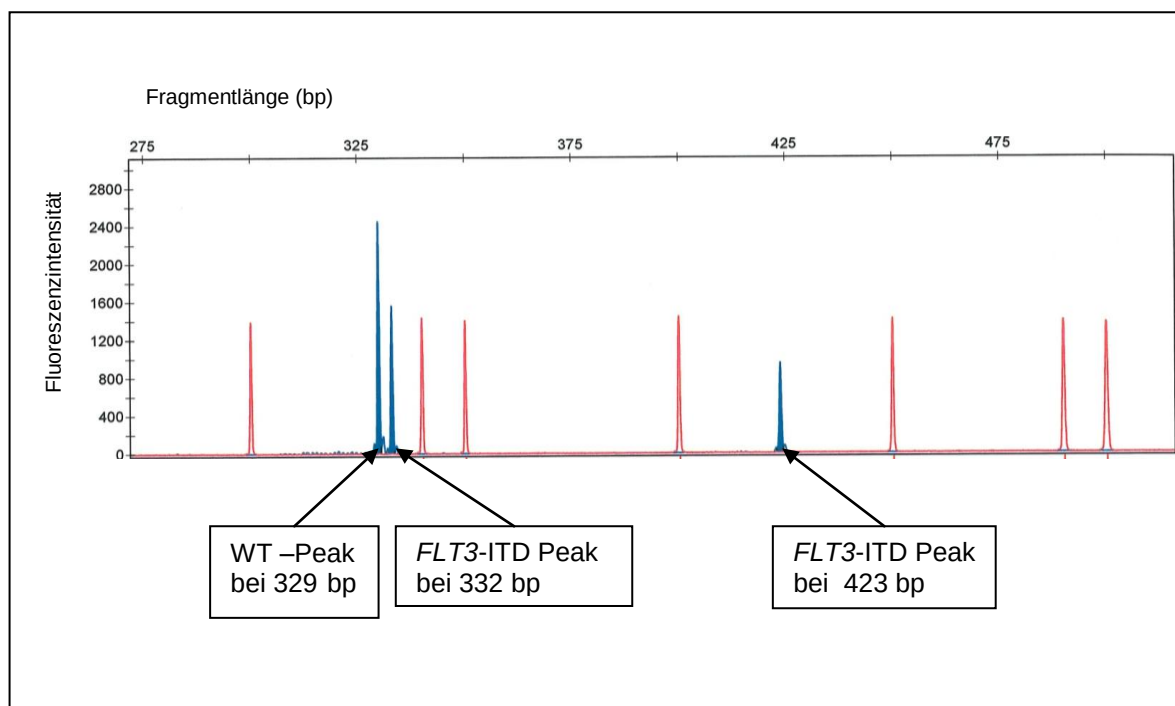


Abbildung 4: Beispiel einer GeneScan-Darstellung

Neben dem Wildtyp-Peak bei 329 Basenpaaren sind zwei *FLT3*-ITD-Peaks mit 332 und 423 Basenpaaren dargestellt.

Blau: Patientenprobe, rot: Längenstandard

Abkürzungen: bp = Basenpaare; *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; WT = Wildtyp.

2.2.5 Konventioneller PCR-Nachweis bei diskrepanten Proben

Bei diskrepanten Befunden zwischen GeneScan und konventioneller PCR wurde zur Verifizierung auch die konventionelle PCR wiederholt. Hierfür wurde jedoch der DNA-Gehalt der Probe für die PCR standardisiert, d.h., jede Probe wurde mit destilliertem Wasser auf eine DNA-Konzentration von 100 µg/µl verdünnt. Die PCR erfolgte nach dem in 2.2.2 beschriebenen Protokoll mit denselben Reagenzien.

Anschließend erfolgte die Gel-Elektrophorese bei 150 V über 3,5 h und Färbung in Ethidiumbromid, um das spezifische Bandenmuster des *FLT3*-Wildtyps sowie von *FLT3*-ITD überprüfen zu können (siehe 2.2.3).

2.2.6 Statistische Analyse

Definitionen zur Beurteilung des Behandlungsergebnisses

Zur Remissionskontrolle wurde nach jedem Therapiezyklus eine Knochenmarkpunktion durchgeführt und nach internationalen Richtlinien (Cheson et al., 2003) beurteilt. Eine komplette Remission (CR) lag vor bei einem Blastenanteil im Knochenmark von unter 5% und fehlendem Nachweis einer extramedullären Manifestation der AML. Im peripheren Blut durften keine myeloischen Blasten nachweisbar sein und es musste sich eine Regeneration der Hämatopoese mit Thrombozyten > 100.000/µl und Neutrophile > 1.000/µl (bzw. Granulozyten > 1.500/µl) zeigen. Bei fehlendem Nachweis einer vollständigen Regeneration der Hämatopoese wurde dies als eine CR mit inkompletter hämatopoetischer Regeneration (CRi) beurteilt. Eine partielle Remission (PR) lag vor, wenn im Knochenmark zwischen 5% und 25% myeloische Blasten nachweisbar waren oder sich bei initialen Werten myeloischer Blasten von 20% bis 49% eine Reduktion mindestens um 50% zeigte. Weitere Bedingungen waren die Rückbildung einer initial nachweisbaren extramedullären Manifestation, Regeneration der Hämatopoese und Fehlen einer transfusionsbedürftigen Anämie. Eine fehlende CR, CRi oder PR zeigte ein Nicht-Ansprechen auf die Therapie und wurde als refraktäre AML (RD) bezeichnet. Ebenfalls zum Therapieversagen zählten der Fröhrtodesfall (ED, Tod während der Chemotherapie oder spätestens sieben Tage nach Abschluss der Therapie) und der hypoplastische Todesfall (Tod später als sieben Tage nach Abschluss der Chemotherapie ohne Regeneration der Hämatopoese). Als rezidivfreies Überle-

ben wurde der Zeitraum zwischen dem Datum der CR und dem Auftreten eines Rezidivs oder Tod des Patienten bezeichnet, wobei unter einem Rezidiv der Nachweis von über 10% Blasten im Knochenmark oder das Auftreten einer extramedullären Manifestation verstanden wurde. Das Gesamtüberleben entsprach der Anzahl von Tagen zwischen Einschluss in die Studie und Tod des Patienten.

Statistische Verfahren

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die *FLT3*-Mutationsanalyse im Rahmen experimenteller Untersuchungen. Um die statistische Aussagekraft zu erhöhen, wurden die Ergebnisse dieser Untersuchung (n=264) durch Ergebnisse einer Vorläuferstudie erweitert. Diese Gesamtergebnisse (n=598) wurden dann mit den klinischen Daten korreliert.

Durchgeführt wurde die Auswertung computergestützt von der statistischen Abteilung der AMLSG-Studienzentrale in Ulm mit Hilfe der statistischen Programmpakete SAS 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, USA) und StatXact (Cytel Software Corp., Cambridge, USA).

Die mediane Nachbeobachtungszeit wurde nach der Methode von Korn (1986) berechnet. Beim Vergleich der unterschiedlichen Gruppen spielten die Charakteristika bei Diagnosestellung eine Rolle. Qualitative Merkmale wurden mittels Fisher-exakt-Test verglichen, während der Vergleich quantitativer Variablen mit der Kruskal-Wallis-Analyse (Kruskal u. Wallis, 1952) erfolgte. P-Werte kleiner 0,05 galten als signifikant. Bei signifikanten Werten im Vergleich der Gruppen schlossen sich paarweise Vergleiche an. Diese Paarvergleiche qualitativer und quantitativer Variablen erfolgten anhand der Methoden des Fisher-exakt-Tests bzw. Wilcoxon-Rangsummentests (Wilcoxon, 1945). Als Signifikanzniveau für die Berechnung von aufgetretenen Signifikanzunterschieden in den Paarvergleichen wurde $\alpha=0,05/\epsilon=0,0163$ festgelegt. Das Gesamtüberleben und die Remissionsdauer wurden als Kurven entsprechend der Methode nach Kaplan u. Meier (1958) analysiert und dargestellt. Zur Analyse von Unterschieden zwischen den Kaplan-Meier-Kurven wurde der Logrank-Test herangezogen (Mantel u. Haenzel, 1959). Der Einfluss prognostischer Marker auf die Remissionsdauer und das Gesamtüberleben wurde anhand des Regressionsmodells nach Cox untersucht (Cox, 1972). Hierbei galten für die Berechnung folgende mögliche Prognosefaktoren:

Neben dem Vorhandensein von Mutationen wie *FLT3*-ITD zählten Alter des Patienten in Zehnjahresschritten, Zunahme der Leukozytenzahl im Blut bei Diagnosestellung in Schritten von je 50.000/ μ l und der Laktatdehydrogenase-Spiegel; wobei für die Remissionsdauer das Regressionsmodell zusätzlich das Ansprechen auf den ersten Zyklus der Induktionstherapie beinhaltete. Als weitere Variable wurde die Studienzugehörigkeit in das Regressionsmodell einbezogen, um studienspezifische Einflüsse der fünf unterschiedlichen Studien auf die Remissionsdauer und das Gesamtüberleben zu berücksichtigen.

Die Dokumentation der klinischen Daten wurde im Rahmen der AML-Studiengruppe zentral in der Studienzentrale der Klinik für Innere Medizin III durchgeführt, die statistischen Analysen zur Evaluation der prognostischen Bedeutung der unterschiedlichen *FLT3*-ITD Insertionsstellen erfolgten durch Herrn PD Dr. Schlenk, Leiter der Studienzentrale.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 1754 Patienten in die drei multizentrischen Studien AML HD93, AML HD98-A und AMLSG 07-04 bis 31.12. 2006 eingeschlossen. Bei 1719 Patienten konnte ein zytogenetischer Befund erstellt werden; hiervon ließ sich bei 741 Patienten ein normaler Karyotyp nachweisen.

Klinische und molekulargenetische Daten waren in 598 der 741 Patienten verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden 264 von 598 AML-Patienten mit einem normalen Karyotyp auf eine *FLT3*-ITD analysiert.

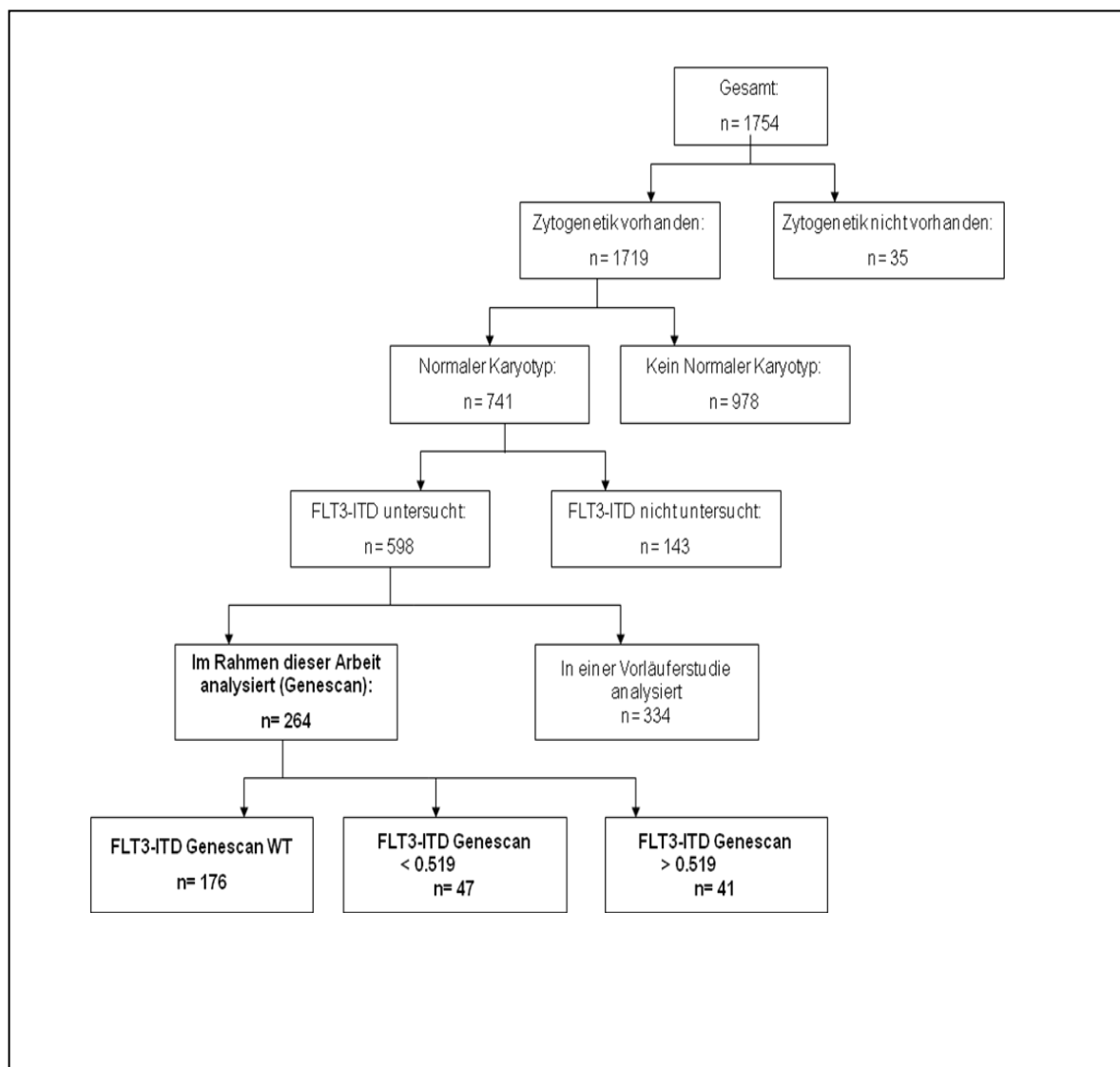


Abbildung 5: Schaubild zur Auswahl des Patientenkollektivs

Abkürzungen: 0,519 = Ratio Mutatante/Wildtyp; *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; n = Anzahl; WT = Wildtyp.

Die für die statistische Auswertung vorliegende Gesamt-Kohorte von 598 Patientenproben setzte sich wie in der Vierfelder-Tafel (Tabelle 3) dargestellt zusammen:

Tabelle 3: Vierfelder-Tafel zur Darstellung der Kohorten-Zusammensetzung

Studie	Aktuelle Daten	Vorläuferdaten	Summe
AML HD93	8	82	90
AML HD98-A	86	244	330
AMLSG 07-04	170	8	178
Summe	264	334	598

Im Rahmen der AMLSG 07-04-Studie wurden nur Patienten in die statistischen Analysen einbezogen, die vor dem 31.12.2006 randomisiert worden waren, um eine ausreichende follow-up Zeit gewährleisten zu können.

3.1 Nachweis einer *FLT3*-ITD anhand der GeneScan Analyse

Mittels GeneScan-Analyse konnte bei 88 der 264 Patienten (33%) eine *FLT3*-ITD detektiert werden. Mittels konventioneller PCR konnte nur bei 85 Patienten (32%) eine *FLT3*-ITD nachgewiesen werden.

3.2 Sensitivitätsvergleich der GeneScan-Analyse mit der konventionellen PCR

A. Konkruente Befunde:

Bei 261 von 264 Patienten (98%) entsprach das Ergebnis der GeneScan-Analyse dem Befund der konventionellen PCR. Die Ergebnisse der konventionellen PCR lagen bereits im Rahmen von Vorarbeiten vor und wurden für unsere Auswertungen verwendet. In beiden Analysemethoden waren 85 der Patienten (32%) *FLT3*-ITD-positiv und 176 der Patienten (66%) *FLT3*-ITD-negativ.

B. Diskrepante Befunde:

Es gab keinen Patienten, bei dem anhand der konventionellen PCR eine *FLT3*-ITD nachweisbar war, aber nicht in der GeneScan Analyse.

Bei 3 Patienten (3% der *FLT3*-ITD-positiven Fälle) konnte anhand der GeneScan-Analyse eine *FLT3*-ITD nachgewiesen werden, die in der konventionellen PCR nicht nachweisbar war. Alle drei Fälle wurden wiederholt, um das Ergebnis zu verifizieren. In jedem Analysenlauf waren im GeneScan jeweils neben dem Wildtyp-Peak ein bzw. zwei kleine zusätzliche Peaks erkennbar. Diese waren jedoch in allen drei Fällen sehr klein, sodass sich jeweils eine *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio von $< 0,1$ (siehe Tabelle 4) ergab: Patient 1 wies eine Ratio von 0,010, Patient 2 von 0,031 und Patient 3 eine Ratio von 0,022 auf.

Interessant war der Verlauf von Patient 3: nach der Induktionstherapie war die *FLT3*-Mutation nicht mehr nachweisbar. Im Verlauf der AML trat ein Rezidiv auf, wobei zum Zeitpunkt des Rezidivs dann die *FLT3*-ITD mittels konventioneller PCR erkennbar war. Die zusätzlich durchgeführte Analyse des Rezidivmaterials mittels GeneScan zeigte den initialen Klon mit einer quantitativen Zunahme der Mutation zu Wildtyp-Ratio von 0,640 gegenüber Diagnosestellung von 0,020.

Tabelle 4 zeigt einen Überblick der drei diskrepanten Fälle.

Tabelle 4: Darstellung der diskrepanten Analysenergebnisse

Die Analysen von Patient 1 bis 3 wurden jeweils im Duplikat durchgeführt.

Abkürzungen: a = 1. Analysenlauf; AUC = area under the curve; b = 2. Aanalysenlauf; bp = Basenpaare; MUT = Mutation; MUT/WT-Ratio = Mutatante/Wildtyp; PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion; R¹ = Rezidivmaterial; WT = Wildtyp.

Patient	Studie	AUC WT	AUC MUT1	AUC MUT2	MUT/WT-Ratio	Nachweis anhand GeneScan	Nachweis anhand konventioneller PCR
1a	HD98-A	75401	729		0,010	positiv	negativ
1b		145417	4235		0,029	positiv	negativ
2a	07-04	67229	2062		0,031	positiv	negativ
2b		71542	4064	2099	0,086	positiv	negativ
3a	07-04	153939	2789	629	0,022	positiv	negativ
3b		78349	1228	332	0,020	positiv	negativ
3 R ¹	07-04	21402	13818		0,640	positiv	positiv

3.3 Quantifizierung und Anzahl der *FLT3*-ITD-Klone

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Quantifizierung der *FLT3*-ITD und deren Bedeutung für den Verlauf der AML.

Hierfür wurden 264 Patienten mit einem normalen Karyotyp anhand der GeneScan-Analyse untersucht. Bei 88 der 264 Patienten (33%) war eine *FLT3*-ITD nachweisbar, die zusätzlich quantifiziert werden konnte. Hierfür wurde die Menge der Mutation zu der Menge des Wildtyp-Allels ins Verhältnis gesetzt (*FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio, im Folgenden als „Ratio“ bezeichnet). Die Ratio betrug im Median 0,519 (0,008 bis 10,190). Diese *FLT3*-Mutante/Wildtyp-Ratio wurde wie folgt berechnet: Die Summe der AUC (Fläche der jeweiligen im GeneScan als ITD-Klon detektierten Peaks) der jeweiligen ITD-Klone wurde durch die AUC des Peaks des *FLT3*-Wildtyps dividiert. Bei Vorliegen mehrerer Klone wurde die Summe der AUC von allen Klonen gebildet. Als „cut off point“ der Berechnungen wurde der Median (0,519) dieser Ratio herangezogen.

Achtzehn der 88 *FLT3*-ITD-positiven Patienten (7% des Patientenkollektivs) wiesen eine Ratio > 1 auf; bei 13 Patienten (5% des Patientenkollektivs) war die Ratio > 2 . Dies bedeutet, dass hier die Mutation quantitativ größer bzw. doppelt so groß wie das Wildtyp-Allel war. Hier handelt es sich sehr wahrscheinlich um homozygote Mutationen.

Da die Arbeit von Thiede et al. (2002) für diese Promotionsarbeit eine bedeutende Referenz darstellt, interessierte hier auch die Anzahl der Patienten, deren Ratio oberhalb des cut offs von Thiede et al. liegen. Bei 23 Patienten (8% des gesamten Patientenkollektivs) lag die Ratio oberhalb des von Thiede et al. (2002) verwendeten cut offs von 0,78, was 26% der 88 *FLT3*-ITD-positiven Patienten entspricht.

3.4 Patienten mit mehreren verschiedenen *FLT3*-ITD-Klonen

Bei 65 der 88 *FLT3*-ITD-positiven Patienten (85%) war im GeneScan ein *FLT3*-ITD-Klon nachweisbar. Bei 23 Patienten (26%) waren mehrere Klone nachweisbar, wobei meistens einer der Klone die anderen dominierte. Hierbei war die Größe sehr variabel. Bei 13 Patienten (15%) waren 2 Klone und bei 9 Patienten (10%) 3 Klone nachweisbar. Ein Patient (1%) wies 5 Klone auf.

3.5 Prognostischer Stellenwert der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio bei AML mit normalem Karyotyp

Um im Rahmen der statistischen Analysen eine möglichst hohe Aussagekraft zu erhalten, wurden in die statistischen Analysen ebenfalls die Ergebnisse von 334 Patienten einer vorangegangenen Untersuchung mit einbezogen. Schwerpunkt der Analysen war hierbei die prognostische Relevanz der *FLT3*-ITD-Mutante/Wildtyp-Ratio. Insgesamt fanden in die statistischen Analysen Daten von 598 Patienten Eingang. Für die Analysen im Hinblick auf die Prognose wurden die Patienten in drei unterschiedliche Subgruppen unterteilt: I. Wildtyp (n=382), II. Ratio $\leq 0,519$ (n=108) und III. Ratio $> 0,519$ (n=108).

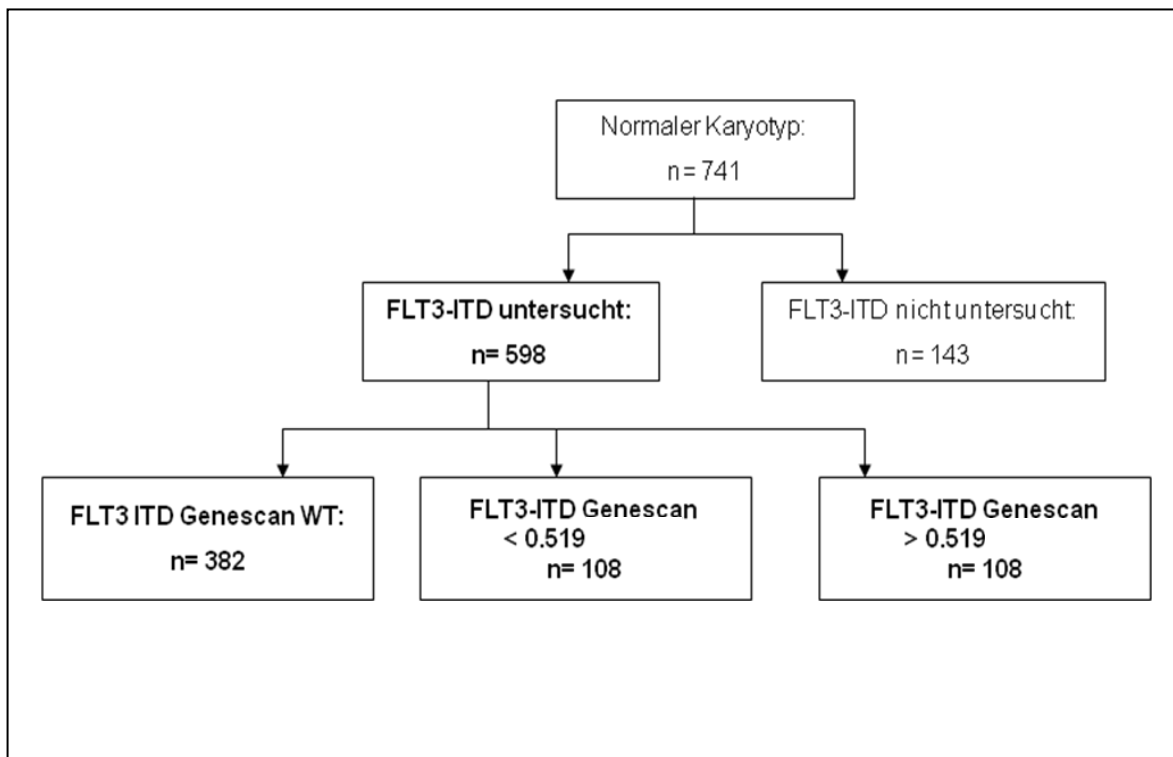


Abbildung 6: Schaubild zur Auswahl des Patientenkollektivs

Abkürzungen: 0,519 = Ratio Mutatante/Wildtyp; *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; n = Anzahl; WT = Wildtyp.

3.5.1 Korrelation mit klinischen Charakteristika

FLT3-ITD-positive Patienten mit einer Ratio $> 0,519$ hatten signifikant häufiger eine de novo AML ($p=0,03$), wohingegen Patienten mit einem *FLT3*-Wildtyp häufiger eine s-AML aufwiesen. Während 39% (197 von 510) der Patienten mit de novo AML eine ITD hatten, wiesen nur 22% (17 von 79) der Patienten mit sekundärer

AML (s-AML oder t-AML) eine *FLT3*-ITD auf. Die Details der Patienten sind in Tabelle 5 dargestellt.

FLT3-ITD-positive Patienten wiesen unabhängig von der Ratio einen signifikant niedrigeren Hämoglobinwert auf gegenüber Patienten mit *FLT3*-Wildtyp ($p=0,029$). Statistisch ebenfalls signifikant waren LDH, Leukozytenzahl sowie der Anteil der myeloischen Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark ($p<0.0001$). Hierbei waren die höchsten Werte signifikant mit einer höheren Ratio korreliert. Bei allen drei Parametern stieg der gemessene Wert in der Reihenfolge Wildtyp, Ratio $\leq 0,519$, Ratio $>0,519$ an. Die mittlere Leukozytenzahl war mit $62 \times 10^9/l$ im Zusammenhang mit einer Ratio $>0,519$ am höchsten im Vergleich zur Gruppe mit einer Ratio $\leq 0,519$, welche im Median $20 \times 10^9/l$ Leukozyten aufwiesen. Deutlich erhöhte Werte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen und auch des Gesamtkollektivs zeigten sich bei den Patienten mit einer Ratio $>0,591$ auch bei dem Anteil myeloischer Blasten im peripheren Blut (77% für Ratio $>0,591$ im Vergleich zu 33% für Ratio $\leq 0,591$ bzw. 30% für *FLT3*-Wildtyp) und Knochenmark (90% für Ratio $>0,591$ im Vergleich zu 74% für Ratio $\leq 0,519$ und 71,5% für *FLT3*-Wildtyp).

Bei 574 der 598 AML-Patienten konnte der *NPM1*-Mutationsstatus erhoben werden. Hiervon wiesen 301 Patienten (52%) eine *NPM1*-Mutation auf.

Insgesamt zeigten 201 Patienten (35%) einen Wildtyp sowohl für *FLT3* als auch für *NPM1*, 166 Patienten (30%) hatten eine alleinige *NPM1*-Mutation, 72 Patienten (12%) nur eine *FLT3*-ITD und bei 135 Patienten (23%) war eine Mutation in beiden Genen feststellbar.

Dabei zeigte sich eine signifikante Assoziation von *NPM1* zu *FLT3*-ITD ($p<0,015$). Dagegen ergab sich im Hinblick auf die *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio und simultaner *NPM1*-Mutation kein wesentlicher Unterschied: 66 Patienten wiesen eine Ratio $\leq 0,519$ auf und 69 Patienten eine Ratio $>0,519$ (siehe Tabelle 5).

Hinsichtlich weiterer klinischer Parameter wie Alter, Geschlecht und FAB-Subtyp war kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen erkennbar.

Tabelle 5: Klinische Charakteristika der 598 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und normalem Karyotyp unterteilt in die Gruppen Wildtyp, Mutatante/Wildtyp-Ratio <0,5, Mutatante/Wildtyp-Ratio >0,5

Abkürzungen: *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; KM = Knochenmark; LDH = Laktatdehydrogenase; MUT = Mutation, *NPM1* = Nucleophosmin 1; PB = peripheres Blut; s-AML = sekundäre akute myeloische Leukämie; t-AML = Therapie-assoziierte akute myeloische Leukämie; WT = Wildtyp.

	Alle Patienten	<i>FLT3</i> -ITD GeneScan			p-Wert	
	n=598	WT n= 382	Ratio<0.519 n=108	Ratio>0.519 n=108	Kruskal-Wallis	Fisher
Studie, Anzahl Patienten (%)						
AML HD93	90 (15)	59 (15)	15 (14)	16 (15)		
AML HD98-A	330 (55)	211 (55)	57 (53)	62 (57)		
AMLSG 07-04	178 (30)	112 (29)	36 (33)	30 (28)		
Alter, Jahre					0.977	
Median	48.475	48.655	48.350	47.205		
Spannweite	16.320-60.970	16.320-60.970	18.410-60.850	19.390-60.920		
Geschlecht, Anzahl Patienten (%)						0.162
weiblich	326 (55)	197 (52)	65 (60)	64 (59)		
männlich	272 (45)	185 (48)	43 (40)	44 (41)		
AML-Typ, Anzahl Patienten (%)						0.032
De novo	510 (85)	313 (82)	97 (90)	100 (93)		
s-AML	65 (11)	50 (13)	10 (9)	5 (5)		
t-AML	14 (2)	12 (3)	0 (0)	2 (2)		
fehlt	9 (2)	7 (2)	1 (1)	1 (1)		
Hämoglobinwert, g/L					0.030	
Median	9.0	9.19	8.8	8.695		
Spannweite	2.70-17.60	3.10-17.60	2.7-12.6	3.90-14.00		
fehlt	18	15	1	2		
Thrombozytenzahl, $\times 10^9/L$					0.234	
Median	63.0	65.0	73.0	57.0		
Spannweite	4.0-746.0	4.0-746.0	10.0-688.0	8.0-734.0		
fehlt	18	15	1	2		
Leukozytenzahl, $\times 10^9/L$					<0,0001	
Median	19.55	13.40	20.0	62.05		
Spannweite	0.20-372.00	0.20-369.0	0.7-238.2	0.20-372.0		
fehlt	18	15	1	2		
Blasten im PB, %					<0,0001	
Median	41.0	30.0	33.0	77.0		
Spannweite	0.0-100.0	0.0-99.0	0.0-99.0	0.0-100.0		
fehlt	48	38	3	7		
Blasten im KM, %					0,0001	
Median	80.0	71.5	74.0	90.0		
Spannweite	0.0-100.0	0.0-100.0	0.0-100.0	2.0-100.0		
fehlt	46	32	8	6		

Fortsetzung Tabelle 5:

	Alle Patienten	FLT3-ITD GeneScan			p-Wert	
	n=598	WT n= 382	Ratio <0.519 n=108	Ratio>0.519 n=108	Kruskal-Wallis	Fisher
FAB-Subtyp, Anzahl Patienten (%)						
M0	26 (4)	21 (5)	3 (3)	2 (2)		
M1	64 (11)	33 (9)	13 (12)	18 (17)		
M2	111 (19)	73 (19)	14 (13)	24 (22)		
M3	2 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)		
M4	116 (19)	62 (16)	31 (29)	23 (21)		
M5	60 (10)	40 (10)	7 (6)	13 (12)		
M6	11 (2)	9 (2)	2 (2)	0 (0)		
fehlt	208 (35)	144 (38)	37 (34)	27 (25)		
Extramedulläre Infiltration, Anzahl (%)						0.417
nein	531 (89)	339 (89)	98 (91)	94 (87)		
ja	40 (7)	22 (6)	8 (7)	10 (9)		
fehlt	27 (5)	21 (5)	2 (2)	4 (4)		
LDH, U/L (Spannweite)					<0,0001	
Median	443.0	367.0	513.0	734.0		
Spannweite	89.0-4566.0	89.0-4566.0	122.0-1631.0	179.0-4091.0		
fehlt	31	21	8	2		
Splenomegalie, Anzahl (%)						0.321
nein	322 (54)	212 (55)	57 (53)	53 (49)		
ja	160 (27)	95 (25)	31 (29)	34 (31)		
fehlt	116 (19)	75 (20)	20 (19)	21 (19)		
Hepatomegalie, Anzahl (%)						0.781
nein	353 (59)	221 (58)	68 (63)	64 (59)		
ja	102 (17)	68 (18)	18 (17)	16 (15)		
fehlt	143 (24)	93 (24)	22 (20)	28 (26)		
NPM1, Anzahl (%)						0,015
WT	273 (46)	201 (53)	36 (33)	36 (33)		
MUT	301 (50)	166 (43)	66 (61)	69 (64)		
fehlt	24 (4)	15 (4)	6 (6)	3 (3)		

3.5.2 Ansprechen auf die Induktionstherapie

Von den 216 FLT3-ITD-positiven Patienten erreichten 157 (73%) nach Doppelinduktionstherapie eine komplette Remission (CR), 41 Patienten (19%) waren refraktär (RD) und 18 Patienten (8%) verstarben während der Induktionstherapie (ED).

Hierbei erreichten Patienten mit einer Ratio >0,519 signifikant seltener eine CR, wiesen eine signifikant höhere RD-Rate auf und hatten eine höhere Rate an Todesfällen.

Tabelle 6 zeigt das Therapieansprechen in Korrelation zur Mutante/Wildtyp-Ratio.

Tabelle 6: Therapieansprechen in Abhängigkeit der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio

Abkürzungen: CR = komplette Remission; ED = Fröhrtodesfall; *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; n = Anzahl; RD = refraktäre AML.

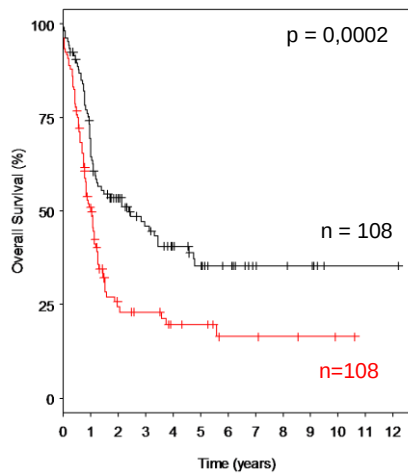
	Patienten	<i>FLT3</i> -ITD GeneScan		p-Wert
		Ratio ≤0,519	Ratio >0,519	
	n = 216	n = 108	n = 108	
Remission, Anzahl (%)				0,005
CR	157 (73)	89 (82)	68 (63)	
RD	41 (19)	13 (12)	28 (26)	
ED	18 (8)	6 (6)	12 (11)	

3.5.3 Überlebensanalysen

Patienten mit einer Ratio >0,519 wiesen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (OS) (p=0,0002), ein kürzeres rezidivfreies Überleben (RFS) (p=0,002) und ein kürzeres ereignisfreies Überleben (EFS) (p=0,0001) im Vergleich zu Patienten mit einer Ratio ≤0,519 auf.

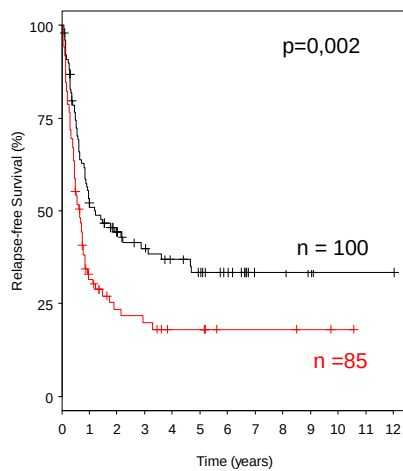
Das Gesamtüberleben betrug bei einer Ratio ≤0,519 im Median 28,9 Monate und bei Patienten mit Wildtyp 27,1 Monate, während Patienten mit einer Ratio >0,519 im Median 12,3 Monate überlebten. Die 6-Jahres-Überlebensrate (6-JÜR) betrug 29% bei einer Ratio ≤0,519 und 33% bei Patienten mit Wildtyp im Vergleich zu 10% bei einer Ratio >0,519. Die folgende Abbildung 7 zeigt Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Gesamtüberleben (Abbildung 7A), das rezidivfreie Überleben (Abbildung 7B) sowie das ereignisfreie Überleben (Abbildung 7C).

A) Gesamtüberleben



FLT3-ITD < Median
FLT3-ITD > Median

B) Rezidivfreies Überleben



C) Ereignisfreies Überleben

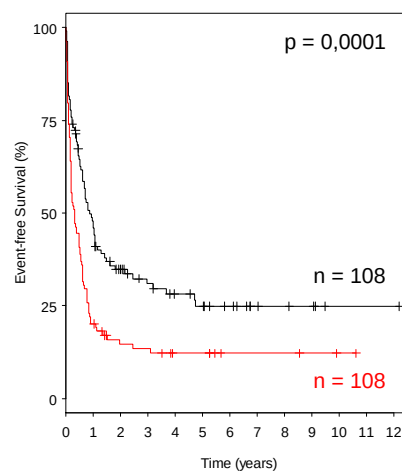


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurven bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp in Abhängigkeit von der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio

Gesamtüberleben (A), Rezidivfreies Überleben (B) und Ereignisfreies Überleben (C) der *FLT3*-ITD-positiven Patienten in Abhängigkeit der Ratio mit cut point anhand des Medians 0,519.

Abkürzungen: *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; n = Anzahl; p = p-Wert.

3.5.4 Überleben in Abhängigkeit vom *NPM1*-Mutationsstatus

Patienten mit einer Ratio $\leq 0,519$ wiesen unabhängig vom *NPM1*-Mutationsstatus ein vergleichbares rezidivfreies Überleben (RFS) und Gesamtüberleben (OS) wie Patienten mit *FLT3*-Wildtyp auf.

Dagegen hatten Patienten mit einer Ratio $> 0,519$ unabhängig vom *NPM1*-Mutationsstatus ein signifikant kürzeres OS und RFS als Patienten mit *FLT3*-Wildtyp oder einer Ratio $\leq 0,519$ ($p < 0,001$; Abbildung 8).

Zusammengefasst ist die *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio, d.h. die Menge an mutiertem Allel der prognostisch signifikant stärkste Parameter im Hinblick auf das Therapieansprechen und das Überleben. Eine hohe Ratio korreliert signifikant mit einem schlechten Outcome und dies unabhängig vom *NPM1*-Mutationsstatus während eine niedrige Ratio keinen Unterschied zum Wildtyp zeigt (wie in Abbildung 8 gezeigt).

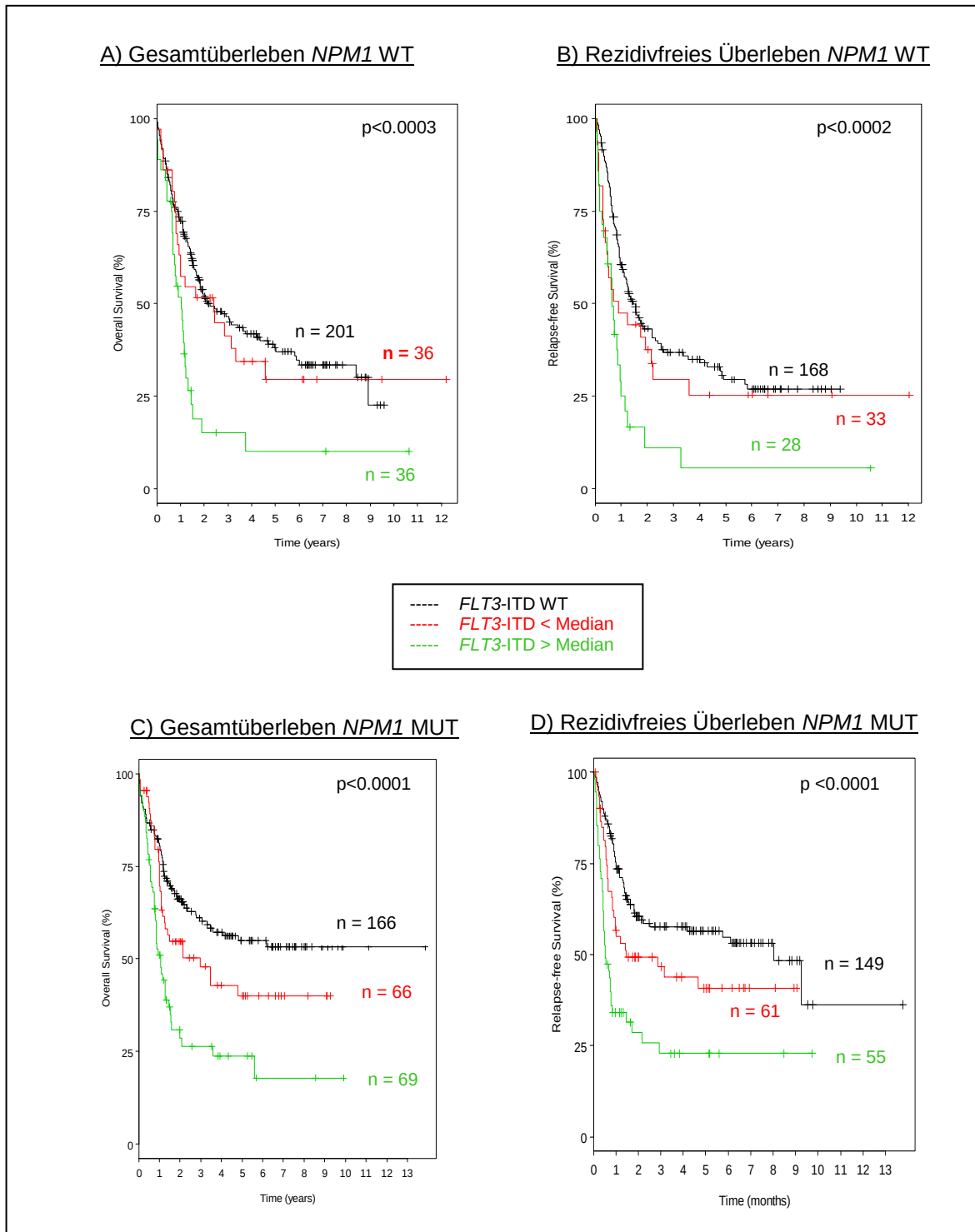


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurven mit Darstellung des Gesamtüberleben und Rezidivfreien Überleben von AML-Patienten mit normalem Karyotyp in Abhängigkeit des *NPM1* Mutations-Status

(A) Gesamtüberleben *NPM1*-negativer Patienten in Abhängigkeit des *FLT3*-Status
 (B) Rezidivfreies Überleben *NPM1*-negativer Patienten in Abhängigkeit des *FLT3*-Status
 (C) Gesamtüberleben *NPM1*-positiver Patienten in Abhängigkeit des *FLT3*-Status
 (D) Rezidivfreies Überleben *NPM1*-positiver Patienten in Abhängigkeit des *FLT3*-Status
 Abkürzungen: *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens;
 MUT = Mutation; n = Anzahl; *NPM1* = Nucleophosmin 1; p = p-Wert, WT = Wildtyp.

Tabelle 7 zeigt ebenfalls, dass unabhängig vom *NPM1*-Mutationsstatus das mediane Gesamtüberleben mit einer Ratio $>0,519$ signifikant kürzer war gegenüber dem Gesamtüberleben mit einer Ratio $\leq 0,519$ oder dem *FLT3*-Wildtyp. Das mediane Gesamtüberleben von Patienten mit einer Ratio $\leq 0,519$ entspricht in etwa demjenigen Überleben des *FLT3*-Wildtyps.

In Bezug auf das rezidivfreie Überleben zeigt sich ebenfalls eine schlechtere Prognose für Patienten mit einer Ratio $>0,519$ als für Patienten mit einer Ratio $<0,519$ oder mit Wildtyp. Jedoch scheint das rezidivfreie Überleben auch bei einer Ratio $<0,519$ schlechter zu sein im Vergleich zum Wildtyp.

Tabelle 7: Medianes Überleben in Monaten in Abhängigkeit der *FLT3*-ITD-Ratio und des *NPM1*-Mutationsstatus

Abkürzungen: *FLT3* = FMS-related tyrosine kinase 3; *FLT3*-ITD = interne Tandemduplikation des FMS-related tyrosine kinase 3-Gens; MUT = Mutation; *NPM1* = Nucleophosmin 1; RFS = rezidivfreies Überleben; OS = Gesamtüberleben; WT = Wildtyp.

		<i>FLT3</i> WT	<i>FLT3</i>-ITD < Median	<i>FLT3</i>-ITD > Median	p-Wert
RFS Median (Monate)	<i>NPM1</i> WT	17,58	10,58	7,58	0,0002
	<i>NPM1</i> MUT	95,56	17,64	6,54	0,0014
OS Median (Monate)	<i>NPM1</i> WT	27,1	28,9	12,3	0,0003
	<i>NPM1</i> MUT	fehlt	35,6	12,8	0,0069

4 Diskussion

4.1 Inzidenz interner Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens

Die im Jahr 1996 bei AML-Patienten zum ersten Mal beschriebenen internen Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens (Nakao et al., 1996) sind innerhalb der Exone 14 und 15 lokalisiert (Abu-Duhier et al., 2001). Interne Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens wurden in zahlreichen Studien als bedeutender prognostischer Faktor bei der AML hervorgehoben und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Fröhling et al., 2002a; Kottaridis et al., 2001; Rombouts et al., 2000). *FLT3*-ITDs sind sehr heterogen, was ihre Länge (Stirewalt et al., 2006), Allelic Ratio (Kottaridis et al., 2001), Insertionsstelle (Kayser et al., 2009; Breitenbücher et al., 2009b) sowie Anzahl der *FLT3*-ITD-Klone (Gale et al., 2008) pro Patient betrifft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Bestimmung der Inzidenz von *FLT3*-ITD in einer großen AML-Population quantitative Mutationsanalysen durchgeführt und der prognostische Einfluss der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio untersucht. Da eine hohe Assoziation von *FLT3*-ITD zum normalen Karyotyp besteht (Thiede et al., 2002), waren die Analysen auf diese zytogenetische Subgruppe beschränkt.

Die Inzidenz von *FLT3*-ITD betrug in unserer Studie 33%, was publizierten Daten entspricht (Döhner u. Döhner, 2008).

4.2 Stellenwert der Quantität von *FLT3*-ITD

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass nicht nur das alleinige Vorhandensein von *FLT3*-ITD einen Einfluss auf die Prognose nimmt, sondern dass die Menge an mutiertem Allel, definiert durch die Mutante/Wildtyp-Ratio eine bedeutende, wenn nicht sogar die entscheidende Rolle spielt (Thiede et al., 2002; Gale et al., 2008). Zudem gibt es Hinweise, dass auch die Anzahl (Kottaridis et al., 2001; Gale et al., 2008) und Größe (Stirewalt et al., 2006; Meshinchi et al., 2008) der vorhandenen *FLT3*-ITD-Klone berücksichtigt werden müssen.

In einer großen Studie an 979 Patienten mit neu diagnostizierter AML untersuchten Thiede et al. (2002) mittels GeneScan-Analyse quantitativ den *FLT3*-ITD-

Mutationslevel. Hierbei konnte eine *FLT3*-ITD bei 200 der 979 Patienten detektiert werden (20,4%). Im Rahmen dieser Studie ließ sich ein ungünstiger Einfluss auf die Prognose bei Patienten mit einer *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio größer als der Median von 0,78 nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio auf die Prognose von AML-Patienten untersucht. Wie bei der Publikation von Thiede et al. (2002) wurde der Median der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio als Cut-off zur Beurteilung der prognostischen Wertigkeit herangezogen, wobei dieser im Vergleich zu Thiede et al. niedriger war. Dieser lag in unserer Analyse bei 0,519 (0,008 bis 10,190) und die Ratio-Werte waren insgesamt niedriger als in der Publikation von Thiede et al. Die Mutante/Wildtyp-Ratio variierte in seiner Studie von 0,03 bis 32,56 und der Median lag bei 0,78. Gründe hierfür lassen sich am ehesten in folgenden Unterscheidungskriterien finden: zum einen wurden unterschiedliche GeneScan-Geräte mit unterschiedlicher Sensitivität der Detektion verwendet und zum anderen eine heterogene Patientenpopulation untersucht. Im Unterschied zur Publikation von Thiede et al. (2002) wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Patienten mit normalem Karyotyp untersucht; ebenfalls wurde eine größere Anzahl an Patienten einbezogen.

Im Hinblick auf die prognostische Bedeutung der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio konnten wir die Assoziation mit einer ungünstigen Prognose bestätigen. Sowohl für das Therapieansprechen, den klinischen Verlauf als auch für das Überleben stellte eine *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio, die größer war als der Median, einen ungünstigen Faktor dar. Zusätzlich korrelierte die *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio signifikant mit einer höheren Leukozytenzahl im peripheren Blut. Auch der prozentuale Blastenanteil sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark war signifikant höher bei einer Ratio größer als der Median von 0,519. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Thiede et al., 2002, Kottaridis et al., 2001 Whitman et al., 2001) konnten wir keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Überlebens zwischen Patienten mit Wildtyp oder einer Ratio kleiner des Medians feststellen. Kongruent wiesen Gale et al. (Gale et al., 2008) ebenfalls einen signifikant schlechten Verlauf hinsichtlich des Rezidivrisikos und des Gesamtüberlebens bei Patienten mit einer hohen *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio nach. Im Widerspruch steht jedoch, dass in der Studie von Gale et.al. ein signifikanter Trend mit steigender Mutante/Wildtyp-Ratio

gezeigt wurde, insbesondere, dass ein signifikanter Unterschied zwischen WT und einer niedrigen Ratio vorlag. Gale et.al. teilte die Patientenkohorte in 4 Gruppen (nicht am Median) auf. Mit steigender Ratio lag eine schlechtere Prognose, gemessen am Rezidivrisiko, krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben, vor ($p < 0,001$). Als Gründe für die differenten Ergebnisse könnte neben der unterschiedlichen Kohorte (Anzahl der Patienten, Patienten aller Karyotypen, Therapie) die Untersuchungsmethode genannt werden: Gale et al. bestimmten die Größe und das Mutationslevel durch an die PCR anschließende Fragmentanalyse mittels CEQ8000 DNA Genetic Analysis System.

Bei 14% ($n=13$) der *FLT3*-ITD-positiven Patienten war die *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio >2 , was ebenfalls im Einklang zu bereits publizierten Daten steht (Kottaridis et al., 2001; Whitman et al., 2001; Thiede et al., 2002). Hierbei kann von einer homozygoten *FLT3*-ITD ausgegangen werden, wobei diese Patienten eine sehr ungünstige Prognose aufwiesen (Whitman et al., 2001).

Die genauen Entstehungsmechanismen und Rolle der internen Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens sind noch nicht vollständig geklärt. Eine potentielle Erklärung für die Entstehung einer *FLT3*-ITD könnte sein, dass der DNA-Folgestrang bei der Replikation ein Palindrom zwischen den Aminosäuren 593 bis 602 bildet und somit durch einen Replikationsfehler eine interne Tandemduplikation verursacht werden könnte (Kiyoi et al., 1998).

Die interne Tandemduplikation führt dann zu einer Störung der Autoinhibition und konsekutiv zu einer gesteigerten Proliferation von leukämischen Zellen (Griffith et al., 2004). Durch den Verlust eines Wildtyp-Allels könnte sich der Verlust der Autoinhibition verstärken.

Zusätzlich wiesen bei Kottaridis et al. (2001) 10% der *FLT3*-ITD-Patienten einen partiellen oder kompletten Verlust des Wildtyp-Allels auf. Diesen Verlust konnten auch Whitman et al. (2001) in 35% der *FLT3*-ITD mutierten Patienten detektieren. Nach Einteilung der Patienten in drei Gruppen (Wildtyp, Heterozygot, Hemizygot) hatten hemizygote *FLT3*-ITD-Patienten in dieser Studie die schlechteste Prognose mit einer Reduktion des erkrankungsfreien ($p=0,0017$) und Gesamtüberleben ($p=0,0014$). Whitman et al. (2001) stellten die These auf, dass der Verlust eines Wildtyp-Alles durch submikroskopische Deletionen an 13q12 zustande kommen könnte. Neuere Daten legen nahe, dass diese homozygoten *FLT3*-ITDs sehr

wahrscheinlich auf dem Boden sog. uniparentaler Disomien (UPDs) entstehen (Bullinger et al., 2010).

4.3 Bedeutung mehrerer *FLT3*-ITD Mutationen innerhalb eines Patienten

In der Studie von Kottaridis et al. (2001) konnte bei 51 von 224 *FLT3*-ITD-mutierten Patienten (23%) mehr als eine Mutation nachgewiesen werden. In der multivariablen Analyse war die Anzahl der *FLT3*-ITD-Mutationen pro Patient der wichtigste prognostisch unabhängige Faktor für die Remissionsrate ($p=0,05$) und das krankheitsfreie Überleben ($p<0.0001$) sowie der zweitwichtigste Faktor für das ereignisfreie ($p=0.0007$) und Gesamtüberleben ($p=0.0007$).

Ebenfalls einen eher ungünstigen Einfluss der Anzahl der mutierten Klone beschreiben Gale et al. (Gale et al., 2008). Sie beobachteten eine verminderte Remissionsrate bei steigender Anzahl der *FLT3*-ITD-Klone (nicht signifikant, $p=0,17$). Jedoch war kein signifikanter Einfluss auf die Rate an kompletter Remission oder das Gesamtüberleben nachweisbar.

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GeneScan-Analysen wird die Vielfältigkeit von *FLT3*-ITD deutlich. Ein hoher Zahlenwert der AUC und somit eine große Mutationsmenge wurde entweder durch einen großen einzelnen *FLT3*-ITD-Klon oder durch die Summe mehrerer kleiner Subklone erreicht. Von den 13 Patienten mit einer Ratio über 2 hatten 4 mehr als einen Klon und selbst der Patient mit der größten Ratio von 10 wies nur einen Klon auf. Da im Rahmen dieser Arbeit nur wenige Patienten ($n=23$) mehr als einen *FLT3*-ITD-Klon hatten, konnte aufgrund der geringen Patientenzahl die prognostische Bedeutung nicht untersucht werden.

4.4 Bedeutung der Länge von *FLT3*-ITD

Hinsichtlich der Bedeutung der Länge von *FLT3*-ITD existieren kontroverse Daten. In zwei Publikationen wurde eine ungünstigere Prognose für das OS und RFS bei Patienten mit einer längeren, definiert durch >40 bp (Stirewalt et al. 2006) bzw. >48 bp (Meshinchi et al. 2008) *FLT3*-ITD beschrieben, wohingegen eine andere Veröffentlichung (Kusec et al., 2006) eine Assoziation zu einer günstigeren Prog-

nose bezüglich des OS bei längeren *FLT3*-ITDs fand. In zwei weiteren Arbeiten (Ponziani et al., 2006; Gale et al., 2008) hingegen fand sich überhaupt kein prognostischer Einfluss der *FLT3*-ITD-Länge auf das Überleben. Diese unterschiedlichen Studienergebnisse könnten durch die große Heterogenität der untersuchten Patienten in Hinblick auf das Patientenalter (von 0 bis 85 Jahren) aber auch durch die unterschiedlichen Cut-off-Werte der *FLT3*-ITD-Länge von einerseits 33 bis 70 bp erklärt werden. Ebenfalls variierte die Anzahl der analysierten Patienten mit einer *FLT3*-ITD in diesen Publikationen stark. Bei Kusec et al. (2006) wurden lediglich 18 AML-Patienten im Alter von 18 bis 85 Jahren mit einer *FLT3*-ITD analysiert. Zusätzlich wiesen in dieser Auswertung drei Patienten eine prognostisch günstige akute Promyelozytenleukämie (APL) mit Nachweis einer Translokation t(15;17)(q22;q12) auf. Die mediane *FLT3*-ITD-Länge betrug 70 bp, anhand derer die Patienten in zwei Gruppen, eine mit kurzer ITD (<70 bp) und eine weitere mit langer ITD ($\geq$ 70 bp) eingeteilt wurden. Im Vergleich mit den anderen oben genannten Veröffentlichungen war die mediane *FLT3*-ITD-Länge deutlich größer. In dieser Publikation fand sich ein günstigeres OS bei längeren *FLT3*-ITDs, wobei diese Assoziation auch nach Ausschluss der Patienten mit APL bestehen blieb. Stirewalt et al. (2006) verglich die Länge der *FLT3*-ITD von 47 Patienten im Alter von 18 bis 84 Jahren, die im Rahmen von zwei unterschiedlichen Studienprotokollen therapiert wurden. Anhand der medianen ITD-Länge von 39 bp wurden die Patienten in zwei Gruppen mit längeren und kürzen *FLT3*-ITDs unterteilt. Bei Meshinchi et al. (2008) wurden von den 77 *FLT3*-ITD-mutierten Patienten im Alter von 0 bis 21 Jahren diejenigen ausgewertet, deren ITD-Längen zwischen der 10. und 90. Quantile lagen. Hierbei betrug der Cut-off-Wert für die Gruppeneinteilung 48 bp. Das Alter der von Ponziani et al. (2006) analysierten Patienten reichte von 21 bis 69 Jahren. Es wurden 49 Patienten anhand der medianen *FLT3*-ITD-Länge (32 bp) in zwei Gruppen geteilt und ausgewertet. In der Studie von Gale et al. (2008) wurde die größte Kohorte von 260 AML-Patienten im Alter von 15 bis 60 Jahren untersucht und anhand der ITD-Länge in Quartile unterteilt. Ponziani et al. (2006) sowie Kusec et al. (2006) änderten in einer zusätzlichen Analyse ihren Grenzwert für die Unterscheidung zwischen kürzeren und längeren *FLT3*-ITDs auf den bei Stirewalt et al. (2006) ermittelten Medianwert von 39 bp, was bei Ponziani et al. (2006) zu einem ähnlichen Ergebnis wie in der ersten Analyse führte. Bei Kusec et

al. (2006) verblieben jedoch nur 5 Patienten in der Gruppe mit einer kurzen *FLT3*-ITD, was die Aussagekraft der daraus ermittelten Werte in Frage stellt.

Die in der vorliegenden Arbeit mittels GeneScan ermittelten *FLT3*-ITD-Klone wiesen im Vergleich zu den von Gale et al. (2008) angegebenen ITD-Größen eine ebenfalls breite Streuung mit ähnlichen Werten auf: wir ermittelten eine Range von 3 bis 234 Basenpaare im Vergleich zu Gale et al. (2008) mit 15 bis 231 Basenpaare. Da in dieser Arbeit die prognostische Bedeutung der *FLT3*-ITD-Größe nicht untersucht wurde, sondern lediglich die Größe aus den GeneScan-Daten determiniert werden konnte, kann hier keine Aussage zur prognostischen Bedeutung der *FLT3*-ITD-Länge gemacht werden. Dennoch sollte in zukünftigen Studien/Auswertungen dieser Aspekt von *FLT3*-ITD nicht vernachlässigt werden, da die Länge von *FLT3*-ITD eine Rolle zu spielen scheint.

4.5 Sensitivität der Nachweismethode mittels GeneScan

Interne Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens finden sich bei etwa 20% der erwachsenen AML-Patienten und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert, weshalb ein sensibler und schneller Nachweis dieser Mutation im Hinblick auf eine molekular zielgerichtete Therapie essentiell ist. Während in früheren Studien der *FLT3*-Mutationsstatus meist anhand der konventionellen PCR analysiert wurde, kommen inzwischen immer häufiger neuere Verfahren wie z.B. kapillarelektrophoretische Methoden zur Anwendung (Baldus et al., 2006; Cloos et al., 2006; Mills et al., 2005, Thiede et al., 2002).

Die im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Analysen zum Mutationsstatus des *FLT3*-Gens an 264 DNA-Proben jüngerer AML-Patienten (<60 Jahre) mit normalem Karyotyp wurden mittels GeneScan-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse der konventionellen PCR lagen im Rahmen von Vorarbeiten bereits vor. Im Vergleich zur konventionellen PCR stellte sich hier die GeneScan-Analyse als das sensitivere Verfahren dar. Bei 3% der *FLT3*-ITD-Patienten (n=3) konnte anhand der konventionellen PCR-Analyse die *FLT3*-ITD nicht nachgewiesen werden, wohingegen diese in der GeneScan-Analyse detektiert wurde. Die höhere Sensitivität kapillarelektrophoretischer Methoden zum Nachweis von *FLT3*-Mutationen wurde bereits in der Publikation von Mills et al. (2005) betont. Während die Sensitivität der konventionellen PCR etwa 0,05 beträgt, kann für die GeneScan-Analyse eine Sensitivität von 0,02 -0,01 angegeben werden (siehe Abschnitt 2.2.4).

Jedoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied im klinischen Verlauf zwischen Patienten mit kleiner Ratio (< Median von 0,519) und Patienten mit *FLT3*-Wildtyp gezeigt werden. Dennoch ist es im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen essentiell, eine exakte *FLT3*-ITD/Wildtyp-Quantifizierung durchzuführen, da im Falle eines Rezidives eine quantitative Zunahme des *FLT3*-ITD-Klones auftreten kann, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit bei einem Patienten der Fall war (Patient 3). Die GeneScan-Analyse kann daher einen Beitrag zur Beurteilung der „Minimal Residual Disease“ (MRD), (Cloos et al., 2006; Shih et al., 2002) leisten, indem auch kleine Subklone, welche im Verlauf der Erkrankung oder im Rezidiv zunehmen, nachgewiesen werden können.

Ein weiterer Vorteil der GeneScan-Analyse gegenüber der konventionellen PCR-Analyse ist die Möglichkeit der exakten Größen- und Mengenbestimmung der einzelnen *FLT3*-ITD-Klone, welche sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die Prognose haben. Nur mit der GeneScan-Analyse ist eine genaue Quantifizierung des Verhältnisses von *FLT3*-ITD/Wildtyp möglich.

4.6 Perspektiven in der AML-Diagnostik und -Therapie

Bei der AML sind die prätherapeutischen zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen entscheidend für die diagnostische Klassifikation, die prognostische Einschätzung und zunehmend auch für die Wahl der Therapie. Der Zusammenhang zwischen den pathogenetisch kausalen Veränderungen mit der Option, diese Veränderungen zielgerichtet durch neue und alte Therapeutika zu behandeln, wird zu einem schrittweisen Ersetzen der Risiko-adaptierten durch die Genotyp-spezifische Therapie führen. Die aktuelle WHO-Klassifikation berücksichtigt die genetische Heterogenität der AML in besonderem Maße (Swerdlow et al., 2008). Mittlerweile können über 65% der AML-Patienten entsprechend der zugrunde liegenden genetischen Veränderungen kategorisiert werden (Schlenk et al., 2010), was im Vergleich zu der auf der Morphologie basierten FAB-Klassifikation (Bennett et al., 1985) einen enormen Fortschritt bezüglich der diagnostischen Reliabilität, Validität und Objektivität bedeutet. Neben den zytogenetischen Veränderungen wurden in den letzten Jahren zahlreiche genetische Veränderungen (Genmutationen, und deregulierte Genexpressionen) identifiziert, welche die Komplexität der genetischen Heterogenität der AML untermauern. Beispielhaft zeigt sich dies bei Patienten mit normalem Karyotyp. Diese Patienten lassen sich anhand von molekularen Aberrationen subklassifizieren; hierbei spielen neben *NPM1*-Mutationen interne Tandem Duplikationen (ITD) des *FLT3*-Gens eine entscheidende Rolle. Bei der AML des Erwachsenen mit normalem Karyotyp lässt sich in ca. 20-25% der Fälle eine *FLT3*-ITD nachweisen, die klinisch mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass für die Prognose der AML mit normalem Karyotyp die Menge an mutiertem Allel des *FLT3*-Gens und nicht nur das alleinige Vorhandensein der Mutation eine Rolle spielt. Basierend auf

den Ergebnissen dieser Arbeit können *FLT3*-ITD-mutierte AML-Patienten anhand der *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio weiter subklassifiziert werden. Prognostisch besonders ungünstig ist hierbei eine hohe *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio. Die Identifizierung prognostisch relevanter Marker und das Verständnis der durch diese Mutation hervorgerufenen pathogenetischen Mechanismen ermöglichen es, molekular zielgerichtete Therapien zu entwickeln und diese gezielt einzusetzen. Aufgrund dieser klinischen Relevanz sollte neben der Bestimmung des *FLT3*-Mutationsstatus auch eine quantitative Mutationsanalyse durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen spielen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine zentrale Rolle sowohl in der Pathogenese als auch klinisch, wo sie eine entscheidende prognostische Rolle spielen und zunehmend für die Wahl der Therapie herangezogen werden. Patienten mit einem normalen Karyotyp lassen sich anhand molekulargenetischer Veränderungen wie der internen Tandemduplikation des *FLT3*-Gens (fms-related tyrosine kinase 3) subklassifizieren.

Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der Inzidenz von *FLT3*-ITD (interne Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens) sowie die Bestimmung der Ratio, d.h. des Verhältnisses des mutierten Allels zum Wildtyp-Allel.

Darüber hinaus sollten die mittels GeneScan-Analyse gewonnenen Ergebnisse auf ihre Sensitivität im Vergleich zu den Ergebnissen der konventionellen PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) geprüft werden. Zur Evaluation des prognostischen Einflusses wurden der *FLT3*-Mutationsstatus und die Mutante/Wildtyp-Ratio mit den klinischen Daten der Patienten korreliert.

Hierzu wurden 264 DNA-Proben (Desoxyribonukleinsäure-Proben) von AML-Patienten mit normalem Karyotyp mittels GeneScan-Analyse auf eine *FLT3*-ITD untersucht. Bei der GeneScan-Analyse handelt es sich um eine kapillarelektrophoretische Methode.

Eine *FLT3*-ITD war in 33% der Fälle nachweisbar. Für die statistischen Analysen wurden die *FLT3*-ITD-positiven Patienten anhand des Medians der Mutante/Wildtyp-Ratio (0,519) unterteilt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Ratio auf die Prognose der AML Patienten mit einer *FLT3*-ITD. Patienten mit einer hohen Mutante/Wildtyp-Ratio, definiert durch eine Ratio, die größer war als der Median von 0,519, wiesen einen signifikant schlechteren klinischen Verlauf auf als Patienten ohne *FLT3*-ITD oder Patienten mit einer Ratio kleiner als der Median. Dies zeigte sich sowohl in einem kürzeren rezidiv- und ereignisfreien Überleben sowie einem kürzeren Gesamtüberleben als auch in einem schlechteren Ansprechen auf die Induktionstherapie. Patienten mit einer Ratio, die kleiner war als der

Median, wiesen ein vergleichbares Risiko auf wie Patienten mit *FLT3*-Wildtyp. Dies war unabhängig vom NPM1-Mutationsstatus.

Zusätzlich zeigte sich in den durchgeführten Analysen eine höhere Sensitivität für die GeneScan-Analyse im Vergleich zur konventionellen PCR. Dennoch ist diese Methode im Hinblick auf die Möglichkeit der Quantifizierung der PCR überlegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die klinische Relevanz der *FLT3*-ITD-Mutante/Wildtyp-Ratio. In weiteren Therapiestudien sollte prospektiv geprüft werden, ob weitere *FLT3*-ITD-Charakteristika wie Anzahl der mutierten Klone oder Länge der ITD von prognostischer Bedeutung sind. Eine klinisch wichtige Fragestellung wäre, ob AML-Patienten mit einer hohen *FLT3*-ITD-Mutante/Wildtyp-Ratio von neuen Therapieansätzen wie einer frühen allogenen Stammzelltransplantation oder spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren profitieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, Reilly JT: FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 111: 190-195 (2000)
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* 113: 1076-1077 (2001)
3. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Astrand-Grundström I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE: Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15: 659-669 (2001)
4. 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* 145: 283-288 (1994)
5. Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G: BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol* 24: 790-797 (2006)
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DH, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria of the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med* 103: 620-625 (1985)
7. Breitenbuecher F, Markova B, Kasper S, Carius B, Stauder T, Böhmer FD, Masson K, Rönstrand L, Huber C, Kindler T, Fischer T: A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML. *Blood* 113: 4063-4073 (2009a)
8. Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, Markova B, Carius B, Brecht A, Duyster J, Haferlach T, Huber C, Fischer T: Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* 113: 4074-4077 (2009b)
9. Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Döhner H, Pollack JR: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 350: 1605-1616 (2004)
10. Bullinger L, Krönke J, Schön C, Radtke I, Urlbauer K, Botzenhardt U, Gaidzik V, Carió A, Senger C, Schlenk RF, Downing JR, Holzmann K, Döhner K, Döhner H: Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia* 24: 438-449 (2010)
11. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pette-

- nati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD: Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100: 4325-4336 (2002)
12. Carow CE, Kim E, Hawkins AL, Webb HD, Griffin CA, Jabs EW, Civin CI, Small D: Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q12-->q13. *Cytogenet Cell Genet* 70: 255-257 (1995)
 13. 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/Flk2) in human leukemias. *Blood* 87: 1089-1096 (1996)
 14. Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J, Chakrabarty A, Rottapel R: Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* 23: 3067-3078 (2003)
 15. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KT, Büchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Löwenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD: Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 21: 4642-4649 (2003)
 16. Choudhary C, Brandts C, Schwable J, Tickenbrock L, Sargin B, Ueker A, Böhmer F, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H: Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 110: 370-374 (2007)
 17. Christensen JL, Weissman IL: Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14541-14546 (2001)
 18. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, van Oostveen JW, Waisfisz Q, Corthals S, de Lange D, Boeckx N, Hählen K, Reinhardt D, Creutzig U, Schuurhuis GJ, Zwaan CM, Kaspers GJL: Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia* 20: 1217-1220 (2006)
 19. Cox, David R: Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society B* 34: 187-220 (1972)
 20. Dash A, Gilliland DG: Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 14: 49-64 (2001)
 21. Döhner H: Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program Review*: 412-419 (2007)
 22. Döhner K, Döhner H: Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93: 976-982 (2008)
 23. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and nor-

- mal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106: 3740-3746 (2005)
24. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115: 453-474 (2010)
 25. Drexler HG: Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 10: 588-599 (1996)
 26. Estey E, Döhner H: Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368: 1894-1907 (2006)
 27. Fenaux P: Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 73: 429-437 (2001)
 28. Fenske TS, Pengue G, Mathews V, Hanson PT, Hamm SE, Riaz N, Graubert TA: Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15184-15189 (2004)
 29. Ferrara F, Pinto A: Acute myeloid leukemia in the elderly: current therapeutic results and perspectives for clinical research. *Rev Recent Clin Trials* 2: 33-41 (2007)
 30. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck 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* 100: 4372-4380 (2002a)
 31. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K: Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 20: 2480-2485 (2002b)
 32. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL: Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 23: 6285-6295 (2005)
 33. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC: The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 111: 2776-2784 (2008)
 34. Gilliland DG, Griffin JD: Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol* 9: 274-281 (2002a)
 35. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100: 1532-1542 (2002b)
 36. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA: The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 80-97 (2004)
 37. 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. *Mol Cell* 13: 169-178 (2004)

38. Grimwade D: The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 497-529 (2001)
39. 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 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92: 2322-2333 (1998)
40. Grisolan JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ: Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 89: 376-387 (1997)
41. de Guzman CG, Warren AJ, Zhang Z, Gartland L, Erickson P, Drabkin H, Hiebert SW, Klug CH: Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. *Mol Cell Biol* 22: 5506-5517 (2002)
42. Harada S, Kimura T, Fujiki H, Nakagawa H, Ueda Y, Itoh T, Yamagishi H, Sonoda Y: Flt3 ligand promotes myeloid dendritic cell differentiation of human hematopoietic progenitor cells: possible application for cancer immunotherapy. *Int J Oncol* 30: 1461-1468 (2007)
43. He LZ, Tribioli C, Rivi R, Peruzzi D, Pelicci PG, Soares V, Cattoretti G, Pandolfi PP: Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5302-5307 (1997)
44. Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, Watanabe A, Kikuta A, Tanaka A, Asami K, Sekine I, Mugishima H, Nishimura Y, Koizumi S, Horikoshi Y, Mimaya J, Ohta S, Nishikawa K, Iwai A, Shimokawa T, Nakayama M, Kawakami K, Gushiken T, Hyakuna N, Fujimoto T: Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia* 13: 38-43 (1999)
45. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assn* 53: 457-481 (1958)
46. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser H, Döhner, 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* 114: 2386-2392 (2009)
47. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, Ley TJ, Gilliland DG: PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Aca. Sci U S A* 99: 8283-8288 (2002)
48. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, Tamura J, Shimazaki C, Matsue K, Kobayashi H, Arima N, Suzuki R, Morishita H, Saito H, Ueda R, Ohno R: Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia* 11: 1447-1452 (1997)

49. 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 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93: 3074-3080 (1999)
50. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 12: 1333-1337 (1998)
51. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T: Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 21: 2555-2563 (2002)
52. Korn EL: Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Stat Med* 5: 255-260 (1986)
53. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, 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* 98: 1752-1759 (2001)
54. Kruskal WH, Wallis WA: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583-621 (1952)
55. Kuchenbauer F, Kern W, Schoch C, Kohlmann A, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S: Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 90: 1617-1625 (2005)
56. Kusec R, Jaksic O, Ostojic S, Kardum-Skelin I, Vrhovac R, Jaksic B: More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 108: 405-406; author reply 406 (2006)
57. Lee BH, Tothova Z, Levine RL, Anderson K, Buza-Vidas N, Cullen DE, McDowell EP, Adelsperger J, Fröhling S, Huntly BJ, Beran M, Jacobsen SE, Gilliland DG: FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Cell* 12: 367-380 (2007)
58. Levis M, Murphy KM, Pham R, Kim K, Stine A, Li L, McNiece I, Smith BD, Small D: Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. *Blood* 106: 673-680 (2005)
59. Löwenberg B: Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 65-75 (2001)
60. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341: 1051-1062 (1999)
61. Mantel N, Haenzel W: Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22: 719-748 (1959)
62. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, Marchetto S, Lavezzi C, Mannoni P, Birn-

- baum D, Dubreuil P: Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 8: 909-918 (1993)
63. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR: A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 65: 1143-1152 (1991)
64. 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* 95: 3489-3497 (2000)
65. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, Bernstein ID, Radich JP: Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 97: 89-94 (2001)
66. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Boggon TJ, Gerbing RB, Rocnik JL, Lange BJ, Gilliland DG, Radich JP: Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 111: 4930-4933 (2008)
67. Mills KI, Gilkes AF, Walsh V, Sweeney M, Gale R: Rapid and sensitive detection of internal tandem duplication and activating loop mutations of FLT3. *Br J Haematol* 130: 203-208 (2005)
68. Minden M, Imrie K, Keating A: Acute leukemia in adults. *Curr. Opin. Hematol* 3: 259-265 (1996)
69. Mitelman F (ed): ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger, Basel (1995)
70. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H: Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96: 3907-3914 (2000)
71. Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD: Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 19-47 (2001)
72. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD: Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18: 115-136 (2004)
73. Mrózek K, Döhner H, Bloomfield CD: Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 14: 106-114 (2007)
74. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24: 17-27 (1992)
75. 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* 10: 1911-1918 (1996)
76. Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, Watamoto K, Emi N, Abe A, Kiyoi H,

- Towatari M, Naoe T: Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia* 21: 403-410 (2007)
77. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27: 263-270 (2001)
78. Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, Ciolli S, Guglielmelli P, Antonioli E, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM: The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 20: 2074-2076 (2006)
79. Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG: FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 17: 120-124 (2003)
80. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner K, Hiddemann W, Spiekermann K: Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 107: 3700-3707 (2006)
81. Rocnik JL, Okabe R, Yu J, Lee BH, Giese N, Schenkein DP, Gilliland DG: Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 108: 1339-1345 (2006)
82. Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE: Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia* 14: 675-683 (2000)
83. Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D: Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 6: 1641-1650 (1991)
84. Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D: Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 10: 238-248 (1996)
85. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491 (1988)
86. Schessl C, Rawat VP, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, Spiekermann K, Humphries RK, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C: The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* 115: 2159-2168 (2005)
87. 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 Engl J Med* 358: 1909-1918 (2008)
88. Schlenk RF, Ganser A, Döhner H: Prognostic and Predictive effect of molecular and cytogenetic aberrations in acute myeloid leukemia. *ASCO Educational Book*: 228-232 (2010)

89. 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 subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100: 59-66 (2002)
90. Shih L, Huang C, Wu J, Lin T, Dunn P, Wang P, Kuo M, Lai C, Hsu H: Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 100: 2387-2392 (2002)
91. Sitnicka E, Buza-Vidas N, Larsson S, Nygren JM, Liuba K, Jacobsen SEW: Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* 102: 881-886 (2003)
92. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96: 4075-4083 (2000)
93. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-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* 107: 3724-3726 (2006)
94. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *IARC Press* 2: 109-139 (2008)
95. 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* 99: 4326-4335 (2002)
96. Tse KF, Mukherjee G, Small D: Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 14: 1766-1776 (2000)
97. Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC: FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 88: 3383-3390 (1996)
98. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 100: 2292-2302. Review (2002)
99. Vempati S, Reindl C, Kaza SK, Kern R, Malamoussi T, Dugas M, Mellert G, Schnittger S, Hiddemann W, Spiekermann K: Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. *Blood* 110: 686-694 (2007)

100. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz 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 Res* 61: 7233-7239 (2001)
101. Wilcoxon F: Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* 1: 80-83 (1945)
102. 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 the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 11: 1605-1609 (1997)
103. Zhang S, Fukuda S, Lee Y, Hangoc G, Cooper S, Spolski R, Leonard WJ, Broxmeyer HE: Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med* 192: 719-728 (2000)
104. Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, Veerman AJP, Huismans DR, Munske L, Podleschny M, Hählen K, Pieters R, Zimmermann M, Reinhardt D, Harbott J, Creutzig U, Kaspers GJL, Griesinger F: FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 102: 2387-2394 (2003)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die bei dieser Arbeit direkt oder indirekt mitgewirkt haben.

Zunächst möchte ich mich ausdrücklich bei Frau Prof. Dr. med. Konstanze Döhner für die Überlassung des Themas und vor allem die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotionsarbeit bedanken. Ihre Zuverlässigkeit sowie ihre kompetenten Anregungen waren mir bei der Erstellung dieser Arbeit eine große Hilfe.

Besonderen Dank möchte ich Frau Marianne Habdank aussprechen. Sie hat mich nicht nur während der Experimente hervorragend betreut, sondern war auch darüber hinaus stets eine zuverlässige und hilfsbereite Ansprechpartnerin. Die Zusammenarbeit mit ihr hat mir viel Freude bereitet.

Frau Dr. med. Sabine Kayser danke ich für ihre hilfreichen Korrekturvorschläge.

Weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für Zytogenetische und Molekulare Diagnostik der Klinik für Innere Medizin III der Universität Ulm, die mir in Rat und Tat zu Seite standen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und bei meinem Bruder sowie Bernd Hecker für die Hilfe in Computerfragen herzlich bedanken.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.