

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität zu Lübeck.  
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller

---

**„Nachweis von NPM1 - und FLT3 - Mutationen  
bei Patienten mit AML“**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Jakob Lüker  
aus Hamburg

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Merz

2. Berichterstatter / Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Johannes Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27.10.2010

|                                                     |       |
|-----------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                       | Seite |
| I.1 Akute Myeloische Leukämie                       | 03    |
| I.2 FLT3 Internal Tandem Duplikation                | 06    |
| I.3 NPM1 Mutation                                   | 06    |
| I.4 Nachweismethoden einer FLT3- und NPM1- Mutation | 07    |
| I.5 Zielsetzung                                     | 08    |
| <br>II. Material und Methoden                       |       |
| II.1 Patientenmaterial                              | 09    |
| II.2 Entparaffinierung                              | 09    |
| II.3 PCR                                            | 09    |
| II.4 Gel-Elektrophorese                             | 10    |
| II.5 Ligation und Herstellung rekombinanter DNA     | 11    |
| II.6 DNA Präparation                                | 12    |
| II.7 Testverdau                                     | 12    |
| II.8 Sequenzierung                                  | 12    |
| II.9 Analyse der Sequenzen                          | 14    |
| II.10 Material                                      | 14    |
| <br>III. Ergebnisse                                 |       |
| III.1 NPM                                           | 15    |
| III.2 FLT3                                          | 19    |
| <br>IV. Diskussion                                  |       |
| IV.1 Hintergrund und Aufgabenstellung               | 21    |
| IV.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse              | 35    |
| IV.3 Ausblick                                       |       |
| IV.3.1 Neue Nachweismethoden                        | 37    |
| IV.3.2 Weitere prognostische Faktoren               | 38    |
| IV.3.3 Minimal Residual Disease                     | 43    |
| IV.3.4 Targeted Therapie                            | 44    |
| <br>V. Zusammenfassung                              | 47    |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| VI. Literaturverzeichnis | 48 |
| VII. Anhang              |    |
| VII.1 FLT-3 Sequenzen    | 54 |
| VII.2 NPM1 Sequenzen     | 60 |
| VIII. Danksagung         | 62 |
| IX. Lebenslauf           | 63 |

## I. Einleitung

Die klonalen Stammzellerkrankungen des hämatopoietischen und lymphatischen Systems werden unterteilt in myelodysplastische Syndrome, myeloproliferative Syndrome und Lymphome. Überschneidung besteht mit der historisch begründeten Einteilung der Leukämien, so rechnet man die chronisch myeloische Leukämie (CML) den myeloproliferativen Syndromen, die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) den Non-Hodgkin Lymphomen zu.

Leukämien werden unterschieden nach ihrem natürlichen Verlauf in akut oder chronisch, nach Differenzierungsmerkmalen der leukämischen Zellen in myeloisch oder lymphatisch, nach dem Reifegrad der malignen Zellen in reif oder unreif.

### I.1 Akute myeloische Leukämie

Myeloische Leukämien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich auszeichnen durch Infiltration von Knochenmark, Blut und anderen Geweben mit neoplastischen Zellen des hämatopoietischen Systems.

Die Unterscheidung in akute und chronische Leukämien basiert dabei auf dem Verlauf, den die Erkrankung ohne eine Behandlung nehmen würde. Akute Leukämien führen unbehandelt in kurzer Zeit zum Tod des Patienten.

Aufgrund der neuen Erkenntnisse zur Genese und Molekularbiologie der AML entstand 2000 die aktuell gültige WHO-Klassifikation, welche die French-American-British-Cooperative Group (FAB)-Klassifikation von 1976 (revidiert 1985) ablöste.

**Tabelle 1.1 WHO - Klassifikation der AML von 2000**

|      |                                                        |
|------|--------------------------------------------------------|
| I.   | AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Abnormalitäten |
| II.  | AML mit Dysplasie mehrerer Zellreihen                  |
| III. | Therapieassoziierte AML                                |
| IV.  | AML ohne weitere Kategorie                             |
|      | Minimal differenzierte AML                             |
|      | AML ohne Reifung                                       |
|      | AML mit Reifung                                        |
|      | Akute myelomonozytäre Leukämie                         |
|      | Akute erythroide Leukämie                              |
|      | Akute megakaryozytäre Leukämie                         |
|      | Akute basophile Leukämie                               |
|      | Akute Panmyelose mit Myelofibrose                      |

Während die FAB-Klassifikation auf Zytomorphologie und zytochemischen Kriterien basiert, kommen bei der WHO-Klassifikation Immunphänotypisierung, Molekulargenetik und klinische Kriterien hinzu. Verändert wurde außerdem der für die Diagnose einer AML notwendige Blastenanteil im Knochenmark von 30% auf 20% und die früher den MDS zugerechnete RAEBT (Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation) wurde eingegliedert.

Die alte Einteilung der FAB-Klassifikation findet sich nahezu unverändert in der Gruppe IV der WHO-Klassifikation wieder.

**Tabelle 1.2 FAB Subtypen - Klassifikation und assoziierte chromosomale Aberration**

|                  | Subtyp                                          | Anteil [%] | Chromosomen Aberration |
|------------------|-------------------------------------------------|------------|------------------------|
| M0               | AML mit minimaler Differenzierung               | 5-10       |                        |
| M1               | AML ohne Ausreifung                             | 10-20      |                        |
| M2               | AML mit Ausreifung                              | 30-45      | t(8;21)                |
| M3               | Akute Promyelozytenleukämie                     | 5-10       | t(15;17)               |
| M4               | Akute myelomonozytäre Leukämie                  | 20         |                        |
| M4 <sub>Eo</sub> | Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie |            | Inv(16)                |
| M5a              | Akute Monoblastenleukämie                       | 5          | t(9;11)                |
| M5b              | Akute Monozytenleukämie                         |            |                        |
| M6               | Akute Erythroleukämie                           | 5          |                        |
| M7               | Akute Megakaryoblastenleukämie                  | 5          |                        |

Die Therapie der AML läuft zweiphasig und beginnt mit der Induktion, mit der die komplette Remission (CR) angestrebt wird. Anschließend folgt eine Erhaltungstherapie, mit der die erreichte Remission aufrecht erhalten werden soll. Die Erfolgsrate liegt bei Erwachsenen vor dem 55. Lebensjahr bei etwa 80%, wobei 2/3 der Patienten komplette Remission bereits nach einem Induktionszyklus erreichen und 1/3 erst nach einem zweiten Zyklus. Die Raten für Patienten in höherem Alter sind deutlich schlechter.

Die höchste Wahrscheinlichkeit auf Heilung besteht bei allogener Stammzelltransplantation (SZT), bei der dem Patienten nach Hochdosisablation des körpereigenen Knochenmark Stammzellen aus Knochenmark eines HLA-kompatiblen Spenders transplantiert werden. Die Heilungsraten bei autologer Transplantation liegen niedriger, da der „Graft versus Leukemia“-Effekt fehlt.

Etwa die Hälfte der Patienten erleidet einen Rückfall nach erfolgreicher CR. Mit Chemotherapie ist dabei in den seltensten Fällen eine Heilung zu erreichen, allogene (etwa 50% Langzeitüberleben) oder autologe (etwa 20% Langzeitüberleben) SZT ist die Therapie der Wahl nach Rückfall.

Das Abschätzen des Rückfallrisikos ist somit von großer Bedeutung. Für Patienten mit hohem Risiko wird eine SZT schon nach Erreichen der ersten CR diskutiert.

Zytogenetische Analyse der AML-Patienten zeigte, dass einige chromosomale Veränderungen mit bestimmten FAB-Subtypen assoziiert sind (siehe Tabelle 1.2) und dass sich Rückschlüsse auf die Verlaufsprognose ziehen lassen. Eine gute Prognose wird ausgesprochen für die Promyelozyten-Leukämie (FAB M3) sowie eine günstige Zytogenetik: t(15;17), inv(16), t(8;21).

Es haben jedoch 40 – 50% der Patienten keine mit Standardmethoden nachweisbaren zytogenetischen Veränderung und fallen damit in Kategorie IV der WHO-Klassifikation, der eine intermediäre Prognose zugeschrieben wird (siehe Abb. 1.1).

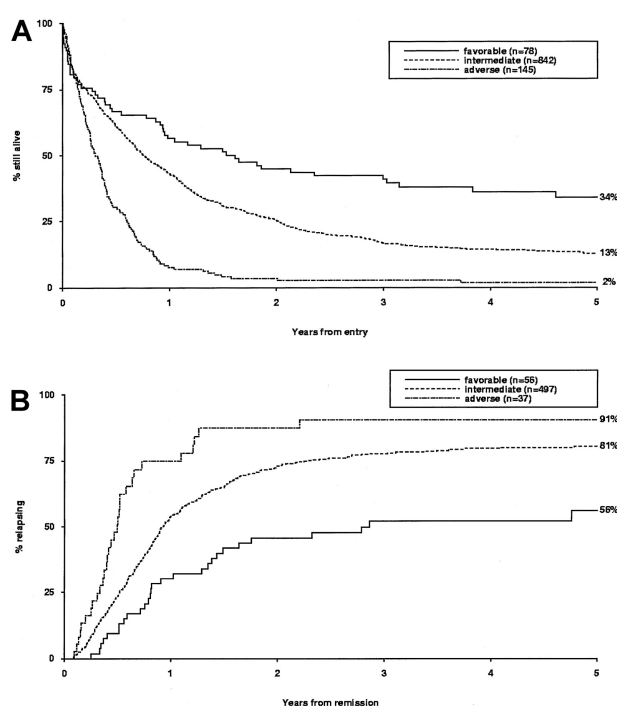


Abb. 1.1 Überleben und Rückfallrisiko bei AML Patienten. Overall survival (A) und Rückfallrisiko (B) Risikogruppen: „Favorable“ Gruppe: t(15;17), t(8;21) oder inv(16). Intermediate Gruppe: normaler Karyotyp, alle weiteren Karyotyp Abnormalitäten. „Adverse“ Gruppe: komplexer Karyotyp (5 oder mehr nicht zusammenhängende Abnormalitäten), ausgenommen Fälle mit t(15;17), t(8;21), und inv(16). Nach Grimwalde et al. 2001.

Betrachtet man allerdings individuelle Patienten innerhalb dieser Kategorie, so wird deutlich, dass sehr unterschiedliche Verläufe möglich sind und eine weitere Unterteilung dieses Patientenkollektives wünschenswert ist.

Neu identifizierte genetische Veränderungen erlauben eine weitere Unterteilung dieser heterogenen Gruppe von AML-Patienten ohne chromosomale Veränderungen für die Prognose des Verlaufs. Zwei der am häufigsten auftretenden sind Mutationen im FLT3- und NPM1-Gen. Ihr Nachweis lässt Aussagen über Wahrscheinlichkeit des Erreichens der kompletten Remission, Rückfallrisiko nach erreichter kompletter Remission sowie Gesamtüberleben zu.

## **I.2 FLT3-Mutationen**

Die „internal tandem duplication“ (ITD) -Mutation des FLT3 findet sich bei etwa 30% der erwachsenen AML-Patienten aller FAB-Subtypen, allerdings vermehrt bei FAB M3 und M5 Patienten.

Die Lokalisation und Länge (3 - 400bp) der Duplikation variiert, liegt aber immer im Leseraster. Folge der Mutation ist eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors. Bei haematopoietischen Stammzellen kommt es zur Liganden-unabhängigen Proliferation und ausbleibender Differenzierung (Nakao et al.1996).

Mehreren Studien zeigten eine signifikant schlechtere Prognose für FLT3-ITD-positive Patienten. Im Einzelnen waren die Dauer der kompletten Remission (complete remission duration, CRD), das krankheitsfreie Überleben (disease free survival, DFS) und das Langzeitüberleben (overall survival, OS) vermindert (Abu-Duhier et al. 2000, Moreno et al. 2003, Kioyi et al. 1999, Stirewalt et al. 2003).

## **I.3 NPM1-Mutation**

Für heterozygote Mutationen im NPM-Gen wird bei AML-Patienten eine Häufigkeit von etwa 50% angegeben. Für die erstmalig 2005 von Falini et al. beschriebenen Mutationen sind inzwischen 38 Varianten identifiziert, darunter drei Mutationen (A, B, D), die zusammen 90% aller NPM-Mutationen stellen.

Es kommt bei allen Mutationen zum Verlust mindestens eines oder beider Tryptophanreste an Position 288 und 290, die allem Anschein nach für die

nukleäre Lokalisation eine wichtige Rolle spielen.

NPM1-Mutationen finden sich bei AML-Patienten aller FAB-Subtypen, mit Ausnahme von FAB M3 (akute Promyelozyten Leukämie). Die größte Häufigkeit findet sich bei FAB M4 und M5. Es zeigt sich außerdem eine Assoziation zu FLT3-ITD-Mutationen.

Bei Patienten mit normalem Karyotyp und NPM1-Mutation zeigte sich in mehreren Studien eine höhere Rate des Erreichens einer kompletten Remission im Vergleich zu Patienten ohne Mutation. Die meisten Studien zeigten außerdem ein besseres disease free survival (DFS) und OS. Vor allem Patienten ohne zusätzliche FLT-ITD-Mutation wiesen eine bessere Prognose auf.

Es besteht also Evidenz, dass sich der Nachweis von NPM1- und FLT3-ITD Mutationen zur verbesserten Risikostratifizierung von AML-Patienten eignet und in die Routinediagnostik aufgenommen werden sollte (Fröhling et al. 2002, Small, D. 2006, Schnittger et al. 2005, Döhner et al. 2005, Thiede et al. 2006).

#### **I.4 Nachweismethoden einer FLT3- und NPM1-Mutation**

Die in der Literatur am häufigsten genutzte Nachweismethode ist die Sequenzierung. Die genomische DNA wird zunächst mit spezifischen Primern amplifiziert. Es besteht die Möglichkeit, eine Direktsequenzierung durchzuführen oder vor dem Sequenzieren das PCR-Produkt zu klonieren.

In der Sequenzanalyse wird die Patientensequenz mit dem Wildtyp verglichen. Diese Methode ist sowohl bei NPM1- als auch FLT3-Mutationen geeignet.

Elektrophorese eignet sich aufgrund der Differenz der Länge von Wildtyp und Mutation lediglich für die FLT3-ITD-Mutationen. Die genomische DNA wird mit spezifischen Primern amplifiziert und das Produkt per Elektrophorese aufgetrennt. Der Vergleich der Wildtyp-Bande mit der Patienten-Bande zeigt eine Längendifferenz und weist auf eine Mutation hin. Zur Bestätigung sollte jedoch im Anschluss eine Sequenzierung durchgeführt werden.

Problematisch ist hingegen die variable Länge der ITD, die bei kleiner Duplikation eine Identifikation in der Elektrophorese schwierig gestaltet. Eine Lösung bietet hier die Kapillarelektrophorese:

Hierfür wird die genomische DNA des Patienten mit fluoreszenzmarkierten

Primern spezifisch für FLT3 oder NPM1 amplifiziert. In der Kapillar-elektrophorese zeigt sich der Wildtyp-Peak bei 291 (NPM1) oder 329 bp (FLT3), Mutationen weisen aufgrund der zusätzlichen Basenpaare einen höheren Peak auf.

### **I.5 Zielsetzung**

Es soll eine Nachweismethode für NPM1- und FLT-ITD-Mutationen für die Routinediagnostik des Institutes für Pathologie der Universitätsklinik Lübeck etabliert werden.

Durchgeführt werden die Klonierung und Amplifikation von Patienten-DNA mit anschließender Sequenzierung mit geeigneten Primern sowie eine Direktsequenzierung ausgewählter Patienten. Die Patientensequenzen werden mit der Wildtypsequenz abgeglichen.

## II. Material und Methoden

### II.1 Patientenmaterial

Ausgewählt wurden Patienten aus dem Jahr 2006 mit gesicherter AML M5, da bei diesem Subtyp die höchsten Mutationsraten beschrieben sind. Die in Paraffin konservierten Beckenkammstanzen entstammen dem Archiv des Instituts für Pathologie Campus Lübeck

### 2.2 Entparaffinierung

Die Entparaffinierung und Aufbereitung des Patientenmaterials erfolgt mit dem QuiaAmp Mini Kit 250 der Firma QIAGEN.

Anschließend wird mit dem NanoDrop der DNA-Gehalt der Probe gemessen.

### II.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Alle PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe der „puReTaq Ready-To-Go“ PCR-Beads von Amersham Biosciences in 200µL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ready-To-Go Beads enthalten außer Primer und DNA alle für die PCR-Reaktion notwendigen Bestandteile in Raumtemperatur stabiler Form. Der allgemeine Ansatz, die verwendeten Primer und das PCR-Programm sind tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 2.1: PCR-Ansatz mit PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| DNA-Template              | 200 ng             |
| Primer (100pmol/mL)       | 4pmol/mL           |
| KCL und MgCl <sub>2</sub> | 50mM und 1,5mM     |
| TRIS-HCL (pH 9,0)         | 10mM               |
| dNTPs                     | je 200 µM          |
| PuReTaq DNA Polymerase    | 2,5 U pro Ansatz   |
| Aqua bidest               | ad Endvolumen 25µL |

Tabelle 2.2: PCR Programm

| Schritt                       | Temperatur [°C] | Dauer [sek] |
|-------------------------------|-----------------|-------------|
| 1. initiale Denaturierung     | + 94            | 240         |
| 2. Denaturierung              | + 94            | 30          |
| 3. Anlagerung                 | + 53            | 30          |
| 4. Elongation                 | + 72            | 45          |
| 40 x wiederholen ab Schritt 2 |                 |             |
| 5. finale Elongation          | + 72            | 240         |
| 6. Pause                      | + 4,0           | ∞           |

Tabelle 2.3: verwendete Forward- und Reverse-Primer für NPM und FLT3

| Name         | Sequenz                          |
|--------------|----------------------------------|
| NPM - I11 f  | 5' - GTGGTAGAATGAAAAATAGAT - 3'  |
| NPM - E12 r  | 5' - CTTGGCAATAGAACCTGGAC - 3'   |
| FLT3 / ITD f | 5'- GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC - 3' |
| FLT3 / ITD r | 5'- CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC - 3' |

## II.4 Gel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der PCR- und Testverdau-Produkte erfolgt die Größentrennung der DNA-Fragmente mittels Elektrophorese. Hierbei sollte der Anteil an Agarose mit der erwarteten Größe des DNA-Fragments korrelieren. Verwendet wird ein 2% Agarosegel (2g / 100ml TAE Puffer) für Fragmente < 750bp.

Zur Herstellung der Gels werden Agarose und TAE-Puffer in beschriebener Konzentration zusammengegeben und in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt. Zum Anfärben der DNA werden nach kurzem Abkühlen 7µl / 100ml Ethidiumbromid hinzu pipettiert. Das lösliche Gel wird in die Elektrophorese-Apparatur gegossen und zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach Beladen der Geltaschen mit PCR Produkt erfolgt die Trennung mit einer angelegten Spannung von 70 -100V in TAE-Puffer für etwa 1 Stunde. Durch UV-Licht wird im Anschluss die DNA sichtbar gemacht und mit einer Gel-dokumentationseinheit fotografiert.

## II.5 Ligation und Herstellung rekombinanter DNA

### Ligation

Ligationen von PCR-Produkten in den Vektor pCR II® –TOPO® werden nach Protokoll mit dem TOPO-TA Cloning-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt.

Der Plasmid-Vektor liegt linearisiert vor und besitzt einzelne T-Überhänge für das TA-Klonieren, sowie kovalent gebundene Topoisomerase. Taq-Polymerase hat eine terminale Transferaseaktivität, die ein Desoxyadenosin (A) an das Ende eines jeden PCR-Produktes hängt. Dies erlaubt die Ligation des PCR-Produktes am T-Überhang des Vektors. Die hierfür notwendige Energie entstammt der kovalenten Bindung der Topoisomerasen am Tyrosinrest.

### Bakterienkulturen

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wird die Bakterienkultur OneShot® TOP10 von Invitrogen verwendet.

### Hitzeschock Transformation

Zu Beginn werden 50µL der bei -80°C lagernden kompetenten Zellen auf Eis langsam aufgetaut. Hierzu werden 2µL Ligationsansatz gegeben und vermischt, dabei muss auf Pipettieren verzichtet werden, um Scherkräfte zu vermeiden. Dieser Ansatz wird 5 - 30 Minuten auf Eis inkubiert, für genau 30 Sekunden im Wasserbad auf 42°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Als nächstes werden 250µL vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und vermischt. Der Ansatz wird nun für 1 Stunde bei 37°C in einem Schüttelinkubator (200rpm) inkubiert. Zur späteren Selektion von Kolonien werden Agarplatten zur Blau-Weiß-Selektion mit Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside) vorbereitet. Auf einer Platte werden 20µL des Transformationsansatzes mit Glaskugeln ausgestrichen, auf einer weiteren Platte der restliche Ansatz. Im Anschluss werden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Übernachtskulturen zur Plasmidreinigung

Von den Agarplatten werden 10 positiv-ligierte Bakterienkolonien (weiß) gepickt und in 3mL-selektivem LB-Medium (final: 100µg/mL Ampicillin) überführt.

Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 200rpm geschüttelt.

## II.6 DNA Präparation

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgt nach Protokoll mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit® der Firma QIAGEN.

Das Prinzip der Aufreinigung basiert auf alkalischer Lyse der bakteriellen Zellen, gefolgt von Adsorption der freiwerdenden DNA an einer Silikat-Membran in salzigem Puffer. Nach Auswaschen der bakteriellen Reste kann die Plasmid-DNA mit gering salzhaltigem Wasser oder Puffer von der Membran eluiert werden.

## II.7 Testverdau

Zur Kontrolle der Klonierung wird ein Testverdau mit anschließender Gel-elektrophorese durchgeführt. Der Verdauansatz ist tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 2.4: Testverdau Ansatz

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| DNA                                  | 10 µl  |
| Eco RI Puffer H                      | 5,0 µl |
| Eco RI                               | 1,0 µl |
| Aqua bidest                          | 34 µl  |
| Inkubation bei 37°C für mind. 90 min |        |

## Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wird mit Hilfe des NanoDrop bestimmt. Hierzu wird vor der Messung das Gerät mit nukleasefreiem Wasser initialisiert und im Anschluss mit der Eichlösung (Elutionspuffer der DNA) der Blank-Wert bestimmt. Sollte das Messen des Blank-Wertes keine Null-Linie ergeben, ist das Eichen zu wiederholen. Zum Messen der Proben werden 2µl der Probe auf den Sensor pipettiert.

## II.8 Sequenzierung

Die Sequenzierungen werden durchgeführt mit dem CEQ 8800 der Firma BeckmanCoulter®.

### Template Vorbereitung

Die optimale Konzentration an dsDNA zur Sequenzierung beträgt 50-100 fmol. Das molare Verhältnis von Sequenzierprimer zu Template sollte größer 40:1 sein. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der einzusetzenden Menge für die gewünschte Konzentration.

Tabelle 2.5: Schätzwerte der einzusetzenden Menge dsDNA für gewünschte Konzentrationen. Nach BeckmanCoulter® Protokoll.

| Größe [kb] | ng für 25 fmol | ng für 50 fmol | ng für 100 fmol |
|------------|----------------|----------------|-----------------|
| 0,2        | 3,3            | 6,5            | 13              |
| 0,3        | 4,9            | 9,8            | 20              |
| 0,4        | 6,5            | 13             | 26              |
| 0,5        | 8,1            | 16             | 33              |

### Sequenzierungsansatz

Der Ansatz sollte auf Eis und in der folgenden Reihenfolge pipettiert werden.

Tabelle 2.6: Sequenzierungsansatz nach BeckmanCoulter® Protokoll.

| Reagenz                          | Menge [µl]             |
|----------------------------------|------------------------|
| HPLC Wasser (ad 20µl)            | 0 – 9,5                |
| DNA Template                     | 0,5 – 10 (siehe 2.8.1) |
| Sequenzierprimer M13 for und rev | je 1,0                 |
| DTCS Quick Start Mastermix®      | 8,0                    |
| GESAMT                           | 20,0                   |

### Thermalcycler Programm

Tabelle 2.7: Thermalcycler Programm nach BeckmanCoulter® Protokoll

| Schritt          | Temperatur [°C] | Dauer [sek] |
|------------------|-----------------|-------------|
| 1. Denaturierung | + 96            | 20          |
| 2. Anlagerung    | + 50            | 20          |
| 3. Elongation    | + 60            | 240         |
| 30 x wiederholen |                 |             |
| 4. Pause         | + 4,0           | ∞           |

### Magnetic Bead Präzipitation

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgt, nach Protokoll, mit dem CleanSeq® Kit der Firma Agencourt. Nach der Aufreinigung sind die Proben sequenzierbar.

## **II.9 Analyse der Sequenzen**

Die Sequenzen der Patientenproben werden verglichen mit vorbeschriebenen Wildtypsequenzen.

### Alignment

Hierfür wird das BLAST 2 SEQUENCE Tool des National Center for Biotechnology Information (NCBI) des National Institute of Health (NIH) verwendet. Zu finden unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.

Referenz: Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250

### Chromatogramme

Die Chromatogramme der Patientensequenzen werden zur genaueren Analyse der Sequenzierung und zum Vergleich mit Referenzsequenzen mit dem Programm Chromas LITE® der Firma Technelysium dargestellt.

## **II.10 Material**

TAE Puffer: 2M Tris-X, 57,1mL Acetat (100%), 50mM EDTA ad H<sub>2</sub>O zu 1L

LB – Medium: 10g/L Tryptone, 10g/L Hefeextrakt, 5g/L NaCl pH 7,4 (NaOH), autoklaviert.

SOC – Medium: 20g/L Pepton 140, 5g/L Hefeextrakt, 0,58g/L NaCl, 0,186g/L KCl pH 7,0 (NaOH), autoklaviert und zusätzlich mit 2mM MgCl<sub>2</sub> und 20mM Glucose versetzt.

LB – Platten: 1L LB-Medium wurde mit 12g AgarAgar versetzt und nach dem Abkühlen auf zirka 50°C (Wasserbad) Ampicillin zugegeben. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen etwa 25 bis 30mL des Mediums in eine Petrischale gegossen. Nach 15min wurden die Platten bei 4°C eingelagert.

Ampicillin: Sigma-Aldrich, Stocklösung zu 100mg/mL

### III. Ergebnisse

Tabelle 3.1 Auswertung

| Patient | FLT3 Sequenz          | NPM1 Sequenz         |
|---------|-----------------------|----------------------|
| A       | Wildtyp               | Wildtyp              |
| B       | stumme Mutation       | Basenaustausch bp966 |
| C       | Wildtyp               | Wildtyp              |
| D       | Wildtyp               | CTCG Einschub bp960  |
| E       | Wildtyp               | CATG Einschub bp960  |
| F       | Wildtyp               | Wildtyp              |
| G       | Punktmutation Exon 11 | Basenaustausch bp959 |
| H       | Wildtyp               | Basenaustausch bp959 |

#### III.1 NPM1

Ein 4-bp-Einschub an Position 960 des NPM1-Gen fand sich bei zwei der acht Patienten. Patient D zeigte einen CTCG-Einschub mit Leserasterverschub und konsequentem Verlust beider Tryptophanreste an 288 und 290 sowie einer verlängerten Aminosäure (AS)-Sequenz. Von Falini et al. als Mutation A vorbeschrieben.

|                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |      |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|------|
| Wildtyp AS      | I   | Q   | D   | L   | W   |     | Q   | W   | R   | K   | S   | L   | STOP |     |     |      |     |      |
| Wildtyp Sequenz | 5'- | ATT | CAA | GAT | CTC | TG  | --- | G   | CAG | TGG | AGG | AAG | TCT  | CTT | TAA | GAAA | TAG | - 3' |
| Sequenz Pat. D  | 5'- | ATT | CAA | GAT | CTC | TGT | CTG | GCA | GTG | GAG | GAA | GTC | TCT  | TTA | AGA | AAA  | TAG | - 3' |
| Patienten AS    | I   | Q   | D   | L   | C   | L   | A   | V   | E   | E   | V   | S   | L    | R   | K   | STOP |     |      |

Abb. 3.1 Patient D - NPM1 Wildtyp- und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code.  
Blau unterlegt, die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste. In Rot, das 4bp große Insert an Position 960 (bp) des NPM1 Gens.  
Von Falini et al. vorbeschrieben als Mutation A.

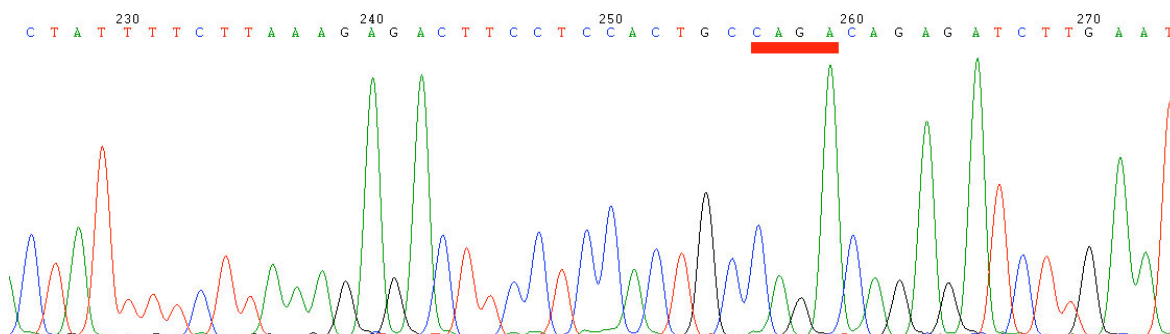
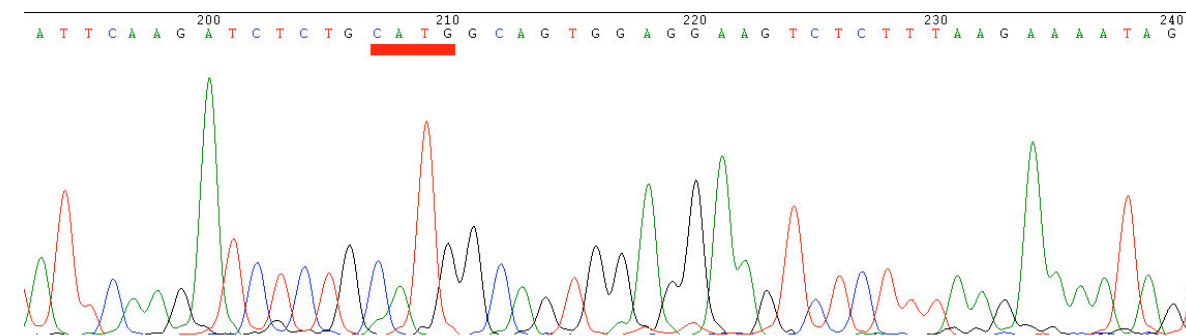


Abb. 3.2 Patient D - reverse, komplementäre NPM1 Sequenz in 3' - 5' Orientierung

Bei Patient E fand sich ein CATG-Einschub, ebenfalls mit Leserasterverschub und Verlust beider Tryptophanreste sowie verlängerter AS Sequenz. Diese Form ist durch Falini et al. als Mutation B vorbeschrieben.

|                 |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |      |     |      |
|-----------------|-----|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|------|
| Wildtyp AS      | I   | Q          | D          | L          | W          |     | Q   | W   | R   | K   | S   | L   | STOP |     |     |      |     |      |
| Wildtyp Sequenz | 5'- | <u>ATT</u> | <u>CAA</u> | <u>GAT</u> | <u>CTC</u> | TG  | --- | G   | CAG | TGG | AGG | AAG | TCT  | CTT | TAA | GAAA | TAG | - 3' |
| Sequenz Pat. E  | 5'- | <u>ATT</u> | <u>CAA</u> | <u>GAT</u> | <u>CTC</u> | TGC | ATG | GCA | GTG | GAG | GAA | GTC | TCT  | TTA | AGA | AAA  | TAG | - 3' |
| Patienten AS    | I   | Q          | D          | L          | C          | N   | A   | V   | E   | E   | V   | S   | L    | R   | K   | STOP |     |      |

**Abb. 3.3** Patient E - NPM1 Wildtyp- und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code. Blau unterlegt, die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste. In Rot, das 4bp große Insert an Position 960 (bp) des NPM1 Gens. Von Falini et al. vorbeschrieben als Mutation B.



**Abb. 3.4** Patient E - NPM1 Sequenz in 5' - 3' Orientierung

Bei drei Patienten fanden sich nicht vorbeschriebene Punktmutationen in den Sequenzierungen. Patient B weist einen Basenaustausch an Position 966 auf, der zu einem Stop-Codon an dieser Position führt.

|                 |     |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |          |      |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|----------|------|
| Wildtyp AS      | I   | Q   | D   | L   | W   | Q   | W    | R   | K   | S   | L   | STOP |     |          |      |
| Wildtyp Sequenz | 5'- | ATT | CAA | GAT | CTC | TGG | CAG  | TGG | AGG | AAG | TCT | CTT  | TAA | GAAAATAG | - 3' |
| Sequenz Pat. B  | 5'- | ATT | CAA | GAT | CTC | TGG | CAG  | TAG | AGG | AAG | TCT | CTT  | TAA | GAAAATAG | - 3' |
| Patienten AS    | I   | Q   | D   | L   | W   | Q   | STOP |     |     |     |     |      |     |          |      |

Abb. 3.5 Patient B - NPM1 Wildtyp- und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code. Blau unterlegt, die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste. In Rot, die Punktmutation mit Basenaustausch an Position 966 (bp) des NPM1 Gens.

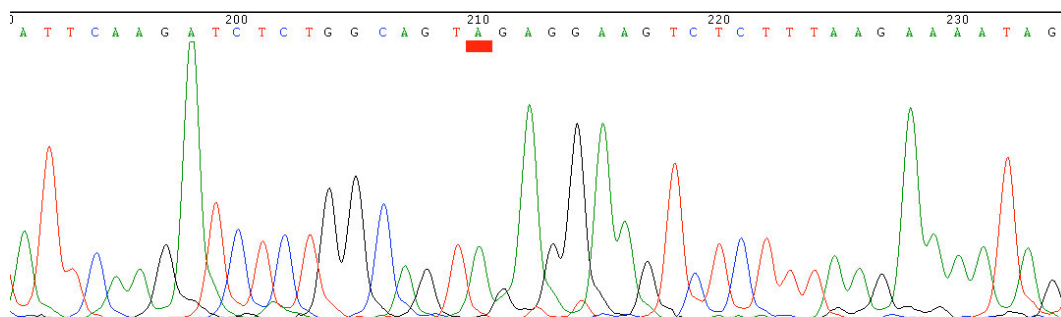


Abb. 3.6 Patient B - NPM1 Sequenz in 5' - 3' Orientierung

Patient G weist einen Basenaustausch an Position 959 bp auf, der am für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanrest an Position 288 zu einem Austausch der AS führt.

|                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |          |      |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----------|------|
| Wildtyp AS      | I   | Q   | D   | L   | W   | Q   | W   | R   | K   | S   | L   | STOP |     |          |      |
| Wildtyp Sequenz | 5'- | ATT | CAA | GAT | CTC | TGG | CAG | TGG | AGG | AAG | TCT | CTT  | TAA | GAAAATAG | - 3' |
| Sequenz Pat. G  | 5'- | ATT | CAA | GAT | CTC | CGG | CAG | TGG | AGG | AAG | TCT | CTT  | TAA | GAAAATAG | - 3' |
| Patienten AS    | I   | Q   | D   | L   | R   | Q   | W   | R   | K   | S   | L   | STOP |     |          |      |

Abb. 3.7 Patient G - NPM1 Wildtyp- und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code. Blau unterlegt, die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste. In Rot, die Punktmutation mit Basenaustausch an Position 959 (bp) des NPM1 Gens.

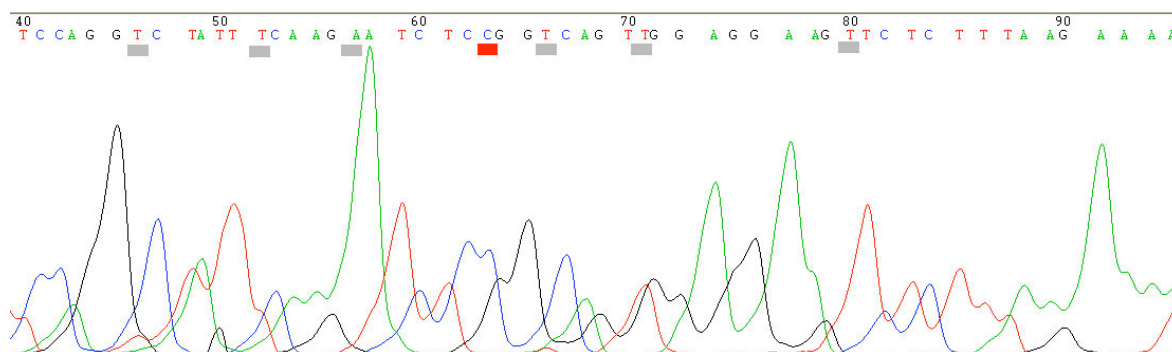


Abb. 3.8 Patient G - reverse, komplementäre NPM1 Sequenz der Direktsequenzierung in 3' - 5' Orientierung. In Grau, die Abweichungen der automatischen Sequenzerkennung von der Wildtypsequenz.

Diese Mutation wurde durch eine durchgeführte Direktsequenzierung des Patienten bestätigt. Die Abweichungen von der Wildtypsequenz lassen sich durch Heterozygotie oder Auswertungsfehler des Chromatogrammprogramm erklären.

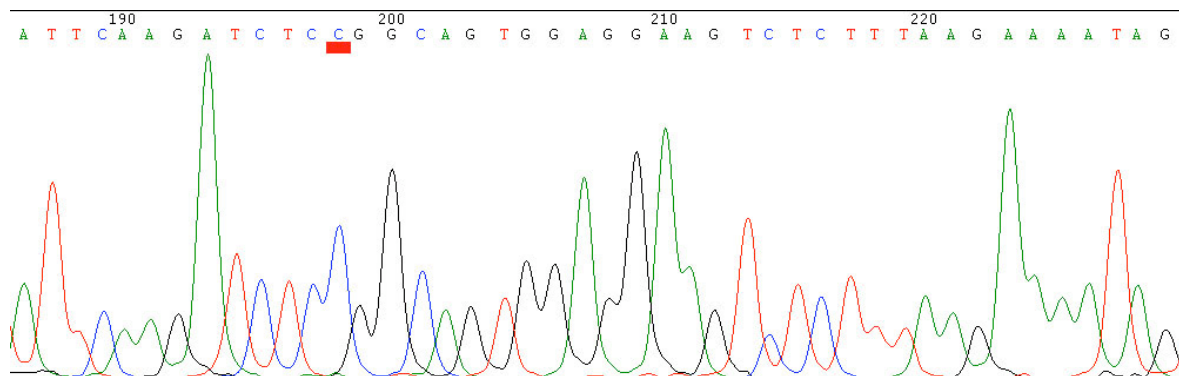


Abb. 3.9 Patient G - NPM1 Sequenz in 5' - 3' Orientierung

Bei Patient H fand sich die gleiche Punktmutation an Position 959 bp wie bei Patient G, mit AS-Austausch am ersten Tryptophanrest.

|                     |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |               |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------|
| Wildtyp AS          | I          | Q          | D          | L          | W          | Q          | W          | R          | K          | S          | L          | STOP       |               |
| Wildtyp Sequenz 5'- | <u>ATT</u> | <u>CAA</u> | <u>GAT</u> | <u>CTC</u> | <u>TGG</u> | <u>CAG</u> | <u>TGG</u> | <u>AGG</u> | <u>AAG</u> | <u>TCT</u> | <u>CTT</u> | <u>TAA</u> | GAAAATAG - 3' |
| Sequenz Pat. H 5'-  | <u>ATT</u> | <u>CAA</u> | <u>GAT</u> | <u>CTC</u> | <u>CGG</u> | <u>CAG</u> | <u>TGG</u> | <u>AGG</u> | <u>AAG</u> | <u>TCT</u> | <u>CTT</u> | <u>TAA</u> | GAAAATAG - 3' |
| Patienten AS        | I          | Q          | D          | L          | R          | Q          | W          | R          | K          | S          | L          | STOP       |               |

Abb. 3.10 Patient H - NPM1 Wildtyp- und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code.  
Blau unterlegt, die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste. In Rot, die Punktmutation mit Basenaustausch an Position 959 (bp) des NPM1 Gens.

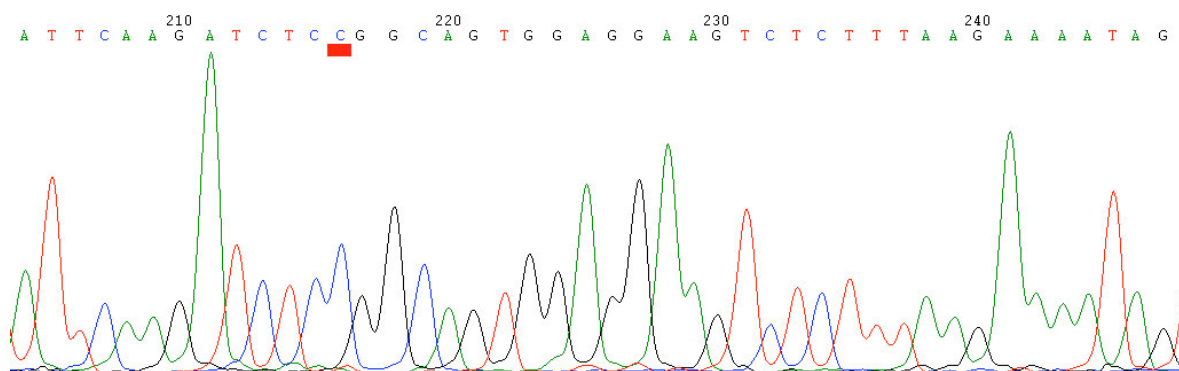


Abb. 3.11 Patient H - NPM1 Sequenz in 5' - 3' Orientierung

Die restlichen Patienten A, C und F wiesen keine Mutationen auf. Ihre Sequenzen waren identisch mit der Wildtypsequenz.

### III.2 FLT3

Bei den FLT3-Sequenzen der sequenzierten Patienten fanden sich keine ITD-Mutationen, dafür jedoch bei zwei Patienten nicht vorbeschriebene Punktmutationen.

Patient B hat eine stumme Mutation mit Basenaustausch im Exon 12 des FLT3 - Gens, der zu keiner Veränderung der AS-Sequenz führt.

|                     |                                                                                                                                                                         |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wildtyp AS          | G K V L G S G A F G K V M N A T A Y G I S K T G V <b>S</b> I Q V A V K M L K                                                                                            |
| Wildtyp Sequenz 5'- | <u>GGG AAG GTA CTA GGA TCA GGT GCT TTT GGA AAA GTG ATG AAC GCA ACA GCT TAT GGA</u><br><u>ATT AGC AAA ACA GGA GTC TCA ATC CAG GTT GCC GTC AAA ATG CTG AAA G - 3'</u>     |
| Sequenz Pat. B      | 5'- <u>GGG AAG GTA CTA GGA TCA GGT GCT TTT GGA AAA GTG ATG AAC GCA ACA GCT TAT GGA</u><br><u>ATT AGC AAA ACA GGA GTC TCG ATC CAG GTT GCC GTC AAA ATG CTG AAA G - 3'</u> |
| Patienten AS        | G K V L G S G A F G K V M N A T A Y G I S K T G V <b>S</b> I Q V A V K M L K                                                                                            |

Abb. 3.12 Patient B - FLT3 / exon 12, Wildtyp- und Patientensequenz im Leserraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code.  
In Rot, die Punktmutation mit Basenaustausch.

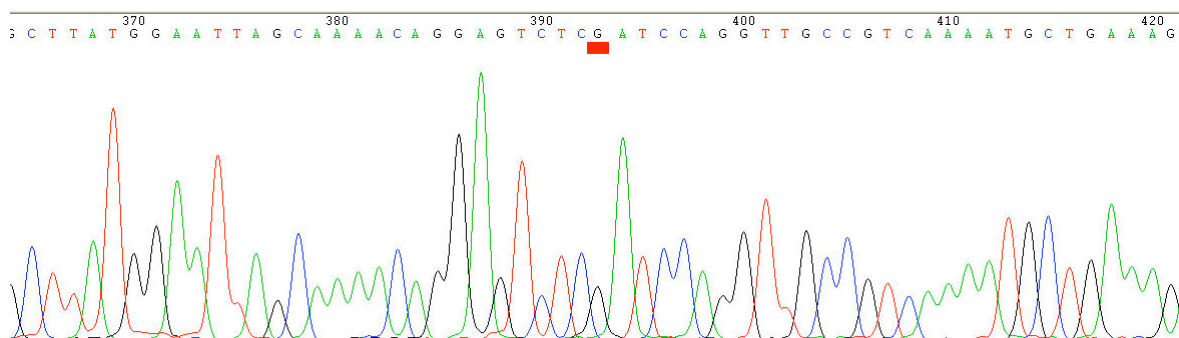


Abb. 3.13 Patient B - FLT3 exon 12 Sequenz in 5'- 3' Orientierung. In Rot die Punktmutation mit Basenaustausch

Patient G weist eine Punktmutation in Exon 11 auf, die durch Basenaustausch zu einer Veränderung in der AS-Sequenz führt, sowie eine stumme Mutation in Exon 12, die nicht in einem AS-Austausch resultiert.

|                     |                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wildtyp AS          | Q F R Y E S Q L Q M V M V <b>T</b> G S S D N E Y F Y V D F R E Y E Y D L K W E F P R E N L E F                                                                                                                      |
| Wildtyp Sequenz 5'- | <u>CAA TTT AGG TAT GAA AGC CAG CTA CAG ATG GTA CAG GTG ACC GGC TCC TCA GAT AAT</u><br><u>GAG TAC TTC TAC GTT GAT TTC AGA GAA TAT GAA TAT GAT CTC AAA TGG GAG TTT CCA</u><br><u>AGA GAA AAT TTA GAG TTT - 3'</u>     |
| Sequenz Pat. G      | 5'- <u>CAA TTT AGG TAT GAA AGC CAG CTA CAG ATG GTA CAG GTG TCC GGC TCC TCA GAT AAT</u><br><u>GAG TAC TTC TAC GTT GAT TTC AGA GAA TAT GAA TAT GAT CTC AAA TGG GAG TTT CCA</u><br><u>AGA GAA AAT TTA GAG TTT - 3'</u> |
| Patienten AS        | Q F R Y E S Q L Q M V M V <b>S</b> G S S D N E Y F Y V D F R E Y E Y D L K W E F P R E N L E F                                                                                                                      |

Abb. 3.14 Patient G - FLT3 / exon 11, Wildtyp- und Patientensequenz im Leserraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code.  
In Rot, die Punktmutation mit Basenaustausch. In Blau, der verwendete Forward Primer

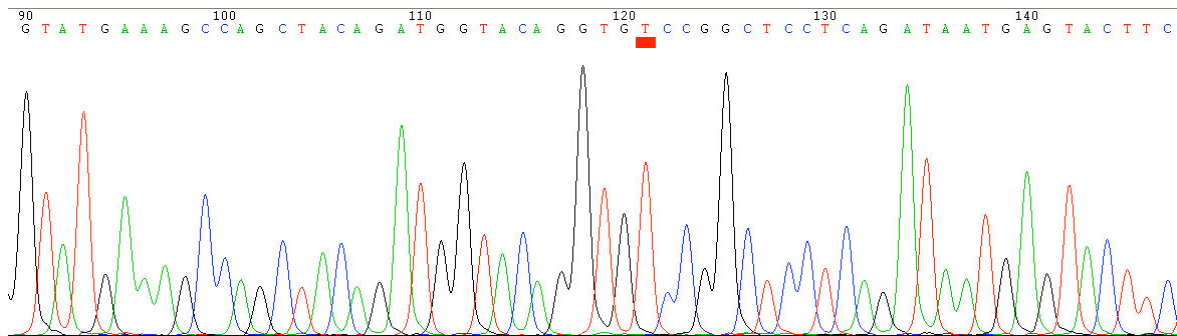


Abb. 3.15 Patient G - FLT3 exon 11 Sequenz in 5'-3' Orientierung. In Rot die Punktmutation mit Basenaustausch

|                     |                                                                                                                                                       |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wildtyp AS          | G K V L G S G A F G K V M N A T A Y G I S K T G V S I Q V A V K M L K                                                                                 |
| Wildtyp Sequenz 5'- | GGG AAG GTA CTA GGA TCA GGT GCT TTT GGA AAA GTG ATG AAC GCA ACA GCT TAT GGA<br>ATT AGC AAA ACA GGA GTC TCA ATC CAG GTT GCC GTC AAA ATG CTG AAA G - 3' |
| Sequenz Pat. G 5'-  | GGG AAG GTA CTA GGA TCA GGT GCT TTT GGA AAA GTG ATG AAC GCA ACA GCT TAT GGA<br>ATT AGC AAA ACG GGA GTC TCA ATC CAG GTT GCC GTC AAA ATG CTG AAA G - 3' |
| Patienten AS        | G K V L G S G A F G K V M N A T A Y G I S K T G V S I Q V A V K M L K                                                                                 |

Abb. 3.16 Patient G - FLT3 / exon 12, Wildtyp- und Patientensequenz im Leserraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one - letter code. In Rot, die Punktmutation mit Basenaustausch.

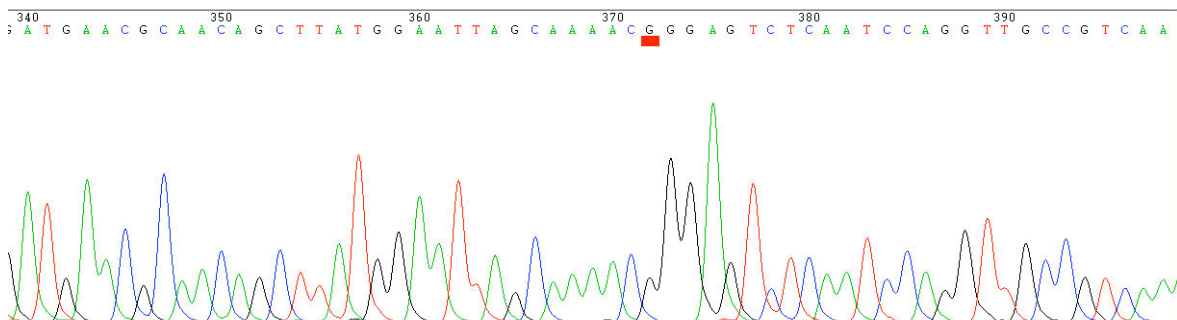


Abb. 3.17 Patient G - FLT3 exon 12 Sequenz in 5'-3' Orientierung. In Rot die Punktmutation mit Basenaustausch

Die restlichen Patientensequenzen wiesen keine Mutationen auf und sind dem Anhang beigelegt.

## **IV. Diskussion**

### **IV.1 Hintergrund und Aufgabenstellung**

Ziel dieser Arbeit war es, eine Nachweismethode für NPM1- und FLT3-ITD-Mutationen bei AML-Patienten für die Routinediagnostik zu etablieren. Die Relevanz dieser Erkrankung und die Bedeutung der Mutationen in diesem Zusammenhang werden im Folgenden erläutert.

Die akute myeloische Leukämie (**AML**) tritt in Deutschland bis zum 40. Lebensjahr mit einer Inzidenz von etwa 1/100.000 und nach dem 70. Lebensjahr von etwa 10/100.000 pro Jahr auf (in den USA 1,8/100.000 <65 Lebensjahre und 17/100.000 >65 Lebensjahre) und es zeigt sich ein leichter Anstieg der Inzidenz in den letzten 10 Jahren lediglich für die höheren Altersgruppen. Die alterskorrigierte Inzidenz zeigt ein signifikant höheres Auftreten bei Männern in den meisten Ländern der Erde.

Die AML ist mit 25% die häufigste und die am häufigsten tödlich verlaufende Form aller Leukämien im Erwachsenenalter und die führende Ursache für Tod durch Krebserkrankung bei Patienten <39 Lebensjahren.

### **Ätiologie**

Die Entstehung einer sekundären AML ist assoziiert mit einigen Risikofaktoren wie genetischen Veränderungen (Fanconi-Anämie, Down-Syndrom, Klinefelter-Syndrom, Li-Fraumeni-Syndrom, Neurofibromatose) und mit Exposition gegenüber chemischen und physikalischen Noxen (Pestizide, Herbizide, Benzol, therapeutische und nicht-therapeutische Röntgenstrahlung). Die Anzahl der AML - Fälle, die auf diese Risikofaktoren als alleinige Ursache zurückzuführen ist, fällt allerdings gering aus.

Myelodysplastische und myeloproliferative Erkrankungen sind besonders im höheren Lebensalter häufige Ursachen für das Entstehen einer sekundären AML und der Grund für den signifikanten Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Alter, da die de-novo-AML konstant etwa 5% der AML-Fälle in allen Altersgruppe ausmacht.

Chemotherapie einer malignen Erkrankung mit alkylierenden Substanzen, Anthracyclinen, Topoisomerase II-Inhibitoren und Taxanen findet sich bei 10% -

20% aller AML-Patienten in der Vorgeschichte. Diese Patienten bilden eine eigene Gruppe innerhalb der WHO-Klassifikation. Der Gipfel dieser so genannten behandlungsassoziierten AML liegt etwa 5-10 Jahre nach Chemotherapie und es finden sich charakteristische zytogenetische Muster. So sind Zytostatika mit bestimmten zytogenetischen Veränderungen assoziiert und lassen Rückschlüsse auf die Entstehung der AML zu.

Erworbene chromosomale Alterationen finden sich in 50%-80% aller AML-Fälle, mit einer höheren Inzidenz bei Patienten höheren Alters oder sekundärer Leukämie. Zu den häufigsten zählen Verlust oder Deletion der Chromosomen 5, 7, 9 und Y, Translokationen wie t (8;21)(q22;22), t (15;17)(q22;q11), Trisomie 8 und 21.

Mehrere Studien haben die prognostische Relevanz zytogenetischer Veränderungen gezeigt, die zurzeit als der entscheidende Prädiktor für das kurz- und langfristige Outcome gelten.

### **Pathogenese**

Generell akzeptiert ist zur Zeit das Modell der 2-hit-Hypothese, die für die Determinierung des AML-Phänotyps ein Zusammenwirken von aktivierenden Mutationen in Signaltransduktionskaskaden der Zellproliferation („Klasse-1 Mutationen“) sowie Neuankordnungen in Genen der hämatopoietischen Transkriptionsfaktoren („Klasse-2 Mutationen“) nahe legt. Klasse-1 Mutationen begünstigen das Überleben hämatopoietischer Progenitorzellen, haben jedoch keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung. Beispiele für Klasse-1 Mutationen sind aktivierende Mutationen im FLT3-, N-RAS- oder K-RAS-Gen. Zu Klasse-2 Mutationen gehören AML1/ETO-, CBF $\beta$ /SMMHC-, PML/RAR $\alpha$ - und MLL-Fusionsgene, die vermutlich hämatopoietische Differenzierung verhindern, für sich genommen allerdings nicht in der Lage sind, eine Leukämie zu verursachen.

### **Diagnostik**

Bestehen klinische und laborchemische Hinweise auf das Vorliegen einer Leukämie, sollte eine Knochenmarksaspiration durchgeführt werden. Bei punctio sicca ist alternativ eine Knochenmarksstanzbiopsie möglich.

Aufgrund der in den letzten Jahren hinzugewonnenen Informationen ist bei akuter Leukämie ein sehr breites Spektrum der Diagnostik notwendig geworden, um eine

möglichst exakte Diagnose zu stellen, eine fundierte Aussage zur Prognose des Patienten zu geben und Grundlagen für das spätere Monitoring einer minimalen Resterkrankung (MRD) zu schaffen.

An erster Stelle stehen Zytomorphologie und Zytochemie. Sie erlauben eine rasche Einteilung der Leukämie in akut versus chronisch und myeloisch versus lymphatisch, sowie die Auswahl des geeigneten Antikörper-Panel für die Multiparameter-Durchflusszytometrie (MFC) und die Wahl der adäquaten Zytokine bei der Metaphase-Kultivierung in der FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) - Diagnostik. Zur Bestätigung der Diagnose sowie um die Leukämie einem zellulären Differenzierungsstadium zuordnen zu können, wird eine FACS („fluorescence-activated cell sorting“) -Analyse durchgeführt. Finden sich in der Zytomorphologie Anzeichen einer charakteristischen chromosomalen Anomalie, sollten FISH- und PCR-Analyse mit spezifischen Primern für die in Frage kommenden Anomalien folgen.

Von Haferlach et al. ist 2007 ein Algorithmus zur Diagnose der AML vorgestellt worden, welcher ein routinemäßiges PCR-Screening auf FLT3-ITD-, NPM1-Mutationen und MLL-PTD empfiehlt, ebenso wird dies in einem Diagnoseschema von Renneville et al. vorgeschlagen (Siehe hierzu auch IV.3.3 weitere prognoserelevante Marker).

Um im weiteren Verlauf der Behandlung ein genaues MRD-Monitoring zu ermöglichen, sollte bei Diagnosestellung bei allen Patienten mit akuter Leukämie eine MFC zur Bestimmung des Leukämie-assoziierten Immunphänotyps (LAIP) Ausgangswertes durchgeführt werden, zusätzlich Real-time-PCR bei Patienten mit reziproken Translokationen, FLT3-ITD, NPM1-Mutation oder MLL-PTD (Siehe hierzu auch IV.4 Ausblick - MRD).

### **Klassifikation**

Aufgrund der neuen Erkenntnisse zur Genese und Molekularbiologie der AML entstand 2000 die aktuell gültige WHO-Klassifikation, welche die FAB-Klassifikation von 1976 (revidiert 1985) ablöste.

Tabelle 4.1 WHO - Klassifikation der AML von 2000

|      |                                                        |
|------|--------------------------------------------------------|
| I.   | AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Abnormalitäten |
| II.  | AML mit Dysplasie mehrerer Zellreihen                  |
| III. | Therapieassoziierte AML                                |
| IV.  | AML ohne weitere Kategorie                             |
|      | Minimal differenzierte AML                             |
|      | AML ohne Reifung                                       |
|      | AML mit Reifung                                        |
|      | Akute myelomonozytäre Leukämie                         |
|      | Akute erythroide Leukämie                              |
|      | Akute megakaryozytäre Leukämie                         |
|      | Akute basophile Leukämie                               |
|      | Akute Panmyelose mit Myelofibrose                      |

Während die FAB-Klassifikation auf Zytomorphologie und zytochemischen Kriterien basiert, kommen bei der WHO-Klassifikation Immunphänotypisierung, Molekulargenetik und klinische Kriterien hinzu. Verändert wurde außerdem der für die Diagnose einer AML notwendige Blastenanteil im Knochenmark von 30% auf 20% und die früher den MDS zugerechnete RAEBT (Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation) wurde eingegliedert.

Die alte Einteilung der FAB-Klassifikation findet sich nahezu unverändert in der Gruppe IV der WHO-Klassifikation wieder.

### Prognose

Bleibt eine AML unbehandelt, so ist die Prognose immer infaust. Die mittlere Überlebenszeit unter supportiver Therapie liegt bei etwa 11-20 Wochen und fällt mit steigendem Alter. Patienten versterben meist aufgrund von Komplikationen wie Infektion oder Blutung, bedingt durch Untergang des Knochenmarkes.

Patienten höheren Lebensalters haben eine geringere Wahrscheinlichkeit, in klinische Studien eingeschlossen zu werden, die Induktionstherapie zu tolerieren und Remission zu erreichen. Bei Patienten >60 Lebensjahre erreichen lediglich 30% - 50% eine CR im Rahmen der Standard-Induktionstherapie. Während die Überlebensrate bei Patienten < 55 Jahre in den letzten 20 Jahren deutlich gestiegen ist, blieb sie bei Patienten > 55 Jahre konstant. Fortgeschrittenes Lebensalter war in einigen Analysen unabhängiger Risikofaktor für das Verfehlen einer CR, niedrige CRD und schlechteres OS. Allerdings gab es keine zytogenetischen Daten für diese Patienten, so dass unklar ist, ob die schlechtere

Prognose nicht tatsächlich auf ein häufigeres Auftreten der ungünstigen Mutationen im Alter zurückzuführen ist (Stone et al. 1995, Stasi et al. 1996).

Auch ein häufiger vorliegender schlechter Allgemeinzustand, der sich als unabhängiger Risikofaktor für Frühmortalität, Therapieresistenz und niedriges OS herausgestellt hat, dürfte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen (Estey et al. 1989, Zittoun et al. 1989, Johnson et al. 1993). Trotzdem hat sich ein Lebensalter > 60 Jahre als Grenzwert für eine schlechte Prognose etabliert.

Einigkeit besteht über den Karyotyp als entscheidenden prognostischen Faktor. Die Bedeutung zytogenetischer Anomalien ist seit den 70er Jahren bekannt und es lassen sich heute mehrere Subgruppen voneinander abgrenzen, deren Prognose sich signifikant unterscheidet.

**Tabelle 4.2 Relative Häufigkeit zytogenetischer Aberrationen bei Diagnosestellung der AML. Nach Buske et al. 2007**

| Karyotyp            | Häufigkeit [%] | Prognose    |
|---------------------|----------------|-------------|
| t(8;21)             | 4,6            | gut         |
| t(15;17)            | 4,5            | gut         |
| inv(16)/t(16;16)    | 4,3            | gut         |
| t(11q23)            | 2,0            | ungünstig   |
| Trisomie 8          | 3,0            | intermediär |
| Monosomie 7         | 1,2            | ungünstig   |
| Inv(3)/t(3;3)       | 1,5            | schlecht    |
| 5q-                 | 0,9            | ungünstig   |
| Komplex aberrant    | 14,7           | schlecht    |
| Normaler Karyotyp   | 47,6           | heterogen   |
| Andere Aberrationen | 15,7           |             |

Die Prognose der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL) / RAR $\alpha$  mit t(15;17) (q22;q12)-Translokation hat nach der Einführung der all-trans Retinolsäure (ATRA) – Therapie eine ausgesprochen gute Prognose. Sie ist noch die einzige, spezifisch behandelbare akute Leukämie und hatte bis zur Einführung der spezifischen Therapie eine sehr schlechte Prognose mit hoher Frühsterblichkeit.

Für die Gruppe von Patienten mit normalem Karyotyp wird eine intermediäre Prognose ausgesprochen. Betrachtet man jedoch einzelne Fälle des annähernd die Hälfte aller Patienten umfassenden Kollektivs, so wird eine ausgeprägte Heterogenität deutlich. Die individuelle Prognose hängt entscheidend vom Muster

der FLT3- und NPM1-Mutationen ab und eine Differenzierung hiernach lässt eine Unterteilung in Untergruppen mit unterschiedlicher Prognose zu.

**Tabelle 4.3 Kombiniertes Einfluss von FLT3-ITD- und NPM1-Mutationen auf die Prognose.**  
Nach Heilmeier et al. 2007

|                                                                        | <b>NPM Mutation</b><br>(50% der Fälle*)                                             | <b>NPM Wildtyp</b><br>(50% der Fälle*)                                              |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FLT3-ITD</b><br>(30% der Fälle*)                                    | <i>Intermediäre Prognose</i><br>20% der Fälle*<br>CR ca. 70%<br>3-Jahres OS ca. 30% | <i>schlechte Prognose</i><br>10% der Fälle*<br>CR ca. 55%<br>3-Jahres OS ca. 10-15% |
| <b>FLT3 Wildtyp</b><br>(70% der Fälle*)                                | <i>Gute Prognose</i><br>30% der Fälle*<br>CR ca. 77%<br>3-Jahres OS ca. 60%         | <i>Intermediäre Prognose</i><br>40% der Fälle*<br>CR ca. 55%<br>3-Jahres OS ca. 25% |
| * = bezogen auf die Gesamtheit der AML Patienten mit normalem Karyotyp |                                                                                     |                                                                                     |

Patienten, die Träger einer FLT3-ITD-Mutation sind und zusätzlich das gesunde Wildtyp-Allel verlieren („loss of heterozygosity“), weisen eine besonders schlechte Prognose auf (Kottaridis et al. 2001, Whitman et al. 2001).

Lange Zeit galt die sekundäre Genese einer AML aus vorhergehender Radio- oder Chemotherapie oder aus vorbestehendem MDS als starker prognostischer Faktor für das Erreichen einer CR. Mit zunehmendem Verständnis der Bedeutung zytogenetischer Veränderungen zeigte sich in multivariaten Analysen mit definierten zytogenetischen Gruppen jedoch, dass kein Unterschied im Überleben von de-novo AML-Patienten und solchen mit sekundärer AML besteht (Arthur et al. 1989, Samdani et al. 1996).

Verlässliche prognostische Aussagen zum Gesamtüberleben und zur CR-Rate scheinen aufgrund der Knochenmarksuntersuchung 7 Tage nach Ende des ersten Induktionszyklus („Tag-16-Blasten“) möglich (Kern et al. 2003).

Erleiden Patienten ein Rezidiv, so ist die Überlebensprognose abhängig vom Karyotyp, der den einzigen unabhängigen Faktor darstellt. Die Wahrscheinlichkeit, eine erneute CR zu erreichen, korreliert mit der Dauer der ersten Remission. Sechs Monate erwiesen sich als der entscheidende Grenzwert (Kern et al. 2000, Hiddemann et al. 1990, Thomas et al. 1999).

### Therapieschemata

Das Therapieschema besteht grundsätzlich aus einer Induktionstherapie mit dem Ziel der kompletten Remission, anschließend Konsolidierung der CR und folgender Erhaltungstherapie.

Seit etwa 30 Jahren bildet Cytarabin (=AraC) in Kombination mit einem Anthracyclin die Grundlage der Induktionstherapie, die seit den 80er Jahren meist als Doppelinduktion erfolgt. Zwar ist die Dauer der Zytopenie bei Doppelinduktion von 4-8 Wochen auf in der Regel 8 Wochen und mehr verlängert, es lässt sich jedoch ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben erreichen (Buchner et al. 1991).

Die Versuche, die vulnerable Phase der Zytopenie durch Granulozyten-koloniestimulierenden Faktor (G-CSF) oder Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) zu verkürzen, konnten in keiner randomisierten Studie einen signifikanten Effekt auf das Gesamtüberleben erreichen, obgleich sich die Dauer der Zytopenie um einige Tage verkürzen ließ (Bradstock et al. 2001, Harrousseau et al. 2000).

Die Therapie einer AML sollte nach Möglichkeit stets im Rahmen einer kontrollierten Studie erfolgen. Ist dies nicht möglich, stehen für die Induktion einige etablierte Protokolle zur Verfügung.

**Tabelle 4.4 Etablierte Induktionsprotokolle der AML**

| Protokoll | Cytarabin                                                                                          | Anthracyclin                                                       | Erweiterung                                                  |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| TAD-9     | Dauerinfusion 100 mg/m <sup>2</sup> über 2 Tage dann 100 mg/m <sup>2</sup> 2 x täglich über 6 Tage | Daunorubicin 45-60 mg/m <sup>2</sup> als Kurzinfusion über 3 Tagen | Thioguanin 100 mg/m <sup>2</sup> 2x täglich oral über 7 Tage |
| 7 +3      | 7 Tage 100 mg/m <sup>2</sup> als Dauerinfusion                                                     | Daunorubicin 45-60 mg/m <sup>2</sup> als Kurzinfusion über 3 Tagen |                                                              |
| HAM       | 2x täglich 3 g/m <sup>2</sup> über 3 Tage                                                          | Mitoxantron 10 mg/m <sup>2</sup> 2x täglich über 3 Tage            |                                                              |

Randomisierte Studien konnten keine höhere CR-Rate für das Cytarabin-Hochdosis Schema HAM gegenüber den Standardprotokollen zeigen, allerdings finden sich positive Effekte beim Langzeitüberleben (Braess et al. 2005, Buchner et al. 2006).

Zur Aufrechterhaltung der CR erfolgt eine Postremissionstherapie, da sich gezeigt hat, dass die Beendigung der Therapie mit Erreichen der Remission zwangsläufig zu einem Rezidiv führt. Konventionelle Chemotherapie zur Konsolidierung beginnt

ca. 4-6 Wochen im Anschluss an die Regeneration nach Induktionstherapie. Es kommen verschiedene Protokolle zur Anwendung, unter anderem das auch zur Induktion genutzte TAD-9-Regime. Im Anschluss erfolgt eine Erhaltungstherapie über bis zu 2 Jahre.

Alternativ zur konventionellen Chemotherapie kann eine autologe oder allogene Stammzelltransplantation erfolgen. Auf dieses komplexe Thema kann in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden. Erwähnenswert ist, dass sich in einer Studie über den Einfluss von NPM1-, FLT3-, C/EBP $\alpha$ -, MLL- und NRAS-Mutationen lediglich für Patienten mit FLT3-ITD- Mutation und NPM1 Wildtyp ein starker positiver Effekt durch allogene Stammzelltransplantation zeigte (Schlenk et al. 2006). Somit ist auch für die Auswahl der für Stammzelltransplantation in Frage kommenden Patienten eine Relevanz der FLT3- und NPM1-Mutationen gegeben. Ob jedoch das Vorhandensein einer FLT3-ITD- Mutation tatsächlich eine Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation ist, falls ein geeigneter Spender zur Verfügung steht, wird von anderen Arbeitsgruppen hinterfragt (Gale et al. 2005).

## **FLT3-Gen**

### **Eigenschaften und Funktion**

Das FMS-like tyrosine kinase 3 Rezeptor (FLT3) oder Fetal Liver Kinase 2 (flk2) - Gen liegt im Chromosom 13q12, besteht aus 24 Exons und kodiert ein membrangebundenes Protein der Klasse-III-Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie. Es besteht eine große strukturelle Ähnlichkeit zum Stammzellfaktorrezeptor c-kit.

FLT3 wird vornehmlich auf hämatopoietischen Progenitorzellen im Knochenmark, Thymus und in Lymphknoten exprimiert und die Expression geht im Verlauf der Zelldifferenzierung verloren. Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden FL, der von Knochenmarkstromazellen produziert wird, reguliert über Dimerisation, Autophosphorylierung und Phosphorylierung zytoplasmatischer Substrate die Proliferation, Differenzierung und Apoptose unreifer hämatopoietischer Zellen.

### **Rezeptortyrosinkinasen**

FLT3 gehört zur Untergruppe der transmembranären Rezeptortyrosinkinasen (RTK) Klasse III, die charakterisiert ist durch eine extrazelluläre, Ligand-bindende Region aus fünf Immunglobulin-Domänen, einer transmembranären (TM) und

einer juxtamembranen (JM) Domäne sowie einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (TK).

Bindung eines spezifischen Liganden führt durch Autophosphorylierung zur Dimerisierung des Rezeptors, dies führt zur Aktivierung der intrazellulären Kinase, die über das Adapterproteine GRB-2 und SOS, RAS durch Binden von GTP aktiviert. Ist RAS membranär lokalisiert und in SOS-Anwesenheit an GTP gebunden, tritt wahrscheinlich eine Konformationsänderung ein, die eine Interaktion mit dem weiteren Signaltransduktionsweg ermöglicht. RAS aktiviert die MAP-Kinase-Kaskade, welche die DNA-Synthese und Proliferation induziert. Durch Interaktion mit cyclin-abhängigen Kinasen kann außerdem der Zellzyklus beeinflusst werden.

Irusta et al. beschrieben 1998 eine Punktmutation in der JM-Domäne einer Klasse -III-Rezeptortyrosinkinase. Eine einzelne substituierte AS führte hier zu einer konstitutiven Aktivierung des murinen PDGFR $\beta$ -Rezeptors. In folgenden Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe denselben Effekt am humanen PDGFR $\alpha$ , humanen CSF1-Rezeptor und humanen KIT-Rezeptor zeigen.

Weitere Gruppen, unter anderem Ma et al. und Chan et al., bestätigten in ihren Untersuchungen den Verlust der physiologischen, autoinhibitorischen Funktion der JM-Domäne durch Strukturveränderungen aufgrund eines AS-Austausches im Rahmen von Punktmutationen. Derselbe Mechanismus liegt der FLT3-Mutation zugrunde.

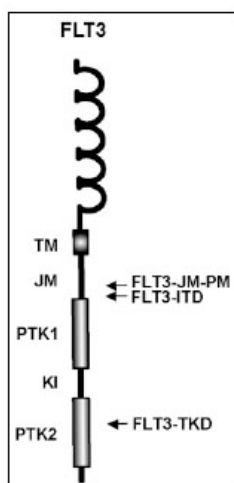


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der FLT3 Rezeptortyrosinkinase und der aktivierenden Mutationen. Transmembranäre Domäne (TM), Juxtamembranäre Domäne (JM), Phosphotyrosinkinase Domäne (PTK), Kinase Insertionsdomäne (KI)

Nach Reindl et al. 2006

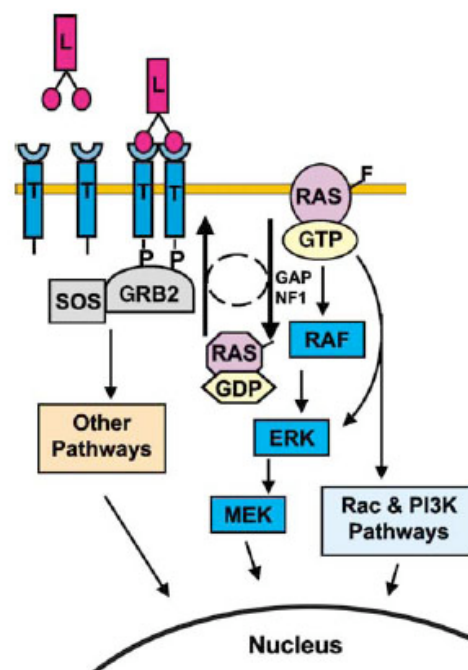


Abb. 4.2 Signaltransduktion einer Rezeptortyrosinkinase (T). Ligand (L), Farnesylrest (F), Zellmembran (gelb). Nach Stirewalt et al. 2003

## FLT3 Mutationen

Die „FLT3-ITD-Mutation, auch Length-Mutation (LM) bezeichnet, liegt in Exon 14, Intron 14 und Exon 15 (von einigen Autoren als Exon 11 und 12 bezeichnet) und findet sich bei 25% bis 30% der erwachsenen AML-Patienten aller FAB- Subtypen, jedoch vermehrt bei Patienten mit FAB M3 und M5 AML und wurde von Nakao et al. 1996 erstbeschrieben.

Der betroffene Bereich des FLT3-Gens kodiert für die juxtamembranäre Domäne des Proteins. Die Lokalisation und Länge (3-400bp) der Duplikation ist variabel, liegt jedoch immer im Leseraster. Die Mutation hat eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors zur Folge und führt bei hämatopoietischen Stammzellen zur Liganden-unabhängigen Proliferation mit ausbleibender Differenzierung.

In mehreren Studien zeigte sich eine signifikant schlechtere Prognose für FLT3-ITD-positive Patienten. So waren im Einzelnen das krankheitsfreie Überleben (event free survival, EFS) und das Langzeitüberleben (overall survival, OS) vermindert (Moreno et al. 2003, Kioyi et al. 1999, Stirewalt et al. 2003).

Die Länge der Duplikation könnte Einfluss auf die Schwere der Prognoseverschlechterung haben. Während eine Studie von Stirewalt et al. 2006

dies nahe legt, konnten Kusec et al. und Ponziani et al. 2006 diese Beobachtung nicht bestätigen. Hierzu wären Studien mit größeren Fallzahlen wünschenswert.

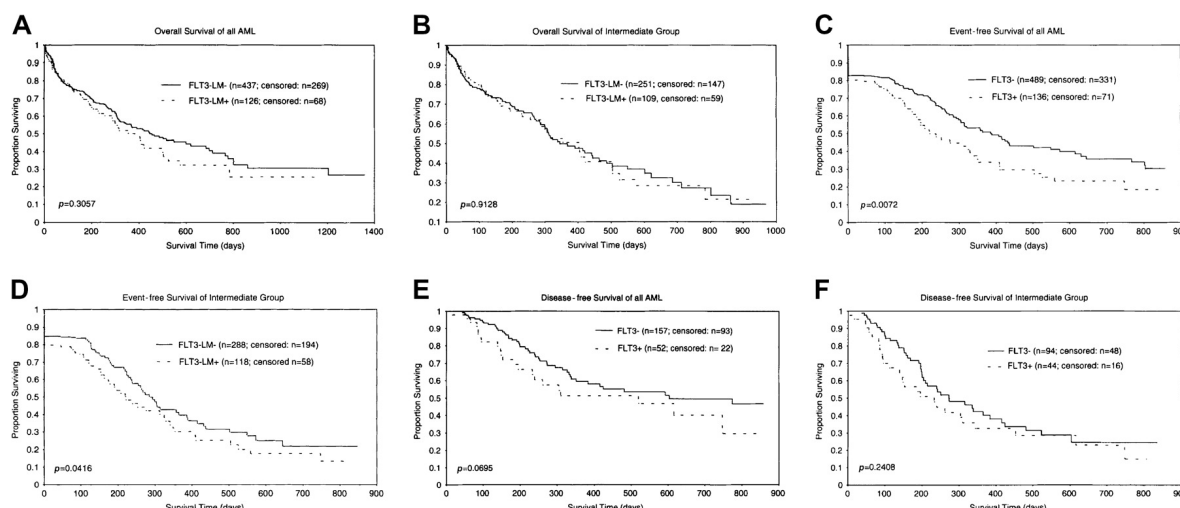


Abb. 4.3 Kaplan-Meier-Kurven für AML Patienten mit und ohne FLT3-length Mutation. Nach Schnittger et al. 2002

Yamamoto et al. beschrieben 2001 eine weitere Form der FLT3 Mutation, die sich bei 7% - 10% aller AML Patienten findet. Hier tritt eine Punktmutation in der Tyrosinkinase-Domäne (FLT3-TKD) auf, am häufigsten mit Beteiligung der Aspartamsäure an Position 835. Eine prognostische Relevanz konnte in Untersuchungen von Fröhling et al. 2002 und Thiede et al. 2002 nicht nachgewiesen werden.

In 2004 fanden Stirewalt et al. eine weitere aktivierende Mutation im FLT3-Gen in der Form von Punktmutationen im Bereich der juxtamembranären Domäne (FLT3-JM-PM), die zu einer erhöhten Rate von Spontandimerisationen, konstitutiver Autophosphorylisation und Zelltransformation führen. Es gibt jedoch noch keine Studien, die das Outcome von Patienten mit FLT3-JM-PM untersucht haben und es bleibt abzuwarten, ob diese Patienten ebenfalls eine schlechtere Prognose haben und ob in der Folge FLT3-JM-PM Einzug in das Routinescreening finden sollte.

Bei Patienten mit MDS findet sich in 3-5% der Fälle eine FLT3-ITD-Mutation und in einigen Fällen tritt die Mutation bei initial FLT3-ITD-negativen Patienten auf, wenn ein Progress des MDS in AML stattfindet (Shih et al. 2004).

Diese Beobachtung lässt sich mit der 2-hit-Hypothese zur Entstehung der AML vereinbaren. (Siehe hierzu IV.1 Pathogenese)

## NPM1-Gen

### Eigenschaften und Funktion

Nucleophosmin (NPM), auch bekannt als B23 oder Numatrin, ist ein etwa 37kDa großes nukleäres Phosphoprotein. Seine kodierende Region mit 12 Exons ist 25kbp lang und liegt auf Chromosom 5q35. NPM ist ein Nucleoplasmin aus der Familie der nukleären Chaperone. Es ist lokalisiert in Nucleoli, wechselt jedoch häufig zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma (Shuttling Aktivität). Dabei dient es dem Transport prä-ribosomaler Partikel, der Ribosombiosynthese, der Antwort auf Stress-Stimuli wie UV-Strahlung, der DNA-Reparatur und der Regulation der DNA-Transkription durch Modulation der Chromatinkondensation.

Weiterhin verhindert NPM die Aggregation von Proteinen im Zytoplasma, dient als Histon-Chaperon und ist in der Lage, Histone zusammenzusetzen.

Die Interaktion mit anderen Molekülen, wie Transkriptionsfaktoren, Histonen, DNA-Polymerase, NFκB, PIP3 erfolgt über die funktionellen Domänen, siehe Abb. 4.4

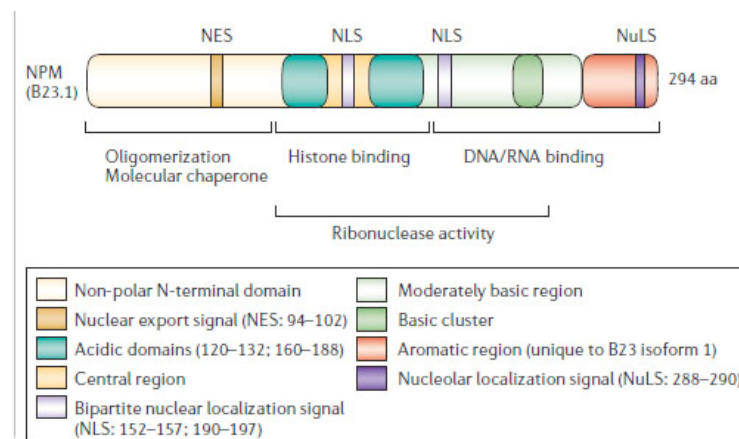


Abb. 4.4 NPM in der prevalentesten Spliceisoform B23.1 mit seinen funktionellen Domänen.  
Nach Grisendi et al. 2006

NPM1 werden Tumorsuppressoreigenschaften zugeschrieben. Es stabilisiert, vermutlich durch Schutz vor proteasomabhängigem und -unabhängigem Abbau, das Tumorsuppressorprotein ARF (P14 / alternate reading frame), welches wiederum durch die Hemmung von MDM2 mit dem wichtigen Tumorsuppressor p53 positiv interagiert und auch eigenständig Zellproliferation inhibiert. Zellen mit

fehlender NPM-Expression zeigten eine verminderte ARF-Stabilität und eine vermehrte Anfälligkeit für Transformation. Es wurde außerdem beobachtet, dass Zellen mit mangelnder NPM-Exprimierung eine geringere genomische Stabilität besitzen und in der Folge eine erhöhte Anfälligkeit für onkogene Transformation aufweisen. Als Ursache wird eine mehrfach beschriebene Interaktion von NPM mit Centromeren während der G1-Phase der Mitose vermutet, in der NPM die Duplikation verhindert.

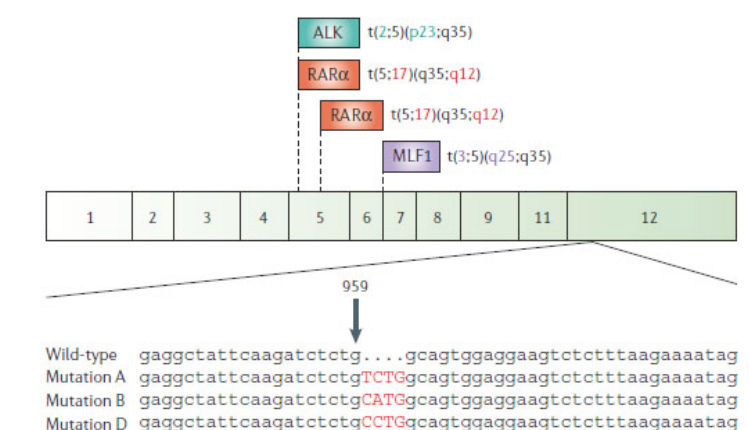


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der NPM1 Gentranslokationen, der Mutationen in Exon 12 sowie die drei häufigsten NPM1 Mutationen bei AML und die Wildtypsequenz.  
Nach Grisendi et al. 2006

Allerdings besitzt NPM auch Eigenschaften eines Proto-Onkogens. So findet sich bei vielen soliden Tumoren (Magen-, Colon-, Ovarial- und Prostata-Carzinom) eine Überexpression von NPM, die mit vermehrtem Zellwachstum, Proliferation sowie verminderter Differenzierung und Apoptose einhergeht. Es stellt das Transkriptionsziel des Proto-Onkogens MYC dar und spielt eine wichtige Rolle in der Ribosomenbiosynthese, welche für malignes Zellwachstum von großer Wichtigkeit ist.

### NPM1-Mutation

Heterozygote Mutationen im NPM-Gen unreifer Blasten sind für AML, bei Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML), mit einer Häufigkeit von 35% - 50% beschrieben und scheinen spezifisch für AML zu sein. Dabei finden sich für die erstmalig 2005 von Falini et al. beschriebenen Mutationen inzwischen 38 identifizierte Varianten, darunter drei Mutationen (A, B, D) die zusammen 90% aller NPM-Mutationen ausmachen. Eine Deletion der NPM-Gen tragenden Chromosomenregion (5q35) und eine Translokation, die in einem veränderten

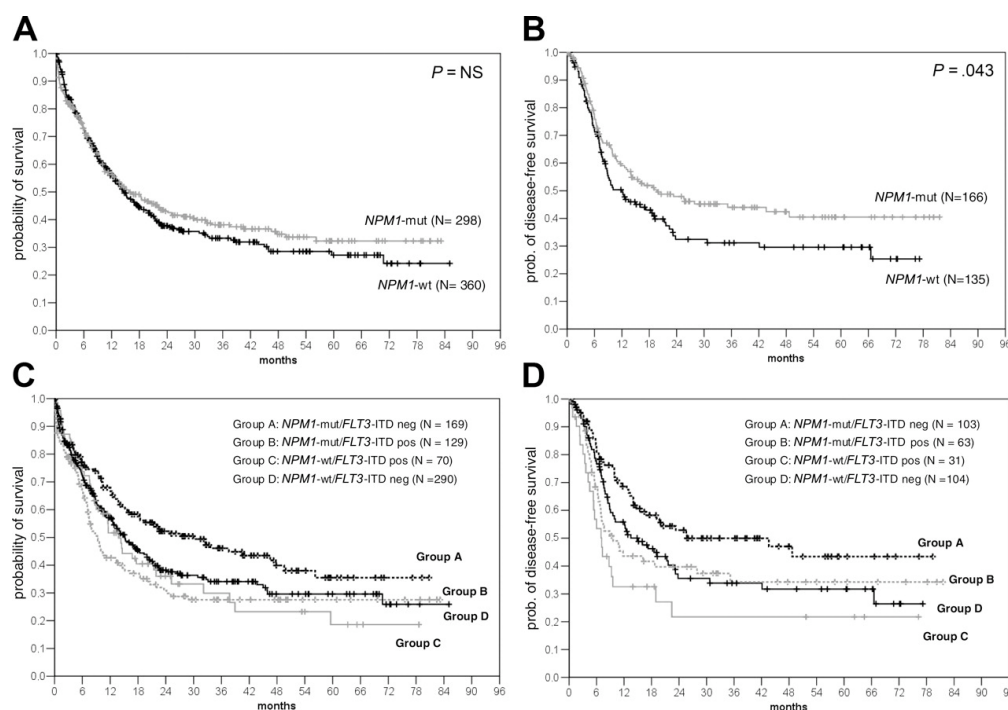


Abb. 4.6 Kaplan Meier Kurven für Patienten mit NPM1 und FLT3 Mutationen mit AML und normalem Karyotyp. Nach Thiede et al. 2006

Genprodukt resultiert (NPM-MLF1), sind assoziiert mit myelodysplastischem Syndrom. Weitere Translokationen mit verändertem NPM sind assoziiert mit großzelligen anaplastischen Lymphomen der T-/O-Zell-Reihe (NPM-ALK) und akuter Promyelozyten-Leukämie (NPM-RAR $\alpha$ ).

NPM1-Mutationen sind eng assoziiert mit NK-AML und finden sich bei allen FAB-Subtypen, mit Ausnahme von FAB M3 (akute Promyelozyten Leukämie). Die größte Häufigkeit findet sich bei FAB M4 und M5. Es zeigt sich außerdem eine Assoziation zu FLT3-ITD-Mutationen in etwa 40% der Fälle.

Die beschriebenen NPM1-Genmutationen liegen zwischen Position 956 und 971bp und sind entweder eine 4bp/8bp -Insertion oder 4bp/5bp-Deletion, kombiniert mit einer 9bp-Insertion oder eine 9bp Deletion, kombiniert mit einer 14bp -Insertion.

Es kommt außerdem bei allen Mutationen zum Verlust mindestens eines oder beider Tryptophanreste an Position 288 und 290, von denen angenommen wird, dass sie für die nukleäre Lokalisation eine wichtige Rolle spielen.

Diese Veränderungen führen zur Dyslokalisierung des mutierten NPM-Genproduktes außerhalb des Nukleus. Aufgrund seiner zytoplasmatischen Lokalisation

spricht man von NPMc+, welches mit Wildtyp NPM Heterodimere bildet und es dadurch ebenfalls im Zytoplasma binden kann. NPMc+ behält seine Fähigkeit, mit ARF zu interagieren, was zur Dyslokalisierung von ARF in das Zytoplasma führt und es an seiner physiologischen Funktion, wie z.B. Aktivierung von p53, hindert.

Bei Patienten mit NK-AML und NPM1-Mutation zeigte sich in mehreren Studien eine signifikant höhere Rate des Erreichens einer kompletten Remission im Vergleich zum Wildtyp NPM1. Die meisten Studien zeigten außerdem ein besseres EFS und OS. Die positive Prognose gilt allerdings nur für Patienten ohne eine gleichzeitige FLT-ITD-Mutation (Döhner et al. 2005, Schnittger et al. 2005). Der Nachweis beider Mutationen kann durch Amplifikation der Patienten-DNA mit spezifischen Primern, anschließender Sequenzierung und Alignment mit den Wildtypsequenzen erfolgen.

Ebenso möglich ist eine Kapillarelektrophorese. Hierfür wird die genomische DNA des Patienten mit fluoreszenzmarkierten Primern, spezifisch für FLT3 oder NPM1 amplifiziert. In der Kapillarelektrophorese zeigt sich der Wildtyp-Peak bei 291 (NPM1) oder 329 bp (FLT3), Mutationen weisen aufgrund der zusätzlichen Basenpaare einen höheren Peak auf. Noguera et al. veröffentlichten 2005 eine Methode, die einen simultanen Nachweis von NPM1- und FLT3-Mutationen durch Kapillarelektrophorese erlaubt. Die Sensitivität lag bei 100% und ein Nachweis war in Verdünnungsreihen bis zu einer Konzentration von 10% möglich.

Falini et al. stellten 2006 eine immunhistochemische Nachweismethode für NPM1-Mutationen vor. Der Nachweis einer zytoplasmatischen Lokalisation des Nucleophosmin korrelierte mit dem Vorhandensein von NPM1-Mutationen und scheint als Screeningmethode geeignet. Da FLT3 seine Lokalisation nicht aufgrund einer Mutation verändert, lassen sich FLT3-Mutationen auf diese Weise nicht nachweisen.

## **IV.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse**

Die geringe Fallzahl lässt keinen Vergleich der Frequenz der im Patientenkollektiv gefundenen Mutationen zur vorbeschriebenen Prävalenz zu. Mit zwei NPM1-Mutationen unter acht Patienten liegt sie im zu erwartenden Bereich. Auch der

Nachweis der beiden am häufigsten auftretenden Mutationen A und B nach Falini et al. erscheint nicht ungewöhnlich.

Die nachgewiesenen Punktmutationen im NPM1-Gen an Position bp959 und bp966 bei insgesamt drei Patienten sind bisher nicht in Untersuchungen erwähnt worden. Ihre Bedeutung ist somit nicht klar, es lässt sich nur vermuten, dass sie aufgrund ihrer Lokalisation im funktionell relevanten Tryptophanrest eine Auswirkung auf den Phänotyp haben. Fraglich ist, ob solche nicht vorbeschriebenen Punktmutationen als prognoserelevant angesehen und ob Konsequenzen aus ihrem Nachweis gezogen werden sollten.

Enttäuschend ist das Fehlen von FLT3-ITD-Mutationen im für diese Arbeit vorgesehenen Patientenkollektiv. Es fanden sich mit der Ausnahme einer stummen Mutation ausschließlich Wildtypsequenzen. Auf den Grundlagen dieser Arbeit aufbauend sollen zusätzliche Fälle im Rahmen weiterer Untersuchungen am Institut für Pathologie analysiert werden, da eine Erhöhung der Fallzahl den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte.

Es zeigte sich, dass sowohl die Direktsequenzierung als auch die Sequenzierung nach Klonierung und Amplifikation eine Auswertung ermöglichen. Vorteil der Direktsequenzierung ist eindeutig der geringere Arbeitsaufwand und - durch das Wegfallen der Inkubationszeiten - die schnellere Ergebnisfindung. Nachteilig ist die aufgrund von Heterozygotie erschwerte Auswertung der Sequenzen, die erhöhter Aufmerksamkeit bedarf.

Inzwischen sind neue Methoden zum Nachweis der NPM1- und FLT3- Mutationen beschrieben, die durch hohe Sensitivität und niedrigen Arbeitsaufwand als geeigneter erscheinen. Die Etablierung der konventionellen Nachweismethode durch einfaches Sequenzieren hat die Grundlage für den geplanten Umstieg auf neuere Methoden geschaffen.

### **IV.3 Ausblick**

#### **IV.3.1 Neue Nachweismethoden**

##### **HRMA**

Vaughn et al. etablierten den Nachweis von FLT3-ITD-Mutationen durch High-Resolution-Melting-Analysis (HRMA) bereits 2004. Vor kurzer Zeit stellten Tan et al. 2008 einen simultanen Nachweis von FLT3-ITD- und NPM1-Mutationen vor.

Für eine HRMA wird Patienten-DNA mit spezifischen Primern amplifiziert, im Anschluss ein ausschließlich doppelsträngige DNA bindender Farbstoff (SYBR Green oder LCGreen) hinzugegeben. In einem folgenden Zwischenschritt wird das Gemisch erhitzt und wieder abgekühlt, um die Formation von Heteroduplexen zu erreichen. Im Anschluss wird die DNA von 60 auf 90°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz gemessen, die durch Denaturierung der farbstoffbehafteten DNA entsteht. Vergleicht man Fluoreszenz / Temperatur - Kurven der Patienten mit denen des Wildtyps, so finden sich Abweichungen, wenn Heteroduplexe (also Mutationen) in der Patienten-DNA vorliegen.

Da die HRMA direkt im Anschluss an die PCR im selben Reaktionsansatz erfolgt, wird dieses Verfahren als „closed-tube/in-tube“ -Methode bezeichnet. Um die genaue Art der Mutation festzustellen, ist allerdings nach der Identifizierung eines Mutationsträgers weiterhin die Sequenzierung notwendig.

Vaughn et al. war es möglich, 100% der FLT3-ITD-Mutationen im Patientengut zu identifizieren, damit ist diese Methode ebenso sensitiv wie die Referenzmethoden Sequenzierung und Kapillarelektrophorese, mit denen die Ergebnisse bestätigt wurden. Es war außerdem möglich, einen Verlust des Wildtyp Allels (loss of heterozygosity) mit dieser Methode nachzuweisen.

Tan et al. entwickelten nun vor kurzer Zeit einen Ansatz, der für Patienten mit FLT3-ITD-Mutation oder NPM1-Mutation oder einer Kombination beider Mutationen eine vom Wildtyp abweichende Fluoreszenz /Temperatur - Kurve liefert. Welches der Gene mutiert ist, lässt sich nach dem Identifizieren der Patienten durch Sequenzierung darstellen. (Tan et al. 2008)

Mit dieser Methode ist ein schnelles und weniger aufwendiges Verfahren entwickelt worden, durch das innerhalb kurzer Zeit und mit wenigen

Arbeitsschritten die zu sequenzierenden Patienten identifiziert werden können. So lässt sich die Zahl der zu sequenzierenden Patienten auf die tatsächlichen Mutationsträger verringern.

Vaughn et al. wiesen jedoch darauf hin, dass in einer Verdünnungsreihe ITD-Allele nur bis zu einem Anteil von mindestens 20% der Gesamtmenge nachgewiesen werden konnten, während dieser Wert für die Kapillarelektrophorese mit 10% deutlich niedriger lag. Diese Beobachtung sollte in kommenden Studien untersucht und es sollten nach Möglichkeit sensitivere HRMA-Ansätze entwickelt werden, nicht zuletzt, um einen Einsatz als Methode des Minimal Residual Disease (MRD) -Monitoring möglich zu machen. (Vaughn et al. 2004)

Ein Ansatz, der von Bullinger et al. und Falk et al. 2004 beschrieben wurde, ist das Gene-expression-profiling mit DNA-Microarrays. Anhand der Expressions-signaturen ließen sich innerhalb der Gruppe von AML Patienten mit normalem Karyotyp Untergruppen mit charakteristischen Expressionsprofilen unterschiedlicher Prognose identifizieren. Radmacher et al. bestätigten 2006 diese Beobachtung.

### **IV.3.2 Weitere prognostische Faktoren**

Neben den inzwischen ausgiebig untersuchten FLT3- und NPM1-Mutationen gibt es weitere molekularbiologische Anomalien, deren prognostische Bedeutung teilweise nur unvollständig bekannt ist. Zusätzlich ist noch nicht ausreichend untersucht, welche Konsequenzen bestimmte Konstellationen dieser Veränderungen für AML-Patienten mit sich bringen. Für die Zukunft scheint es sinnvoll, nach Etablierung der HRMA einige dieser Marker in die diagnostische Routine mit aufzunehmen.

### **MLL-PTD**

Die partial tandem duplication des MLL („mixed lineage leukemia“ auch ALL-1 bezeichnet) -Gens war die erste molekulare Aberration bei AML mit prognostischer Signifikanz, die identifiziert wurde. Sie findet sich vor allem bei AML mit Trisomie 11 und etwa 5%-11% der NK-AML-Patienten, häufig in Coexpression mit FLT3-ITD, jedoch fast nie mit NPM1. Es besteht eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren EFS und ein Trend zu einem niedrigeren OS, der jedoch nicht

statistisch signifikant war (Caligiuri et al. 1998, Schnittger et al. 2000, Steudel et al. 2003).

Inwiefern Patienten mit FLT3- und MLL-PTD Koexpression eine schlechtere Prognose aufweisen als Patienten mit lediglich einer Mutation, ist bisher nicht in ausreichend großen Kohorten untersucht worden. Eine Untersuchung von Olesen et al. 2005 weist in diese Richtung.

Das **BAALC** („brain and acute leukemia, cytoplasmic“) -Gen kodiert ein Protein unbekannter Funktion. Eine hohe BAALC-Expression (definiert als höhere Expression als die mittlere Expression eines gesunden Kollektivs) wurde in Untergruppen von Patienten mit AML, ALL und CML nachgewiesen. Sie ist ein unabhängiger Vorhersageparameter eines verkürzten Gesamtüberlebens, einer Therapieresistenz und einer ungünstigen 5-Jahres-Rezidiv-Quote. Anhand der BAALC mRNA-Expression kombiniert mit dem Nachweis von FLT3-ITD-Mutationen ließen sich in einer Studie von Baldus et al. 2006 insgesamt vier Subgruppen von NK-AML-Patienten mit unterschiedler Prognose diskriminieren. (Baldus et al. 2006)

Das „ETS-related Gene“ (**ERG**) ist ein Effektor der mitogenen Signaltransduktion und ist beteiligt an der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Gewebeumbau (Seth et al. 2005).

Marcucci et al. untersuchten 2005 die prognostische Konsequenz der ERG - Expression bei AML-Patienten mit normalem Karyotyp. Es zeigte sich in dieser Studie, dass höhere Expression von ERG mit einem signifikant schlechteren OS und einer höheren Rezidivrate assoziiert war, außerdem fand sich eine Assoziation zur BAALC-Expression. Die verringerte Überlebensdauer galt lediglich für Patienten mit niedrigen BAALC-Expressionsraten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass höhere Expression von ERG auch bei Patienten mit FLT3-ITD-Mutation ein unabhängiger prognostischer Faktor für niedrigeres OS und EFS ist. Eine unabhängige Bestätigung steht noch aus.

Das CCAAT/enhancer bindende Protein  $\alpha$  (**C/EBP $\alpha$** ) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der Myelopoese beteiligt ist. So wird unter anderem über Regulation der c-myc-Expression die Differenzierung der Zellen ermöglicht. Eine

Mutation dieses Gens hat den Verlust der Differenzierungsfähigkeit zur Folge und findet sich bei etwa 15% - 19% aller NK-AML -Patienten. Sie ist assoziiert mit dem positiven Effekt einer längeren Remissionsdauer sowie höherem OS und stellt damit neben NPM1 den einzigen molekularen Marker mit positiver Prognose dar. Die Auswirkungen einer Koexpression mit FLT3-ITD-Mutation sind noch unklar. (Pabst et al. 2001, Preudhomme et al. 2002, Bienz et al. 2005).

Das **c-kit** Proto-Onkogen kodiert ein transmembranäres Glykoprotein der Klasse III RTK, dessen Ligand SCF (stem cell factor) ist. Es ist Teil einer Signaltransduktion, beteiligt an der Proliferation, Differenzierung, Migration und am Überleben hämatopoietischer Stammzellen. Ligandenunabhängige Aktivierung wird durch verschiedene Mutationen verursacht, die bei AML und anderen malignen Erkrankungen (GIST, Mastzellerkrankungen) nachgewiesen wurden. Für AML wird eine Häufigkeit von 2% - 8% angegeben. Die Mutationen treten in der extrazellulären Domäne, der JMD oder TKD auf. Allerdings ist die prognostische Konsequenz nicht so eindeutig wie bei FLT3- und NPM1-Mutationen. Ein negativer Einfluss auf CRD und OS zeigte sich vor allem bei Patienten mit t(8;21), bei denen die Mutation in 12% und 16% der Fälle nachgewiesen wurde. Interessant erscheint der Nachweis der c-kit-Mutationen im Rahmen einer gezielten Therapie durch Tyrosinkinaseinhibitoren (Lennartsson et al. 2005, Beghini et al. 2000 und 2004, Care et al. 2003) (Siehe hierzu auch IV.3.4 Targeted Therapy).

**JAK2** ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die in der Signaltransduktionskaskade der IL-3-Rezeptorfamilie, der Gp130-Rezeptorfamilie, des EPO- und TPO-Rezeptor und der Klasse 2-Zytokinrezeptorfamilie (Interferone, IL-10) vorkommt. Eine Mutation von JAK2 (JAKV617F) wurde bei Polycythaemia Vera in über 90%, bei essentieller Thrombozythämie und Myelofibrose mit myeloischer Metaplasie in etwa 50% und bei 70% der Patienten mit AML nach myeloproliferativer Erkrankung nachgewiesen, allerdings lediglich 1,7% bei de-novo-AML. Die Mutation hat einen Austausch von Valin zu Phenylalanin in der Pseudokinasedomäne JH2 zur Folge, diese Domäne inhibiert physiologischerweise die Kinasedomäne JH1. Für das mutierte Enzym konnte eine erhöhte Aktivität mit Hyperaktivierung der folgenden Kaskade festgestellt werden. Weitere JAK2-Mutationen sind in einzelnen Studien beschrieben.

Die genaue Prävalenz und klinische Relevanz der JAK2-Mutationen für die AML ist jedoch noch nicht in ausreichender Fallzahl untersucht worden (Levine et al. 2005, Fröhling et al. 2006, Steensma et al. 2006).

Das Wilms-Tumor-1-Gen (**WT1**) kodiert ein DNA bindendes Zinkfinger-Protein. Die genaue Rolle in der Hämatopoiese und der Beitrag zur Leukemogenese sind noch unklar. Es wird vermutet, dass WT1 Stammzellproliferation begünstigt und eine Differenzierungsblockade hämatopoietischer Zellen induziert. WT1-Expression erwies sich in Studien in mehreren malignen Erkrankungen, unter anderem der AML, als deutlich erhöht.

WT1-Mutationen wurden zuerst 1998 von King-Underwood et al. mit einer Häufigkeit von 10% - 15% beschrieben und vor kurzem in einer Studie mit NK-AML-Patienten bestätigt. Zusätzlich bestätigte diese Studie von Summers et al. 2007 die Assoziation der WT1-Mutation mit dem Vorliegen einer Therapieresistenz gegen das Standardinduktionsschema. Studien an größeren Kollektiven stehen noch aus.

Von Renneville et al. stammt ein 2008 vorgestellter Diagnosealgorithmus (ähnlich dem von Haferlach et al. 2007), der vorschlägt, welche molekularen Veränderungen mit prognostischer und in der Zukunft eventuell auch therapeutischer Relevanz in bestimmten Patientenkollektiven bestimmt werden sollten.

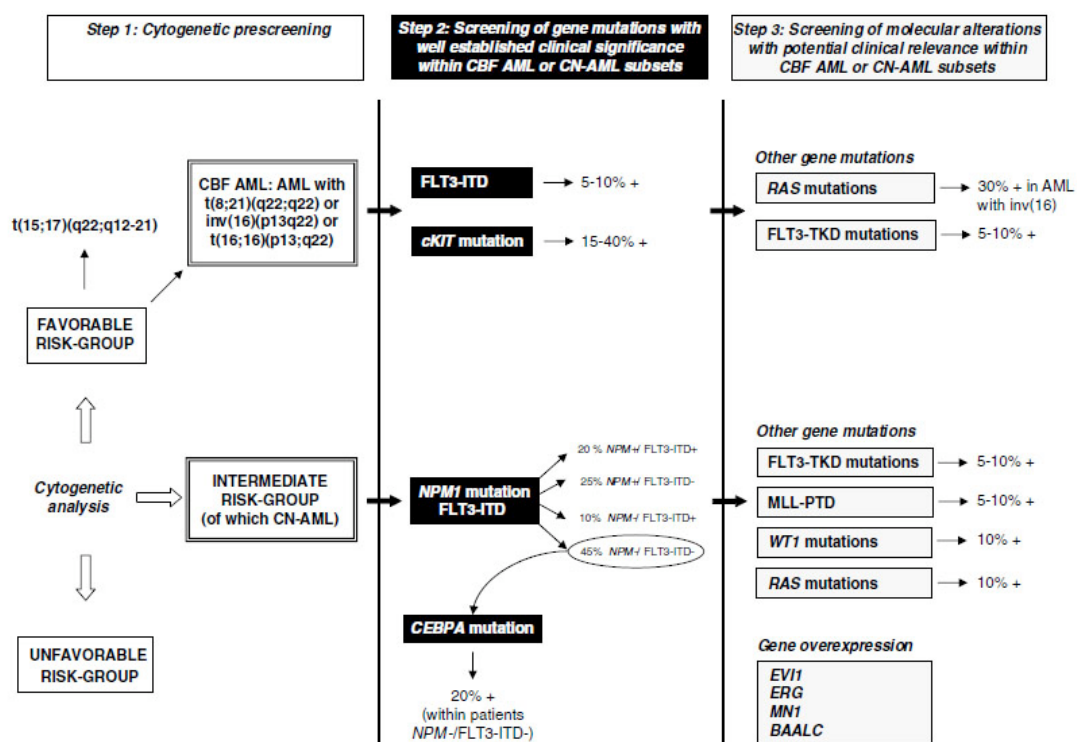


Abbildung 4.7: Durch Renneville et al. vorgeschlagenes Schema für molekulares Screening bei AML Patienten. Schritt 1: Karyotyp und FISH Analyse, daraufhin molekulare Analyse in Schritt 2: molekulares Screening auf etablierte prognostische Marker. Schritt 3: Screening auf potentiell prognoserelevante Marker.

CN-AML: AML mit normalem Karyotyp, CBF: core binding factor,

Sollte sich dieser standardisierte diagnostische Ablauf etablieren, so würden große Fallzahlen untersuchter Patienten entstehen und in prospektiven Untersuchungen ließe sich im weiteren Verlauf klären, welche Parameter für ein diagnostisches Routineverfahren geeignet und sinnvoll sind. Der von einigen Arbeitsgruppen geäußerten Forderung, den neuen Erkenntnissen Rechnung zu tragen und eine überarbeitete AML-Klassifikation mit Untergruppen nach molekularbiologischen Kriterien zu veröffentlichen, könnte mit hohen Fallzahlen Nachdruck verliehen werden.

### IV.3.3 Minimal Residual Disease

Neben der hinreichend dargelegten prognostischen Relevanz von NPM1- und FLT3-Mutationen, ist zuletzt auch vermehrt die Bedeutung des Monitoring einer minimalen Resterkrankung (Minimal Residual Disease, MRD) untersucht worden.

Die aktuell gängigen Kriterien definieren CR als: Blasten im Knochenmark  $<5\%$ , periphere Thrombozyten  $> 100 \times 10^9 /l$ , Neutrophile  $> 1,0 \times 10^9 /l$ . Überprüft

werden diese Parameter nach den ersten Induktionstherapiezyklen per Zytomorphologie, die Sensitivität ist dabei jedoch eingeschränkt und empfindlichere Methoden sind wünschenswert. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff der zytogenetisch kompletten Remission geprägt, die definiert ist als die Abwesenheit anomaler meta- oder interphase Nuklei bei Fällen mit anomaler Zytogenetik bei Diagnosestellung. Mehrere Studien (u.a. Marcucci et al. 2004) zeigten eine Korrelation der zytogenetischen CR mit einer positiven Prognose.

Bei AML mit balancierten chromosomalen Translokationen (inv(16)/t(16;16), t(8;21), t(15;17) und MLL) und reziproken Genfusionen (PML-RARA, CBFβ-MYH11, AML1-ETO und 11q23/MLL) ist es möglich, das Fusionsprodukt durch PCR und Real-time PCR nachzuweisen. Die Expression des Fusionsgens nach Konsolidationstherapie in Relation zur Expression zur Zeit der Diagnose korreliert signifikant mit der Prognose (Leroy et al. 2005).

Für die restlichen Fälle, die etwa 70% repräsentieren, ist dies allerdings nicht möglich.

Hoffnungsträger für ein sensitives MRD-Monitoring der Patienten sind die FLT3- oder NPM1-Mutationen. Sie finden sich bei einem großen Prozentsatz von NK-AML-Patienten und es sind für beide Mutationen QRT-PCR-Ansätze beschrieben, um persistierende Blasten zu identifizieren. Vielversprechend ist hierbei, dass die PCR eine der FISH deutliche überlegene Sensitivität vorweist (Gorello et al. 2006).

Allerdings gibt es Berichte, dass die FLT3-ITD-Mutation in 4% - 27% im Rezidiv verloren ging (Kottaridis et al. 2002, Cloos et al. 2006). Gleiches gilt für NPM1-Mutationen, die in einzelnen Fällen ebenfalls im Rezidiv verloren gingen, jedoch stabiler als FLT3-ITD scheinen (Suzuki et al. 2005, Chou et al. 2006, Palmisano et al. 2007).

Diese Hinweise auf Instabilität der Mutation sollten in größeren Studien untersucht werden, bevor diese Form des Screenings als Methode des MRD-Monitoring eingesetzt wird. Solange sollten FLT3-ITD und NPM1 zwar in Abwesenheit anderer MRD-Marker mangels Alternativen eingesetzt, die Ergebnisse jedoch mit Vorsicht verwendet werden.

Gorello et al. beschreiben eine Korrelation der quantitativen Expression der NPM1-Mutation mit der Prognose der Patienten. Auch zu FLT3-ITD und MLL-PTD

gibt es vielversprechende Untersuchungen dieses Monitoring (Weisser et al. 2005, Schnittger et al. 2004).

Eine weitere Methode, MRD zu detektieren, ist die MFC durch den Nachweis eines Leukämie-assoziierten Immunphänotyps (LAIP). Griesinger et al. (1999) und weitere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich bei LAIP-positiven Zellen bestimmte pathologische Muster der Antigen-Expression finden, die im normalen Knochenmark nicht auftreten. Ein Abfallen der Konzentration dieser Zellen kurz nach Therapiebeginn korreliert signifikant mit dem Erreichen einer CR und dem Langzeitüberleben. Hochrisikopatienten können hierdurch früh identifiziert werden. Ein erneuter Anstieg LAIP-positiver Zellen tritt auf, bevor MRD durch Zytomorphologie diagnostiziert werden kann (Kern et al. 2004, 2005).

#### IV.3.4 Targeted Therapie

Zur Zeit sind Patienten mit APL-Diagnose innerhalb der AML die einzige Gruppe, der eine targeted therapy zukommt. Ihre Prognose konnte mit Einführung der **all-trans Retinolsäure** (ATRA) entscheidend verbessert werden. Das aus der Translokation t(15;17) resultierende Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$  bewirkt eine intrazelluläre Differenzierungsblockade, so dass bei betroffenen Promyelozyten keine weitere Ausreifung stattfinden kann. ATRA kann durch Rezeptorstimulation eine Überwindung dieser Blockade bewirken.

Die Hoffnung ist, durch die Identifizierung weiterer charakteristischer Mutationen und molekularbiologischer Veränderungen ähnlich effektive Methoden einer gezielten Therapie zu entwickeln.

Einen Ansatz stellen in diesem Zusammenhang die **FLT3-Inhibitoren** aus der Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) dar, sie agieren als kompetitive Inhibitoren an der ATP-Bindungsdomäne der Kinase und hemmen auf diese Weise die Autophosphorylierung. Zu den am intensivsten untersuchten relativ FLT3-spezifischen TKI gehören CEP-701 (Lestaurtinib), PKC412 (Midostaurin), MLN518 (Tandutinib) und SU11248 (Sunitinib). Diese Wirkstoffe waren in der Lage, in Konzentrationen im nM-Bereich, FLT3-exprimierende leukämische Zellreihen und primäre AML-Proben in Apoptose zu treiben (Levis et al. 2002, Weisberg et al. 2002, Kelly et al. 2002, O'Farrell et al. 2003).

Diese und einige weitere Substanzen befinden sich bereits in verschiedenen Stufen klinischer Studien. Ihre in vitro benötigte Konzentration zur Inhibition der

Autophosphorylierung ( $IC_{50}$ ) variiert, ebenso haben sie unterschiedliche „off-target“-Aktivität an anderen Tyrosinkinase Rezeptoren im Bereich ihrer  $IC_{50}$ , die durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen den Einsatz limitieren könnte.

**Tabelle 4.5 Liste einiger FLT3 Inhibitoren nach Small 2006**

| <b>Wirkstoff</b> | <b>Chemische Klasse</b>     | <b>Handelsname</b> | <b>Andere Rezeptoren</b> | <b>Klinische Studie</b> |
|------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| AG1295           | Quinoxalin                  |                    | PDGF, KIT                |                         |
| AG1296           | Quinoxalin                  |                    | PDGF, KIT                |                         |
| D64406           | Bis-indolyl-methanon        |                    | PDGF, KIT                |                         |
| SU5416           | 3-Substituiertes Indolinon  |                    | KIT, VEGF                | Phase I                 |
| SU11248          | 3- Substituiertes Indolinon | Sunitinib          | KIT, PDGF, VEGF          | Phase I                 |
| MLN518           | Quinazolin                  | Tandutinib         | KIT, PDGF                | Phase II                |
| CEP-701          | Indolocarbazol              | Lestaurtinib       | TRKA                     | Phase III               |
| PKC412           | Indolocarbazol              | Midostaurin        | KIT                      | Phase III geplant       |
| CHIR-258         | Benzimidazol-quinolin       |                    | KIT, FMS, FGF, VEGF      | Phase I                 |

Die FLT3-Inhibitoren wurden in klinischen Studien als Monotherapie bei Patienten mit therapierefraktärer AML oder im Rezidiv eingesetzt. Nach in-vitro-Testung des FLT3-Inhibitors an FLT3-ITD positiven Blasten der Patienten, erhielten diese eine ambulante, orale Therapie. Die Ergebnisse zeigen eine gute Verträglichkeit der Medikation, allerdings wurde lediglich eine periphere Eradikation der leukämischen Zellen erreicht, ein Effekt auf das Knochenmark trat bei wenigen Patienten auf. Die periphere Blastenzahl kehrte unter der Therapie innerhalb von Wochen bis Monaten zum Ausgangswert zurück. Der Mechanismus scheint jedoch ein anderer als eine Selektion TKI-resistenter, FLT3-ITD-positiver Zellreihen zu sein (Fiedler et al.2005, Stone et al.2005, Smith et al.2004).

Diese Ergebnisse wirken enttäuschend, wenn man sie mit der targeted therapy mittels Imatinib Mesylat (Gleevec®) in der chronischen Phase der CML mit bcr-abl-Translokation oder mit der ATRA Therapie bei APL vergleicht. Die Begründung liegt eventuell darin, dass FLT3-Mutationen nur eine von mehreren somatischen Mutationen sind, die eine AML auslösen, während die bcr-abl-Translokation in der chronischen Phase der CML meist die einzige molekulare Veränderung ist.

Weitere klinische Studien untersuchen zur Zeit Therapieschemata, die FLT3 Inhibitoren mit konventioneller Chemotherapie kombinieren (Stone et al., Levis et al.).

Während die MLL-PTD-Mutation von statistisch nicht signifikanter und teils widersprüchlicher prognostischer Bedeutung ist, könnte sie als Ziel einer targeted -Therapy umso interessanter sein. Von Whitman et al. 2005 konnte gezeigt werden, dass eine MLL-PTD Mutation mit einem funktionellen Verlust des Wildtypallels in AML-Blasten einhergeht. Der Mechanismus des Gen Silencing scheint eine veränderte DNA-Methylierung sowie Histonmodifikation mit direkter oder indirekter Wirkung auf Promoter des MLL-Gens zu sein. In derselben Studie zeigten Whitman et al., dass in vitro eine Kombination aus Decitabin, einem Methyltransferaseinhibitor und Depsipeptid, einem Histondeacetylaseinhibitor, die Transkription des MLL-Wildtypallels in MLL-PTD-positiven AML-Blasten reaktivieren konnte. Diese Induktion hat ein gesteigertes Zellsterben dieser Blasten zur Folge. Eine in-vivo-Studie an Patienten steht noch aus.

Ein **FLT3-Antikörper**, der die Ligandenbindungsdomäne blockiert und auf diese Weise die Signaltransduktion unterbindet, wurde von Piloto et al. in vitro und in Mäusen erprobt. Im Mausmodell zeigte sich eine AK-abhängige, zellulär vermittelte Zytotoxizität gegen einige AML- und ALL-Zellreihen, jedoch nicht alle. (Piloto et al. 2005 und 2006)

Ein weiterer Ansatz ist die Bindung von **Chaperon**-Proteinen, die an der Faltung des FLT3-Protein beteiligt sind. Es gibt Hinweise, dass FLT3-Proteine mit ITD-Mutation während ihrer Faltung in höherem Maße abhängig von Chaperonen sind als Wildtyp FLT3. Eines dieser Chaperone ist Hsp90 (Heat Shock Protein 90). Mehrere Hsp90-Inhibitoren befinden sich zur Zeit in klinischer Erprobung, einige in Kombination mit FLT3-Inhibitoren (Al Shaer et al. 2008).

## V. Zusammenfassung

Die WHO-Klassifikation für akute myeloische Leukämie (AML) nimmt eine Unterteilung in vier Untergruppen vor. Die cytogenetische Analyse erlaubt eine Unterteilung in verschiedene prognostische Gruppen. Es bleibt jedoch eine große Gruppe von Patienten (etwa 40 - 50 % aller AML-Patienten), bei der mit herkömmlichen Nachweismethoden keine chromosomalen Aberrationen nachgewiesen werden können und der eine ausgeglichene Prognose zugeschrieben wird. Individuelle Patienten dieser Gruppe zeigen jedoch sehr heterogene Krankheitsverläufe, so dass die Etablierung von Nachweismethoden für neue prognostische Marker notwendig ist. Zwei Genmutationen sind hierbei als neue Marker von besonderer Bedeutung:

NPM1-Mutation – gehört zu einer der häufigsten genetischen Abnormalitäten bei AML. Die Studienlage zeigt eine Assoziation mit einer positiven Prognose.

FLT3-internal-tandem-duplication (ITD) – ist mit einer Häufigkeit von etwa 30% aller AML-Patienten mit normalem Karyotyp beschrieben. In mehreren Studien zeigt sich eine Assoziation mit einer schlechten Prognose sowie eine Assoziation zu NPM1-Mutationen.

Der Nachweis dieser Mutationen mittels Sequenzierung ist aus dem Material der diagnostischen Beckenkampnpunktion möglich, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Allerdings sind inzwischen neue, weniger aufwendige Nachweismethoden beschrieben und bedürfen weiterer Evaluierung, um in die klinische Routine eingeführt werden zu können. Mit der angewandten Methode konnten NPM1-Mutationen bei zwei der acht Patienten nachgewiesen werden. Durch die zu geringe Fallzahl und den dadurch fehlenden Nachweis von FLT3-ITD-Mutationen im Patientenkollektiv blieb die vorliegende Arbeit insgesamt hinter den Erwartungen zurück. Vor allem durch den hohen Arbeitsaufwand des Klonierens und die nicht vorhandene Möglichkeit eines simultanen Nachweises von FLT3 und NPM1 wurden die Einschränkungen der untersuchten Methode für eine mögliche Routinediagnostik deutlich. Aufbauend auf dieser Arbeit werden am Institut für Pathologie weitere Untersuchungen an zusätzlichen Fällen erfolgen mit dem Bestreben, ein für die Routinediagnostik geeigneteres Verfahren zu etablieren. Die vorliegende Arbeit dahingehend zu erweitern hätte den gesetzten Rahmen jedoch überschritten.

## VI. Literaturverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abu-Duhier, F., Goodeve, A., Wilson, G., et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high risk group. <i>British Journal of Haematology</i> 2000;111:190-195                                                                                               |
| Al Shaer L., Walsby E., Gilkes A., et al.: Heat shock protein 90 inhibition is cytotoxic to primary AML cells expressing mutant FLT3 and results in altered downstream signalling. <i>Br J Haematol.</i> 2008 May;141(4): 483-93                                                                          |
| Arthur DC, Berger R, Golomb HM, et al. The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. <i>Cancer Genet Cytogenet</i> 1989;40:203–16.                                                                                                                                                |
| Baldus CD, Thiede C, Soucek S, et al. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic Implications. <i>J Clin Oncol.</i> 2006;24:790–797.                                                                         |
| Beghini A, Peterlongo P, Ripamonti CB, et al.: C-kit mutations in core binding factor leukemias. <i>Blood</i> 2000; 95: 726–727.                                                                                                                                                                          |
| Beghini A, Ripamonti CB, Cairoli R, et al.: KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. <i>Haematologica</i> 2004; 89: 920–925.                                                                              |
| Bienz M, Ludwig M, Oppliger Leibundgut E, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype<br><i>Clin Cancer Res.</i> 2005;11:1416-1424.                                                                                                                             |
| Bradstock K, Matthews J, Young G, et al. Effects of glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor after high-dose cytarabine-based induction chemotherapy for adult acute myeloid leukaemia. <i>Leukemia</i> 2001;15:1331–8.                                                       |
| Braess J, et al. :Modeling the pharmacodynamics of highly schedule-dependent agents: exemplified by cytarabine-based regimens in acute myeloid leukemia. <i>Clin Cancer Res.</i> 2005 Oct 15;11(20):7415-25.                                                                                              |
| Buchner T, et al. : Double induction containing either two courses or one course of high-dose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. <i>J Clin Oncol.</i> 2006 Jun 1;24(16):2480-9 |
| Buchner T, Hiddemann W, Löffler G, et al. Improved cure rate by very early intensification combined with prolonged maintenance chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia: data from the AML Cooperative Group. <i>Semin Hematol</i> 1991;28:76–9.                                              |
| Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of geneexpression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. <i>N Engl J Med.</i> 2004;350:1605-1616.                                                                                                                         |
| Buske C, Hiddemann W : Malignant lymphoma--there are still many open questions. <i>Internist</i> 2007;48,349-350.                                                                                                                                                                                         |
| Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, et al. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. <i>Cancer Res.</i> 1998;58:55–59.                                                                                                                                             |
| Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, et al.: Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. <i>Br J Haematol</i> 2003; 121: 775–777.                                                                                                  |
| Chou WC, Tang JL, Lin LI, et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. <i>Cancer Res</i> 2006; 66:3310–3316.                                                                                                |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. <i>Leukemia</i> 2006; 20: 1217–1220.                                                                                                                                   |
| Deschler, B., Lübbert, M., Acute Leukemia: Epidemiology and Etiology. <i>Cancer</i> 2006;107:2099-2107                                                                                                                                                                                                       |
| Döhner, C., Schlenk, R., Habdank, M., et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. <i>Blood</i> 2005;106:3740-3746                                                          |
| Estey E, Smith TL, Keating MJ, et al. Prediction of survival during induction therapy in patients with newly diagnosed acute myeloblastic leukemia. <i>Leukemia</i> 1989;3:257–63.                                                                                                                           |
| Falini B., Nicoletti I., Martelli F., et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/ mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. <i>Blood</i> 2007; 109:874-885                                                                                                                  |
| Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. <i>N Engl J Med</i> 2005;352:254-266                                                                                                                                            |
| Falk R : Long live the genome! So should the gene. <i>Hist Philos Life Sci</i> 2004;26:105-21.                                                                                                                                                                                                               |
| Fiedler W, et al. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. <i>Blood</i> 2005;105:986-993.                                                                                  |
| Fiegl M., Hiddemann W., Braess J. Aktuelle Therapiestrategien in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie. <i>Medizinische Klinik</i> 2007;102:309-316                                                                                                                                                 |
| Fröhling S, Lipka DB, Kayser S, et al. Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. <i>Blood</i> 2006; 107: 1242–1243.                                                                                                                                                         |
| Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, et al. 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. <i>Blood</i> . 2002;100:4372-4380                                               |
| Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. <i>Blood</i> 2005; 106: 3658–3665. |
| Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. <i>Leukemia</i> . 2006;20:1103-1108.                                                                                                   |
| Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, et al. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. <i>Br J Haematol</i> 1999; 105:241–255                                                     |
| Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., Pandolfi, P. Nucleophosmin and cancer. <i>Nature Reviews Cancer</i> 2006;6:493-505                                                                                                                                                                                    |
| Haferlach T., Bacher, U., Kern, W., et al. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. <i>Ann Hematol</i> (2007) 86:311–327                                                                                                                                                |
| Harousseau JL, Witz B, Lioure B, et al. Granulocyte colony-stimulating factor after intensive consolidation chemotherapy in acute myeloid leukemia: results of a randomized trial of the Groupe Ouest-Est Leucemies Aigues Myeloblastiques. <i>J Clin Oncol</i> 2000;18:780–7.                               |
| Heilmeier B., Buske C., Spiekermann K., et al. Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. <i>Medizinische Klinik</i> 2007;102:296-308                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hiddemann W, Martin WR, Sauerland CM, et al. Definition of refractoriness against conventional chemotherapy in acute myeloid leukemia: a proposal based on the results of retreatment by thioguanine, cytosine arabinoside, and daunorubicin (TAD9) in 150 patients with relapse after standardized first line therapy. <i>Leukemia</i> 1990;4:184–8.                                      |
| Johnson PR, Liu Yin JA. Acute myeloid leukaemia in the elderly: biology and treatment. <i>Br J Haematol</i> 1993;83:1–6.                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). <i>Cancer Cell</i> . 2002;1:421–432.                                                                                                                                                                                                                 |
| Kern W et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. <i>Blood</i> 2003;101:64–70.                                                                                        |
| Kern W, Schoch C, Haferlach T, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. <i>Crit Rev Oncol Hematol</i> 56:283–309                                                                                                                                                                                                                                           |
| Kern W et al.: Multivariate analysis of prognostic factors in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia undergoing sequential high-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone (S-HAM) salvage therapy: relevance of cytogenetic abnormalities. <i>Leukemia</i> 2000;14:226–31.                                                                                          |
| Kern W, Voskova D, Schoch C, et al. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. <i>Haematologica</i> 2004 89:528–540                                                                                                                                                                                  |
| King-Underwood L, Pritchard-Jones K : Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. <i>Blood</i> 1998;91:2961-8.                                                                                                                                                                                                                |
| Kiyoi H et al. : Prognostic Implication of FLT3 and N-RAS Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia. <i>Blood</i> 1999;93:3074-3080                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Kottaridis, P., Gale, R., Frew, M., et al. 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 AML10 and 12 trials. <i>Blood</i> 2001;98:1752-1759 |
| Kottaridis, P., Gale, R., Langabeer, S., et al. Studies of FLT3 mutations in paired presentations and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. <i>Blood</i> 2002;100:2393-2398                                             |
| Kusec R, Jaksic O, Ostojic S., et al. More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). <i>Blood</i> 2006; 108: 405–406.                                                                                                                                                                                                                                   |
| Leroy H, de Botton S, Grardel-Duflos N, et al. (2005) Prognostic value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). <i>Leukemia</i> 19:367–372                                                                                                                                                                                                                              |
| Levine RL et al.: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. <i>Cancer Cell</i> 2005; 7: 387–397.                                                                                                                                                                                         |
| Levis M, Allebach J, Tse KF, et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. <i>Blood</i> . 2002;99:3885-3891.                                                                                                                                                                                                                       |
| Levis M, Smith BD, Beran M, et al. A randomized, open-label study of Lestaurtinib (CEP-701), an oral FLT3 inhibitor, administered in sequence with chemotherapy in patients with relapsed AML harboring FLT3 activating mutations: clinical response correlates with successful FLT3 inhibition. <i>Blood</i> . 2005;106:121a.                                                             |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Marcucci G, et al. : Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. J Clin Oncol. 2004;22:2410-8.                         |
| Marcucci G., Mrozek K., Ruppert AS, et al. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B Study 8461. J Clin Oncol 2004; 22:2410–2418 |
| Marcucci G., Mrozek, K., Bloomfield, C. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. Curr Opin Hematol 2004;12:68-75                                                                                                                   |
| Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. Blood 2001;97:89-94.                                                                                                                           |
| Moreno I, Martin G, Bolufer P : Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. Haematologica 2003; 88                                                                                                                                    |
| Mrozek K., Döhner H., Bloomfield C. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. Curr Opin Hematol 2007;14:106-114                                                                                                        |
| Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T. et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996;10:1911-8.                                                                                                                                                              |
| Naoe, T., Kioyi, H. Normal and oncogenic FLT3. CMLS Cell Mol Life Sci 2004;61:2932-2938                                                                                                                                                                                                                    |
| Naoe, T., Suzuki, T., Kiyoi, H., Urano, T. (2006) Nucleophosmin: A versatile molecule associated with hematological malignancies. Cancer Sci 2006;97:963-969                                                                                                                                               |
| Noguera, N., Ammatuna, E., Zangrilli, D., et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD Mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. Leukemia 2005;19:1479-1482                                                                                                                  |
| O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, et al. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. Blood. 2003;101:3597-3605.                                                                                                                                           |
| Olesen LH, et al. Delineation and molecular characterization of acute myeloid leukemia patients with coduplication of FLT3 and MLL. Eur J Haematol. 2005;75:185-92.                                                                                                                                        |
| Pabst T, et al. : Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. Nat Genet.2001;27:263-70                                                                                                                                    |
| Palmisano M., Grafone T., Ottaviani E.: et al. NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. Haematologica. 2007 Sep;92(9):1268-9                                                                                               |
| Piloto O, Levis M, Huso D, et al. Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cellmediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Cancer Res.2005;65:1514-1522.             |
| Piloto O, Nguyen B, Huso D, et al. IMC-EB10, an anti-FLT3 monoclonal antibody, prolongs survival and reduces nonobese diabetic/severe combined immunodeficient engraftment of some acute lymphoblastic leukemia cell lines and primary leukemic samples. Cancer Res. 2006;66:4843-4851.                    |
| Ponziani V, et al.: The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. Leukemia 2006; 20: 2074–2076.                                                                                                              |
| Preudhomme C, et al. : Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). Blood 2002;100:2717-23.                                                                                            |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Radmacher MD, et al. Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. <i>Blood</i> 2006; 108:1677-83.                                                                                          |
| Reilly JT. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. <i>BloodRev</i> 2003;17:241–248.                                                                                                                                                                                                  |
| Reindl C, Spiekermann K : From Kinases to Cancer - Leakiness, Loss of Autoinhibition and Leukemia. <i>Cell Cycle</i> 2006                                                                                                                                                                                      |
| Renneville A., Roumier C., Biggio V., et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. <i>Leukemia</i> (2008) 22, 915–931                                                                                                                                              |
| Samdani A, Vijapurkar U, Grimm MA, et al. Cytogenetics and P-glycoprotein (PGP) are independent predictors of treatment outcome in acute myeloid leukemia (AML). <i>Leuk Res</i> 1996;20:175–80.                                                                                                               |
| Schlenk RF, Corbacioglu A, Krauter J, et al. Gene mutations as predictive markers for postremission therapy in younger adults with normal karyotype AML. <i>Blood</i> . 2006;108:6a                                                                                                                            |
| Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, et al.: Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. <i>Leukemia</i> . 2000;14:796–804.                                                                                                   |
| Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. (2004) FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. <i>Acta Haematol</i> 112:68–78                                                                                                                                                 |
| Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., et al. 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. <i>Blood</i> 2002;100:59-66 |
| Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotyp. <i>Blood</i> 2005;106:3733-3739                                                                                                          |
| Seth A, Watson DK: ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. <i>Eur J Cancer</i> 2005;41:2462-78.                                                                                                                                                                                    |
| Shih LY, Huang CF, Wang PN, et al. Acquisition of FLT3 or Nras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. <i>Leukemia</i> . 2004;18:466-475.                                                                                                   |
| Small D., FLT3 Mutations: Biology and Treatment. <i>Hematology Am Soc Hematol Educ Program</i> . 2006:178-84.                                                                                                                                                                                                  |
| Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> . 2004;103:3669-3676.                                                                                       |
| Stasi R, et al. : Intensive treatment of patients age 60 years and older with de novo acute myeloid leukemia: analysis of prognostic factors. <i>Cancer</i> . 1996 Jun 15;77(12):2476-88                                                                                                                       |
| Steensma DP, McClure RF, Karp JE, et al. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. <i>Leukemia</i> 2006; 20: 971–978.                                                                                                            |
| Steudel, C., Wermke, M., Schaich, M., et al.: Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. <i>Genes, Chromosomes and Cancer</i> , 2003;37: 237–251.                                                |
| Stirewalt DL, et al. : Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. <i>Br J Haematol</i> . 2004 Feb;124(4):481-4                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S., et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> 2006; 107: 3724–3726.                                                                                                                                                             |
| Stirewalt, D., et al.: Molecular targets in acute myelogenous leukemia. <i>Blood Reviews</i> 2003;17:15-23                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Stone R, Fischer T, Paquette RL, et al. Phase IB study of PKC412, an oral FLT3 kinase inhibitor, in sequential and simultaneous combinations with daunorubicin and cytarabine (DA) induction and high-dose cytarabine consolidation in newly diagnosed patients with AML. <i>Blood</i> .2005;106:121a.                                                      |
| Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. <i>Blood</i> . 2005;105:54-60.                                                                                                                                          |
| Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. <i>Blood</i> 2005;106:2854–2861.                                                                                                                                                                                       |
| Tan AYC, Westerman D., Carney D., et al.: Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 - internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. <i>Journal of Hematology &amp; Oncology</i> 2008, 1:10                                                                                                |
| Thiede C, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. <i>Blood</i> 2002;99:4326-4335.                                                                                                                                  |
| Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). <i>Blood</i> 2006;107:4011-4020                                                                                                                                                                     |
| Thomas X, Fenaux P, Dombret H, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to increase efficacy of intensive sequential chemotherapy with etoposide, mitoxantrone and cytarabine (EMA) in previously treated acute myeloid leukemia: a multicenter randomized placebo-controlled trial (EMA91 Trial). <i>Leukemia</i> 1999;13:1214–20. |
| Valk PJM, Verhaak RGW, Beijnen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. <i>N Engl J Med</i> . 2004;350:1617-1628.                                                                                                                                                                                               |
| Vaughn CP, Elenitoba-Johnson KS: High-resolution melting analysis for detection of internal tandem duplications. <i>J Mol Diagn</i> 2004, 6:211-216.                                                                                                                                                                                                        |
| Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. <i>Cancer Cell</i> . 2002;1:433-443.                                                                                                                                                                  |
| Weisser M, et al.: Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. <i>Haematologica</i> 90:881–889                                                                                                                                                                 |
| Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the wildtype 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. <i>Cancer Res</i> . 2001;61:7233–7239                                                                       |
| Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, et al. The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. <i>Blood</i> . 2005;106:345-352.                                                                                                       |
| Zittoun R, Jehn U, Fiere D, et al. Alternating v repeated postremission treatment in adult acute myelogenous leukemia: a randomized phase III study (AML6) of the EORTC Leukemia Cooperative Group. <i>Blood</i> 1989;73:896–906.                                                                                                                           |

## VII. Anhang

### VII.1 FLT 3 Sequenzen

#### Patient A



Abb. 7.1. Patient A - FLT3 Wildtyp Sequenz

## Patient B

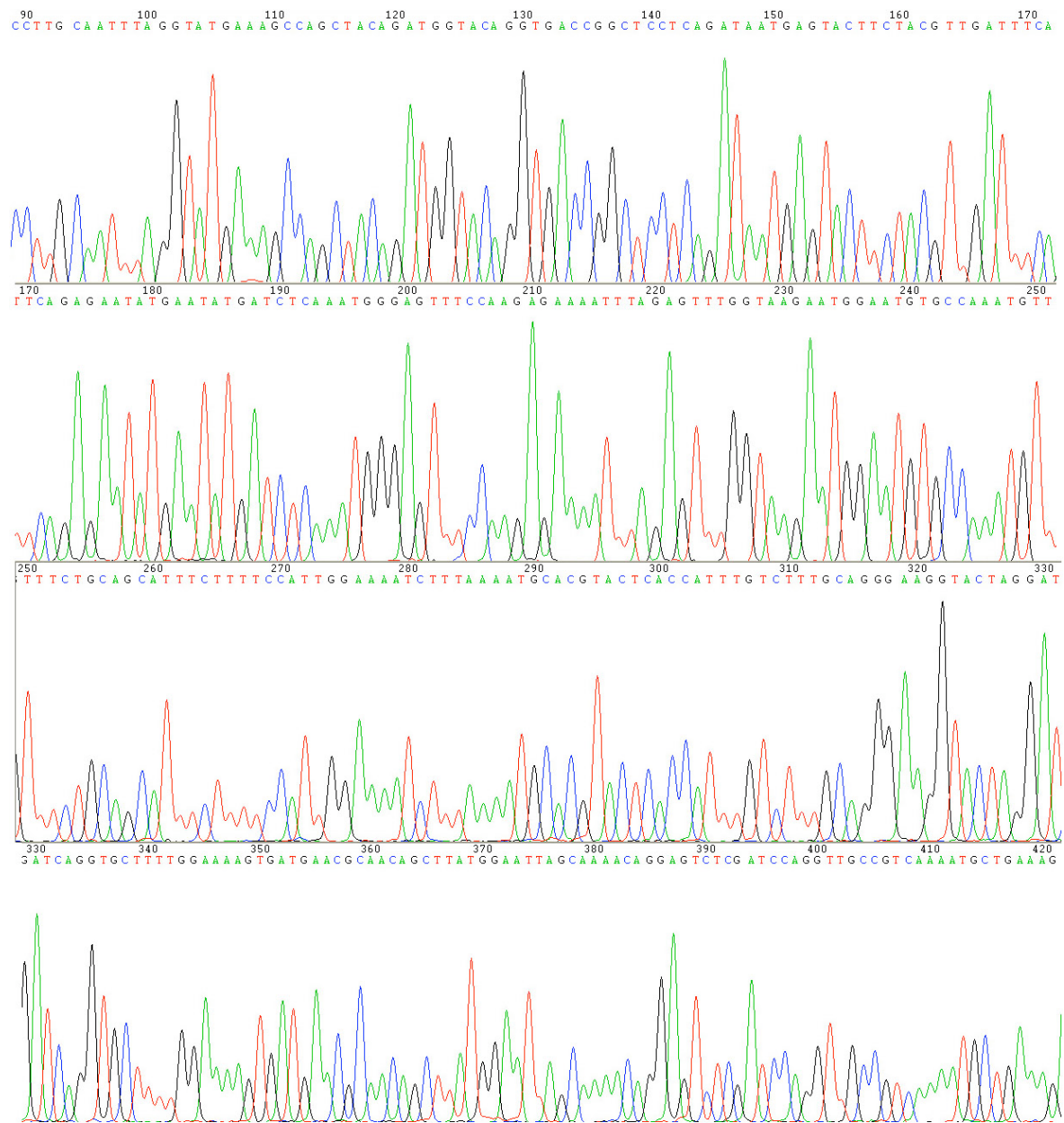


Abb. 7.2. Patient B - FLT3 Wildtyp Sequenz

## Patient C

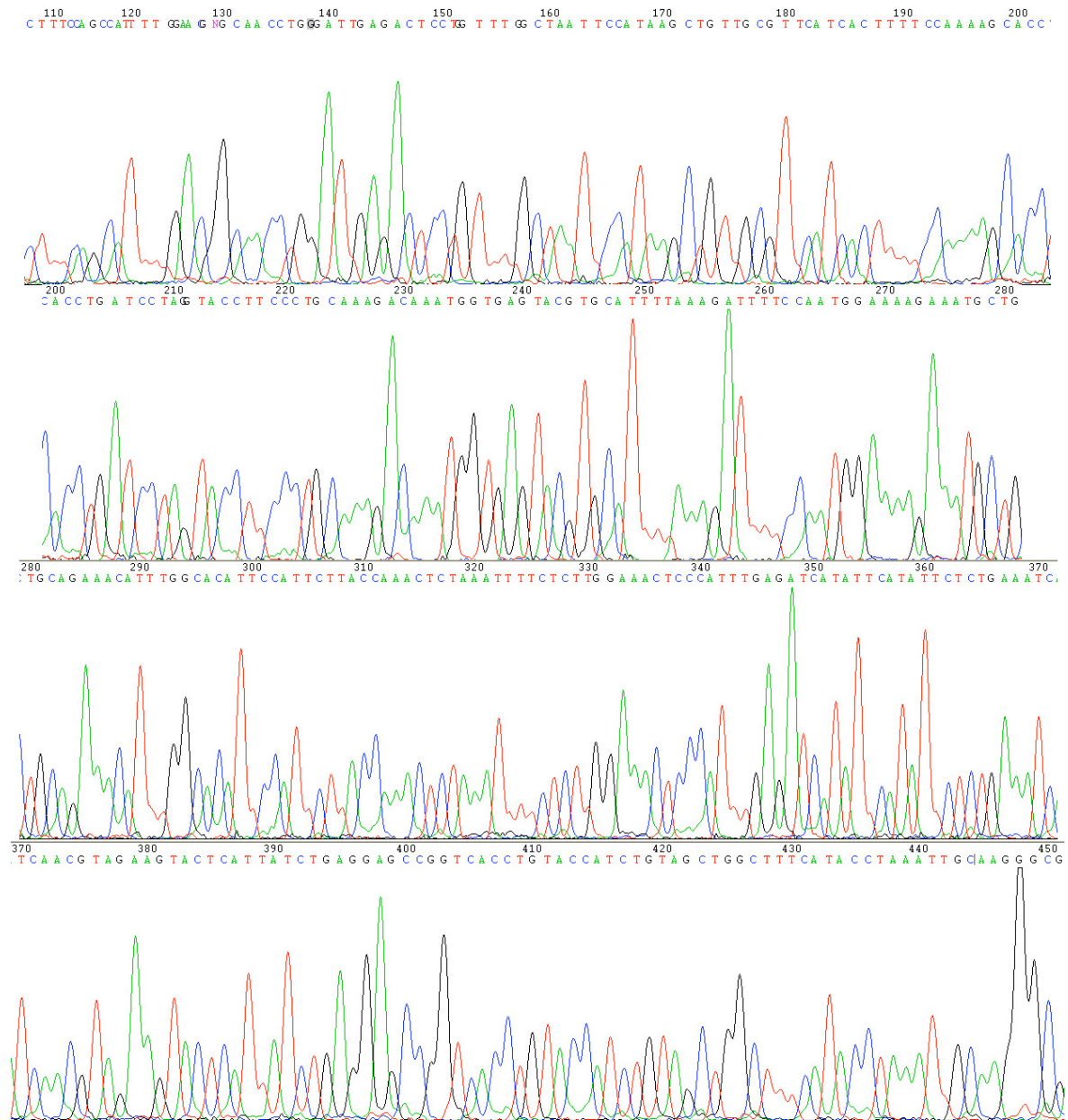


Abb. 7.3. Patient C - FLT3 Wildtyp Sequenz

## Patient F



Abb. 7.4. Patient F - FLT3 Wildtyp Sequenz

## Patient G



Abb. 7.5. Patient G - FLT3 Wildtyp Sequenz

## Patient H



Abb. 7.6. Patient H - FLT3 Wildtyp Sequenz

## VII. 2. NPM 1 Sequenzen

## Patient A

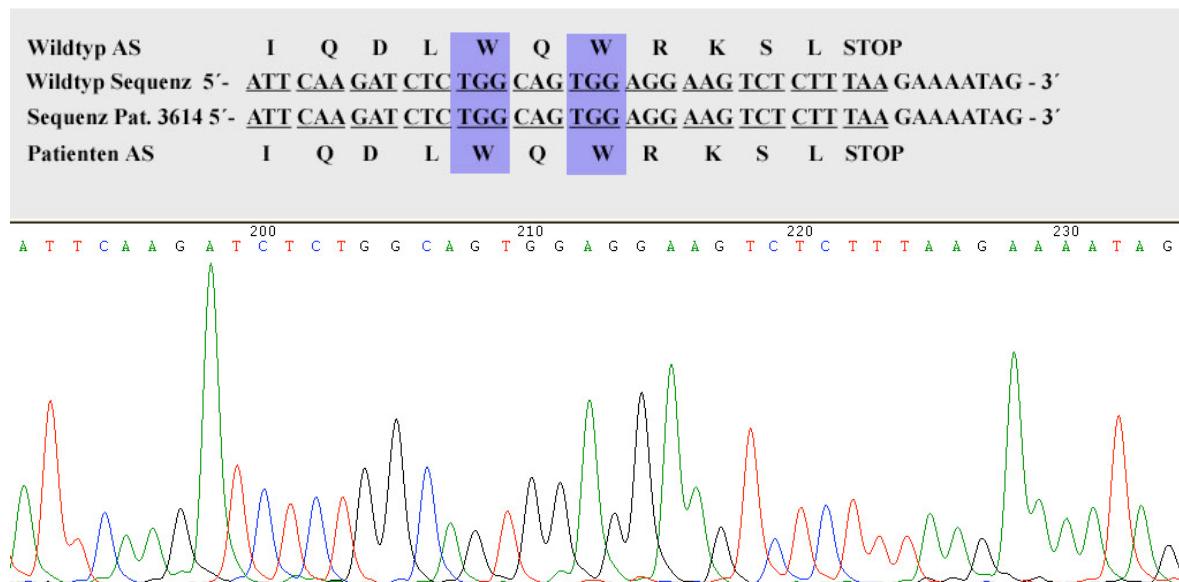


Abb. 7.7. Patient A - NPM1 Wildtyp Sequenz und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one- letter code. Blau unterlegt die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste.

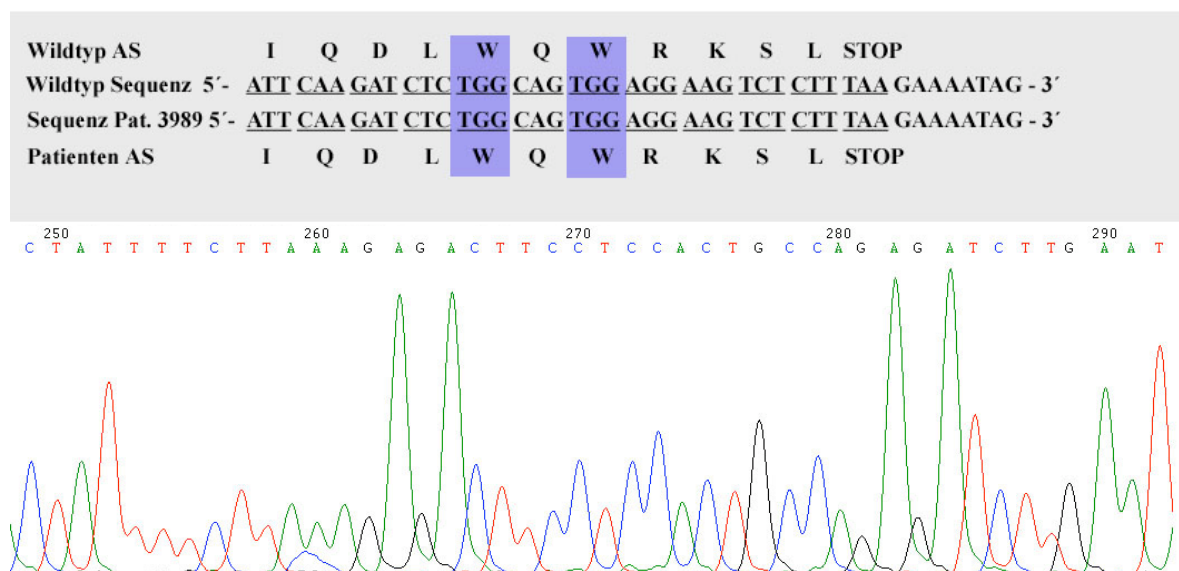


Abb. 7.8. Patient C - NPM1 Wildtyp Sequenz und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one- letter code. Blau unterlegt die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste.

## Patient F

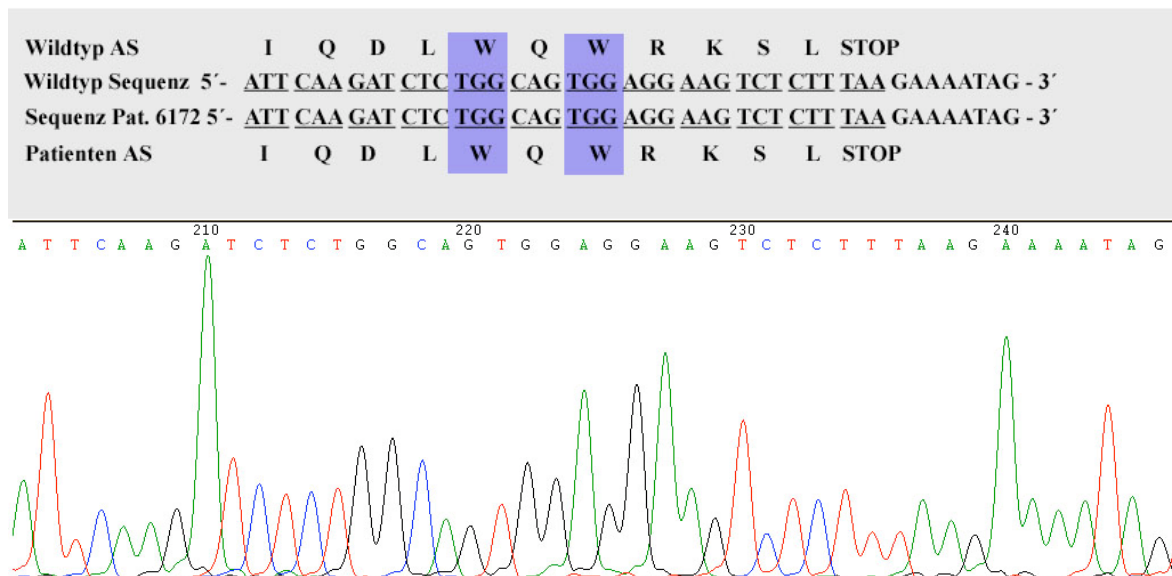


Abb. 7.9. Patient F - NPM1 Wildtyp Sequenz und Patientensequenz im Leseraster mit dazugehörigen Aminosäuren im one-letter code. Blau unterlegt die beiden für den nukleären Transport wichtigen Tryptophanreste.

### **VIII. Danksagung**

Mein Dank gilt dem Direktor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck, Prof. Dr. med. Alfred C. Feller, der mir an seinem Institut die Möglichkeit zur Durchführung des experimentellen Teils meiner Arbeit bot.

Ebenso danke ich meinem Doktorvater und stellvertretenden Institutsdirektor Prof. Dr. med. Hartmut Merz für die Vergabe der Fragestellung und seine Betreuung und Ratschläge auf dem Weg zur Promotion.

Weiterhin möchte ich meinem Betreuer Dr. Christian Kähler für die Unterstützung während der experimentellen Phase der Arbeit danken, ebenso allen Mitarbeitern des Instituts, die mich mit wertvollen Tipps unterstützt haben.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

|               |                               |
|---------------|-------------------------------|
| Name          | Jakob Lüker                   |
| Adresse       | Siemssenstr.13, 20251 Hamburg |
| Geburtsdatum  | 21.01.1982                    |
| Geburtsort    | Hamburg                       |
| Familienstand | ledig                         |



## Ausbildung

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1992 - 2001       | Heilwig-Gymnasium, Hamburg.<br>Leistungskurse Biologie und Englisch. Abitur (Note 1,6)                                                                                                                                                                   |
| 07/2001 - 05/2002 | Zivildienst im Dialyse-Zentrum Alter Teichweg, Hamburg                                                                                                                                                                                                   |
| 10/2002 - 08/2004 | Vorklinik an der Universität Hamburg –<br>1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2,33)                                                                                                                                                                |
| 10/2004 - 10/2005 | 1. und 2. klinisches Semester an der Universität Heidelberg -<br>Fakultät Mannheim. Teilnahme an „Junior Scientific Masterclass“<br>unter der Leitung von Prof. F. van der Woude                                                                         |
| 07/2006 - 12/2006 | Experimenteller Teil der Doktorarbeit „Nachweis von NPM1 und<br>FLT3 Mutationen bei Patienten mit AML“ am Institut für<br>Pathologie - Universitätsklinik Lübeck<br>Doktorvater Prof. Dr. med. H. Merz.<br>Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. A. Feller |
| 08/2007 - 07/2008 | Praktisches Jahr: Innere Medizin (Sana Klinik Eutin),<br>Anästhesie (Klinikum Itzehoe), Chirurgie (Klinikum Itzehoe)                                                                                                                                     |
| 05/2009           | 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5) an der Universität<br>zu Lübeck                                                                                                                                                                           |
| seit 07/2009      | Assistenzarzt am Universitären Herzzentrum Hamburg - Klinik<br>für Kardiologie mit Schwerpunkt Elektrophysiologie - Direktor<br>Prof. S. Willems                                                                                                         |

Hamburg, den 05. April 2010