

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Thema der Dissertation

**Die FLT3 Längenmutation in der akuten myeloischen Leukämie –
Charakterisierung und Bedeutung am Beispiel von 274 Patienten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Theodora Malamoussi
aus Ludwigshafen am Rhein

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann

Mitberichterstatter: PD Dr. Roland Kappler
Prof. Dr. Heiko Hermeking
Prof. Dr. Martin Reincke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Karsten Spiekermann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2009

Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Arbeit an der Medizinischen Klinik III der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann bedanken.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Karsten Spiekermann für die Überlassung dieses Themas und für die herausragende Betreuung und Korrektur dieser Arbeit.

Für die geduldige Einarbeitung danke ich insbesondere Ruth Schwab und Sabine Eichenlaub. Mein Dank gilt weiterhin Tobias Kohl, der immer ein gutes Wort hatte und allen anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, ohne deren moralische Unterstützung ich nie mein Medizinstudium und meine Promotion vollendet hätte.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	S.1
1.1	Die physiologische Hämatopoese	S.1
1.2	Leukämie	S.2
1.3	Akute myeloische Leukämie	S.3
	1.3.1 Inzidenz und Ätiologie	S.3
	1.3.2 Einteilung der akuten myeloischen Leukämie	S.4
1.4	Rezeptortyrosinkinasen	S.8
1.5	Der FLT3 Rezeptor (<i>fms- like tyrosine kinase 3- Rezeptor</i>)	S.9
1.6	Der FLT3 Ligand	S.10
1.7	Aktivierung und Signaltransduktion	S.11
1.8	Expression von FLT3	S.12
1.9	FLT3-Mutationen	S.13
	1.9.1 Häufigkeit der Mutationen	S.13
	1.9.2 FLT3-LM (Längenmutation)	S.13
	1.9.3 Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne (FLT3-TKD)	S.15
	1.9.4 Punktmutationen in der juxtamembranösen Domäne	S.15
	1.9.5 Mutation in der katalytischen Domäne	S.15
	1.9.6 Das 2- hit Model	S.16
2.	Zielsetzung der Arbeit	S.17
3.	Material und Methoden	S.18
3.1	Patientendaten	S.18
3.2	Zytogenetische Analyse	S.18
3.3	Isolierung von Nukleisäuren	S.18

3.4	Polymerase- Kettenreaktion (PCR)/Reverse Traskriptase (RT-)-PCR	S.19
3.5	Sequenzierung	S.19
3.6	Elektronische Datenverarbeitung/Software	S.19
4.	Ergebnisse	S.20
4.1	Demographische und klinische Daten der Patienten	S.20
4.2	Charakterisierung der FLT3- LM	S.23
4.2.1	Länge der inserierten Aminosäuren	S.23
4.2.2	Lokalisation der Duplikation	S.29
4.2.3	Zusammensetzung inserierter Aminosäuren	S.31
4.2.4	Die kürzeste inserierte Sequenz am Beispiel von 35 Patienten	S.33
5.	Diskussion	S.35
5.1	Häufigkeit der FLT3- LM	S.35
5.2	Häufigkeit der FAB- und zytogenetischen Subgruppen bei Patienten mit einer FLT3- LM	S.35
5.3	Klinische Bedeutung der FLT3- LM	S.37
5.3.1	Komplette Remission	S.37
5.3.2	Rezidivraten	S.38
5.4	Länge und Lokalisation der FLT3- LM	S.38
5.5	Erklärungsversuch für die Entstehung der FLT3- LM	S.40
5.6	Biologische Bedeutung der FLT3- LM	S.41
6.	Zusammenfassung	S.45
7.	Abkürzungsverzeichnis	S.47
8.	Literaturverzeichnis	S.49
9.	Curriculum Vitae	S.54

1. Einleitung

1.1 Die physiologische Hämatopoese

Die Hämatopoese findet beim Erwachsenen im Knochenmark statt. Alle Zellen sowohl der Lympho- als auch der Myelopoese haben eine gemeinsame Vorläuferzelle, die sog. pluripotente Stammzelle (Abb. 1.1). Aus dieser gehen verschiedene Zellen hervor, die sich entweder differenzieren und/oder proliferieren. Im Rahmen einer Differenzierung entstehen lymphatische und myeloische Stammzellen. Da aus den lymphatischen Zellen nur noch B- oder T-Lymphozyten werden können und analog dazu aus den myeloischen Stammzellen nur Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Thrombozyten, spricht man von determinierten Stammzellen.

Dieser Vorgang und auch die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen sind Prozesse, die im Körper sehr genau reguliert werden. Dabei spielen verschiedene Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle, unter deren Einfluss es v.a. zur Ausreifung hämatopoetischer Vorläuferzellen kommt. Zu nennen ist an dieser Stelle der Stammzellfaktor *stem cell factor* SCF, der für die Entwicklung der Stammzelle entweder in eine lymphatische oder eine myeloische Stammzelle verantwortlich ist. Erythropoetin (EPO), Granulozyten koloniestimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) und Thrombopoetin führen dementsprechend zur Ausreifung von Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen und Thrombozyten (Scheßl, 2005).

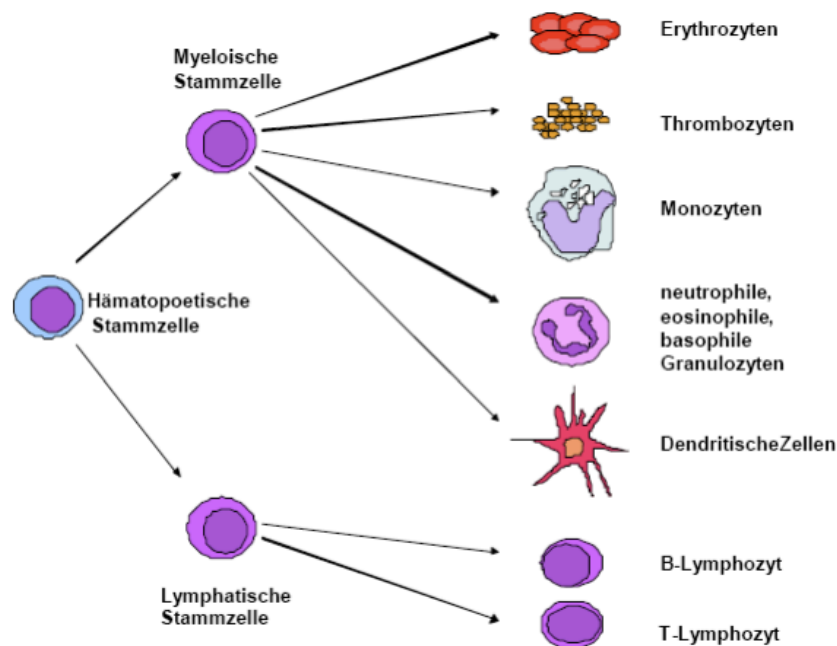


Abbildung 1.1: Die physiologische Hämatopoese (Speck und Gilliland, 2002)

1.2 Leukämie

Das Wort Leukämie wurde von Rudolf Virchow 1845 geprägt und beschreibt eine systemische und autonome Proliferation eines abnormen Zellstammes des leukozytenbildenden Systems im Knochenmark mit konsekutiver Verdrängung der restlichen Blutbildung.

Im Vordergrund der klinischen Symptomatik stehen zum einen die erhöhte Anfälligkeit für Infekte aufgrund der funktionsuntüchtigen Leukozyten, zum anderen die Anämie durch Verminderung der Erythrozyten und darüber hinaus noch die erhöhte Blutungsneigung durch Reduktion der Thrombozytenzahl. Eine Zellausschwemmung ins periphere Blut führt zur Infiltration von Organen, wie z. B. Leber, Milz und Lymphknoten, deren Funktion dadurch auch eingeschränkt werden kann (Löwenberg, 1999).

Leukämien werden, abhängig von dem beteiligten Zelltyp, den Reihen der Myelopoese und der Lymphopoese zugeordnet und des Weiteren, abhängig vom klinischen Verlauf, als akut oder chronisch eingestuft.

1.3 Akute myeloische Leukämie (AML)

1.3.1 Inzidenz und Ätiologie

Die Inzidenz der akuten myeloischen Leukämie beträgt zwei bis drei pro 100.000 Menschen (Feuring-Buske, 2002). Bei 80% der akuten Leukämien, die im Kindesalter auftreten, handelt es sich um akute lymphatische Leukämien (ALL). Bei Erwachsenen lässt sich dagegen feststellen, dass 80% der akuten Leukämien akute myeloische Leukämien (AML) sind. Die Inzidenz der AML nimmt mit steigendem Alter zu und erreicht bei 80-jährigen eine Zahl von über 70 Erkrankungen bei 100.000 Personen im Zeitraum von einem Jahr (Schiffer, 2005).

In den meisten Fällen ist die Ursache nicht bekannt, jedoch spielen genetische Prädispositionen bei der Entstehung der akuten Leukämie eine wichtige Rolle. So besteht bei Menschen mit numerischen chromosomalen Aberrationen wie Trisomie 21 (Down Syndrom), Trisomie 13 (Patau Syndrom) oder auch XXY (Klinefelter Syndrom) ein erhöhtes Risiko, an einer Leukämie zu erkranken (Feuring-Buske, 2002).

Weiterhin führt auch die Exposition mit ionisierender Strahlung oder unterschiedlichen Chemikalien, wie z. B. Benzol, Herbiziden, Pestiziden und verschiedenen Farben und Mineralölprodukten zu einer erhöhten Inzidenzrate für AML (Feuring-Buske, 2002; Harisson, 2003).

Davon abzugrenzen sind therapieassoziierte Leukämien nach vorheriger Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika, wie z. B. Alkylantien oder Topoisomerase-II-Inhibitoren, die ungefähr 10-20% aller Fälle mit AML ausmachen (Feuring-Buske, 2002). Problematisch hierbei ist, dass in vielen Fällen therapieresistente Leukämien entstehen.

Pathophysiologisch kommt es bei 80% der myeloischen Leukämien zu genetischen Läsionen, wie z. B. chromosomalen Translokationen in der hämatopoetischen Stammzelle. Diese betreffen oft Transkriptionsfaktoren, die dadurch ihre normale

Funktion in der Differenzierung, Proliferation und Apoptose der Zellen, verlieren (Gilliland, 2002). Beispiele für Leukämien mit chromosomalen Translokationen sind die *Core Binding Factor* (CBF) Leukämien, und diese die das *mixed lineage leukemia* (MLL)-Gen auf Chromosom 11 Bande q23 betreffen. Diese führen zur Bildung chimärer Fusionsgene, die in der Regel nicht in normalen Zellen exprimiert werden. Die an der Translokation beteiligten Gene verlieren somit ihre normale Funktion in der Hämatopoese (Feuring-Buske, 2002).

1.3.2 Einteilung der akuten myeloischen Leukämie

Die Definition einer akuten Leukämie setzt einen Anteil von mehr als 20% Blasten im Knochenmark oder peripherem Blut voraus (Harris, 2000).

Heutzutage beruhen die Diagnostik und die Klassifikation der AML auf einer Kombination morphologischer und zytochemischer Befunde und werden durch Immunphänotypisierung und Zytogenetik ergänzt (Haferlach, 2002). Grundlage der Diagnostik ist immer noch die mikroskopische Untersuchung von Knochenmarksausstrichen. Dabei wird auf die Morphologie der Blasten und auf charakteristische Merkmale wie z. B. dem Vorhandensein von Auer-Stäbchen geachtet, die die Zuordnung der Blasten zur myeloischen Reihe ermöglichen. Auch zytochemische Untersuchungen können zur Hilfe genommen werden, wie z. B. die Peroxidase-, Esterase- und PAS-Reaktion um die Abgrenzung zur ALL zu ermöglichen. Obligat ist derzeit auch die Immunphänotypisierung. Dabei werden markierte monoklonale Antikörper verwendet, die auf der Basis einer Antigen-Antikörperreaktion mit membranständigen Oberflächenmolekülen reagieren, welche auf Leukämiezellen exprimiert werden (Haferlach, 2002).

Die FAB Klassifikation (benannt nach der Abkürzung von *French American British Group*), berücksichtigt vorwiegend zytomorphologische und zytochemische Merkmale (Tabelle 1.3.2) (Bennet, 1976).

FAB		% von AML	Zytochemie
M0	Akute undifferenzierte L.	5	
M1	AML ohne Ausreifung	15	POX
M2	AML mit Ausreifung	25	POX
M3	Akute Promyelozyten-L. (APL)	10	POX
M3v	Variante mikrogranulozytäre APL		POX
M4	Akute myelomonozytäre L.	25	POX + Esterase
M4Eo	Mit Eosinophilie		POX + Esterase
M5	Akute monozytäre Leukämie	10	Esterase
M6	Akute Erythroleukämie	5	
M7	Akute megakaryozytäre L.	5	

Tabelle 1.3.2: FAB-Klassifikation (Larson und Le Beau, 2005) L: Leukämie, POX: Myeloperoxidasereaktion

In der WHO-Klassifikation (Namen gebend ist in diesem Fall die *World Health Organisation*), werden dagegen zusätzlich noch genetische und ätiologische Kriterien berücksichtigt (Abb. 1.3.2). Bei bis zu 80% der AML können chromosomale Aberrationen festgestellt werden, die einen wichtigen prognostischen Faktor darstellen (s. Abb. 1.3.2). Zusätzlich wird in dieser Klassifikation die AML mit multilinearer Dysplasie berücksichtigt wie z.B. bei vorausgegangenem myelodysplastischen Syndrom (MDS) und AML oder MDS die therapiebedingt entstanden sind.

AML mit genetischen Aberrationen	AML mit multilinearer Dysplasie
AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML-1/ETO)	Mit vorausgegangenem MDS
AML mit abnormen KM-Eosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11)	Ohne vorausgegangenem MDS, jedoch mit Dysplasie in mindestens 50% der Zellen in 2 oder mehr Zellreihen
Akute Promyelozyten-Leukämie mit t(15;17)(q22;q12), PML/RARα und Varianten	
AML mit 11q23 (MLL)-Anomalien	

Therapiebedingte AML/MDS	AML klassifiziert als:
Nach Alkylantien-/ Strahlentherapie	AML minimal differenziert
Nach Topoisomerase II-Inhibitoren	- mit Ausreifung
Andere Auslöser	- ohne Ausreifung
	Akute myelo-monozytäre Leukämie
	Akute monoblastisch/-zytäre Leukämie
	Akute erythrozytäre Leukämie
	Akute megakaryoblastäre Leukämie
	Akute basophile Leukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
	Akute biphänotypische Leukämie

Abbildung 1.3.2: WHO Klassifikation (Vardiman et al., 2002)

Es wurde beobachtet, dass bestimmte genetische Aberrationen mit einzelnen FAB-Subtypen häufiger kombiniert auftreten (Kiyoi, 1997; Kottaridis, 2001; Schnittger, 2002; Thiede, 2002). So ist beispielsweise die Translokation t(15;17) immer mit den Subtypen M3 und die Inversion inv(16) mit den Subtypen M4 verbunden.

Das Alter der Patienten scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen. Jüngere Erkrankte haben oft chromosomale Aberrationen wie z. B. t(15;17) und t(8;21). Bei Menschen mit höherem Alter findet man dagegen öfter Deletionen wie z. B. del(5q) und del(7q) und komplexe Karyotypen.

Diese genetischen Alterationen stehen auch im Zusammenhang mit der Prognose des Patienten. Aufgrund ihres Karyotyps werden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt.

Diejenigen mit günstiger Prognose weisen Mutationen wie z. B. t(8;21), t(15;17), inv(16) auf. Dabei handelt es sich um spezifische chromosomale Translokationen von Genen, die für die Hämatopoese eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktoren spielen.

Mutationen wie z. B. -7; -5; del(5q) 3q und komplexere Mutationen müssen als unbalancierte chromosomale Aberrationen angesehen werden. In dieser Gruppe mit insgesamt ungünstiger Prognose kommen Mutationen vor, die durch chromosomalen Verlust und/oder chromosomale Deletion entstanden sind.

Patienten mit intermediärer Prognose weisen entweder einen normalen Karyotyp auf oder besitzen Mutationen, die nicht zu den vorhergenannten gehören. (Spiekermann, 2005).

Insbesondere 2 große Studien haben versucht in den letzten Jahren die Prognose im Hinblick auf zytogenetische Merkmale näher zu charakterisieren (Grimwade, 1998; Slovak 2000). Durch eine Induktionschemotherapie konnte in der Gruppe der Patienten mit günstiger Prognose eine komplette Remission (CR) bei ca. 85% der Patienten, in der Gruppe mit ungünstiger Prognose eine CR bei ca. 55% und bei denen mit intermediärer Prognose eine CR bei ca. 75% der Patienten beobachtet werden. Die komplette Remission wurde dabei nach standardisierten Kriterien definiert. Analog dazu betrug die 5-Jahres Überlebensrate in der ersten Gruppe 60%, in der Zweiten 25% und in der Dritten 50%.

Ziel einer jeglichen Therapie ist eine anhaltende komplette Remission zu erreichen. Dabei können nur Empfehlungen für eine Standardtherapie ausgesprochen werden, da es verschiedene Therapiestrategien gibt (Büchner, 2002). Nach den Studienergebnissen der *AML Cooperative Group* (AMLCG) wird grob empfohlen mit einer Doppelinduktionschemotherapie zu beginnen. Nach Eintritt einer CR erfolgt dann ein weiterer Kurs Chemotherapie gefolgt von einer 3-jährigen Erhaltungstherapie, wiederum bestehend aus verschiedenen Chemotherapeutika.

Patienten mit histokompatiblen Geschwisterspender werden in der frühen CR allogent transplantiert. Dies scheint v.a. bei Patienten mit günstiger aber auch ungünstiger Prognose vom Vorteil zu sein. Eine autologe Knochenmarkstransplantation wirkt sich am deutlichsten bei Patienten mit günstigem Karyotyp aus (Büchner, 2002).

Dennoch muss man vorsichtig mit kollektiven Prognoseschätzungen sein, da auch Faktoren wie das Alter des Patienten, seine initiale Leukozytenzahl, sein Lactatdehydrogenasespiegel und Immunphänotyp genauso wie das Ansprechen auf die Therapie entscheidend sein können (Schnittger, 2002; Kottaridis, 2003).

1.4 Rezeptortyrosinkinasen

Die Hämatopoese ist, wie schon erwähnt, ein streng regulierter und kontrollierter Prozess, aus welchem, ausgehend von einer kleinen undifferenzierten Zellpopulation, hochdifferenzierte und spezifische Zellen hervorgehen (Reilly, 2002). Verschiedene Interleukine und Wachstumsfaktoren wirken dabei regulierend oder kontrollierend. Zu diesem Zweck binden sie an Rezeptoren, die sich meistens in der Zellmembran befinden. Nur dadurch ist eine regelrechte Signaltransduktion in das Zellinnere und damit bis zum Zellkern gewährleistet.

Es existieren drei verschiedene Typen von Rezeptorproteinen: Ionengekoppelte, G-Proteingekoppelte und enzymgekoppelte Rezeptorproteine. Eine Aktivierung hat zur Folge, dass intrazellulär verschiedene Proteine phosphoryliert werden, hauptsächlich durch Serin/Threonin- oder Tyrosinkinasen.

Es sind über 90 Phosphotyrosinkinasen-Gene (PTK) bekannt. 58 davon kodieren für transmembranöse Rezeptor-PTK (RTK), die in ca. 20 Gruppen unterteilt werden. Weitere 32 kodieren für zytoplasmatische PTK, die in zehn Gruppen zusammengefasst werden (Reilly, 2003).

PTK gelten als sehr potente Onkogene. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der multizellulären Kommunikation, Proliferation und Differenzierung. Somatische Mutationen oder aber auch nur die Überexpression solcher Gene verursachen einen signifikanten Anteil an menschlichen Karzinomen (Blume-Jensen, 2001).

Alle Rezeptortyrosinkinasen bestehen zum einen aus der extrazellulären Domäne, die für die Bindung des dazugehörenden Wachstumsfaktors zuständig ist, zum zweiten aus dem transmembranösen lipophilen Anker und zum dritten aus der intrazellulären Kinase-Domäne (Reilly, 2003).

Die Rezeptortyrosinkinasen werden anhand ihrer Sequenz, der strukturellen Eigenschaften und der extrazellulären Domäne in verschiedene Untergruppen eingeteilt (Abb. 1.4).

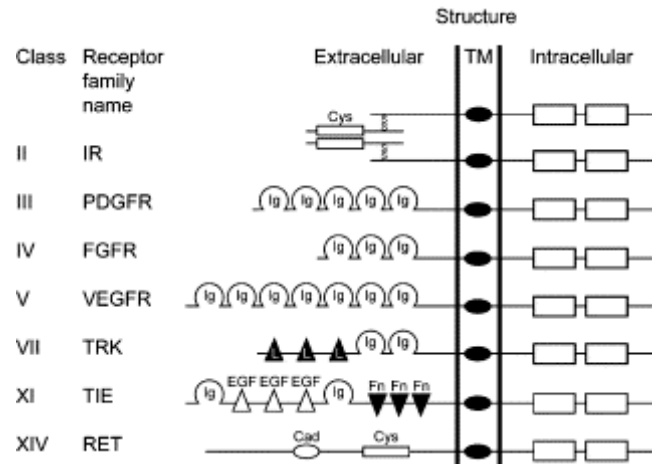


Abbildung 1.4: Rezeptortyrosinkinasen, die in der Onkogenese eine wichtige Rolle spielen (Reilly, 2003)

1.5 Der FLT3-Rezeptor (*fms-like tyrosine kinase 3- Rezeptor*)

Das FLT3-Gen ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert. Es besteht aus 24 Exons und kodiert ein Protein, welches beim Menschen aus 993 Aminosäuren besteht (Gilliland, 2002).

FLT3 gehört zu der Gruppe III der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Alle Kinasen dieser Gruppe, zu denen auch der *colony stimulating factor* (CSF)-1 Rezeptor, *platelet-derived growth factor receptor* α , β (PDGFR α , β), *macrophage colony stimulating factor receptor* (FMS) und *stem cell factor receptor* (KIT) zählen, zeichnen sich durch gemeinsame Merkmale aus (Rosnet, 1996; Spiekermann, 2005). Sie besitzen jeweils extrazellulär einen Bereich, der aus fünf immunglobulinartigen Domänen besteht, einen transmembranösen Bereich, dem sich intrazellulär die sogenannte juxtamembranöse Domäne anschließt und eine geteilte Kinase-Domäne (*split-kinase*), die durch eine kurze Sequenz voneinander getrennt werden. Der Rezeptor endet mit der carboxyterminalen Domäne (Kottaridis, 2003).



Abbildung 1.5: Der FLT3-Rezeptor : Ig: Immunglobulin-Domäne; TM: Transmembranöse Region; JM: juxtamembranöse Domäne; TK 1, 2: Tyrosinkinasedomänen 1 und 2 (Reilly, 2002)

1.6 Der FLT3-Ligand

Der FLT3-Ligand (FL) ist ein transmembranöses Protein und kann auch in löslicher, homodimerer Form vorkommen. Fast jedes Gewebe, welches bis zum heutigen Zeitpunkt untersucht wurde, exprimiert FL, so dass seine Funktion nur dort zum Tragen kommt, wo auch der Rezeptor exprimiert wird, d.h. vorwiegend in hämatopoetischen und neuronalen Zellen (Levis, 2003). Beide Formen des Liganden können den Rezeptor aktivieren und führen zum Wachstum der Vorläuferzellen sowohl im Knochenmark als auch im Blut. Dazu sind jedoch auch verschiedene Interleukine und Wachstumsfaktoren notwendig (Gilliland, 2002), so etwa IL-3, IL-6, IL-11, IL-12 und G-CSF, GM-CSF, *macrophag colony stimulating factor* (M-CSF) (Scheijen, 2002). FL reduziert aber auch die Apoptoserate bei Zellen, die FLT3 exprimieren, besonders natürlich bei leukämischen Zellen (Kiyoi, 2002), und ist in einer großen Anzahl in leukämischen Zelllinien vorzufinden. Diese beiden Faktoren

lassen vermuten, dass der Ligand an sich auch eine wichtige Rolle bei der Manifestation der aktivierenden Mutationen im FLT3-Rezeptor spielt (Levis, 2003).

Dendritische Zellen spielen bei der Antigenpräsentation und somit auch bei einer möglichen Antitumorreaktion eine Rolle. Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass FL die Anzahl jener Zellen erhöht, die auf ihrer Oberfläche MHC, CD11c und CD86 tragen. Solche Oberflächenmarker sind auch auf dendritischen Zellen vorzufinden. Somit kann FL als Antitumoragens wirksam sein. In der AML jedoch führt es eher zu einer gesteigerten Proliferation von leukämischen Blasten (Gilliland, 2002).

1.7 Aktivierung und Signaltransduktion

Rezeptortyrosinkinasen besitzen autoinhibierende Domänen, die dafür zuständig sind, dass der Rezeptor eine inaktive Konformation beibehält. Dazu gehören die Aktivierungsschleife und die juxtamembranöse Domäne.

Die Aktivierungsschleife ist eine charakteristische Komponente aller Kinasen. Ihre Funktion besteht darin, den Zugang von Adenosintriphosphat (ATP) in die Kinase-Domäne zu blockieren. Dadurch kommt es zu einer Autoinhibition. Wenn der Ligand an den Rezeptor bindet, bewirkt das die Di- bzw. Oligomerisation des Rezeptors mit konsekutiver Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste im Rezeptor und vor allem in der Aktivierungsschleife. Diese nimmt eine Konfiguration ein, die erlaubt, dass ATP an die Kinase-Domäne binden kann (Abb.1.7).

Die juxtamembranöse Domäne sorgt mit ihrer helikalen Struktur dafür, dass der Rezeptor in seiner inaktiven Form verbleibt. Findet hier eine Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste statt, wird die Kinasen-Domäne aktiviert (Gilliland, 2002). Dadurch werden weitere Tyrosinreste phosphoryliert, auch transphosphoryliert (Reilly, 2002), an denen zytoplasmatische Signalproteine andocken können, was zur Folge hat, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Solche Signalwege führen dann zur Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen über die Aktivierung von z. B. *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) und *mitogen activated protein kinase* (MAPK).

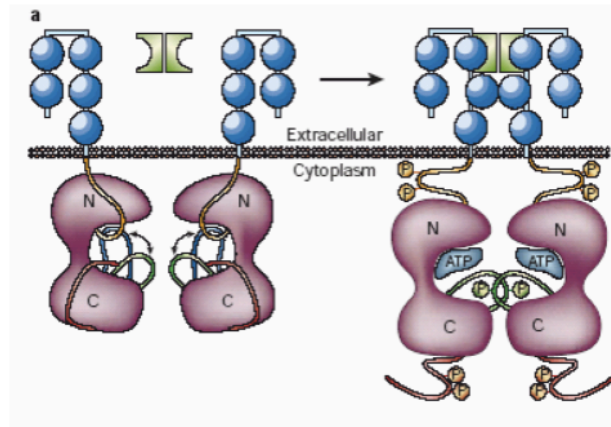


Abbildung 1.7: Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Links: inaktive Form. Rechts: Liganden induzierte Dimerisierung und Autophosphorylierung (Schesl, 2005)

1.8 Expression von FLT3

FLT3 wird von einer Vielfalt hämatopoetischer Vorläuferzellen exprimiert, sowohl von myeloischen als auch von B-lymphoiden Vorläuferzellen.

Ein Beispiel dafür sind CD34+-Zellen. In der akuten myeloischen Leukämie liegt der Anteil der FLT3 exprimierenden Blasten bei 70-100%. Aber auch in der akuten lymphatischen sowie in der chronisch myeloischen Leukämie während eines Blastenschubs kann man FLT3 nachweisen (Gilliland, 2002). Es wurde belegt, dass eine Stimulation von FLT3 durch seinen Liganden FL ein anti-apoptotisches und proliferatives Signal in primären Blasten induziert und somit für die Leukämogenese äußerst wichtig ist (Spiekermann, 2005).

Weiterhin kommt FLT3 auch in der Plazenta, in den Gonaden, im Gehirn, im Thymus und in den Lymphknoten vor (Tse, 2000; Gale, 2003).

1.9 FLT3-Mutationen

1.9.1 Häufigkeit der Mutationen

Das FLT3-Gen ist mit einem Anteil von 30% an allen Mutationen in der AML, eines der häufigsten betroffenen Gene (Gilliland, 2002). Zu weiteren 30% beobachtet man

Mutationen im Nucleophosmin (NPM)-Gen (Falini, 2005). Ebenfalls treten vermehrt Mutationen im ras-Gen mit einem Anteil von 20%, im MLL-Gen mit einem Anteil von 11% und im p53-Gen mit einem Anteil von 5-10% auf (Kiyoi, 2002; Levis, 2003).

1.9.2 FLT3-LM (Längenmutation)

Nakao und seine Arbeitsgruppe hat 1996 zum ersten Mal über FLT3-LM in der juxtamembranösen Domäne berichtet (Nakao, 1996). Der Aufbau dieses Bereiches wird neuerdings durch die Charakterisierung der kristallinen Struktur des inaktivierten FLT3-Rezeptors näher definiert (Abb 2.9.2). Er besteht aus drei Komponenten, nämlich dem *JM binding motif* (JM-B), dem *JM switch motif* (JM-S) und dem *JM zipper motif* (JM-Z).

JM-B (Y572-M578) ist nahezu komplett in der FLT3-Struktur verborgen. Es entfaltet seine autoinhibierende Funktion, indem es verhindert, dass das amino-terminale Ende (N-terminal) des Rezeptors sich in Richtung des carboxy-terminalen Endes (C-Terminal) dreht. Denn wenn dies geschieht, nimmt die Kinasedomäne ihre aktive Konformation ein.

JM-S (V579-V592) sorgt für die korrekte Positionierung von JM-B in der FLT3-Struktur. Außerdem enthält es zwei wichtige Tyrosinreste, Y589 und Y591, welche die Aktivierung des Rezeptors induzieren.

Die FLT3-LM finden sich vorwiegend im JM-Z-Segment (D593-W603). Folge der Mutationen in diesem Bereich kann ein falsch positioniertes JM-S-Segment und somit auch ein JM-B-Segment sein, wobei der Rezeptor nachfolgend aktiviert wird (Griffith, 2004; Reindl, 2006).

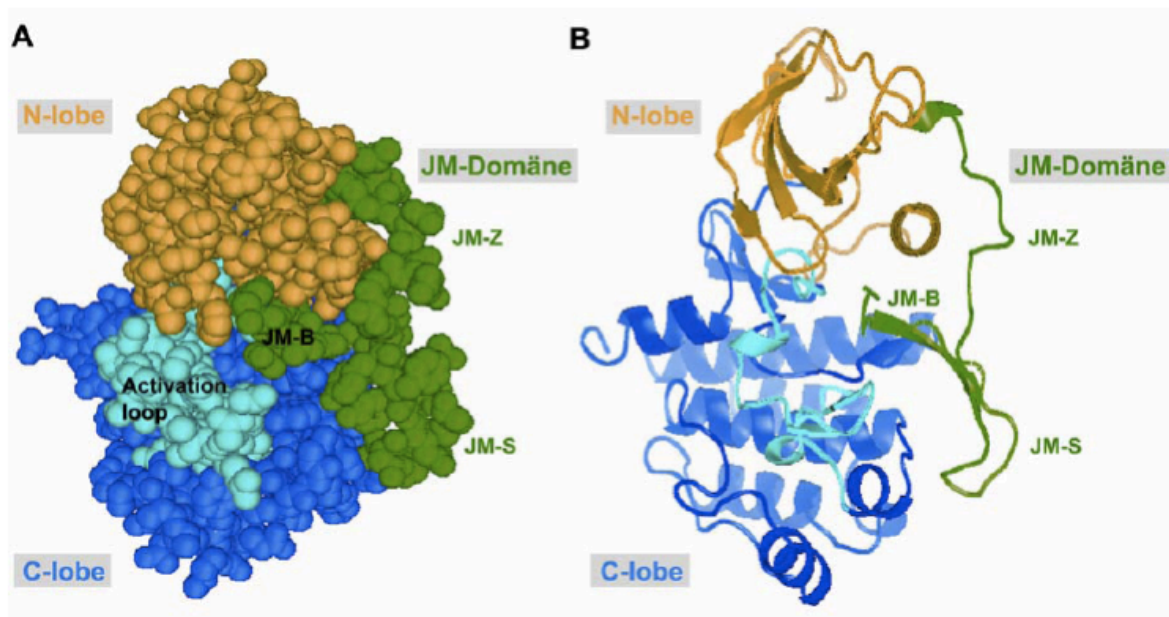


Abbildung 2.9.2: Die Kristallstruktur der inaktiven intrazellulären Region des FLT3 Rezeptors, *Space fill* (A) und *Ribbon* (B)

Die Längenmutationen sind meist Duplikationen. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass der Leserahmen immer erhalten bleibt. Die Länge variiert im Allgemeinen zwischen 6 und 204 inserierten Basenpaaren (Kottaridis, 2003; Reindl, 2006), wobei diese ebenso wie die genaue Lokalisation wahrscheinlich nichts mit dem Grad der Aktivierung zu tun haben (Levis, 2003). Oftmals kommt es neben der reinen Duplikation zur Insertion von zusätzlichen Nukleotiden (Schnittger, 2002).

FLT3-Längenmutationen finden sich in leukämischen Blasten von ungefähr 20-30% aller Patienten mit einer AML (Spiekermann, 2005). Etwas seltener, nämlich bei ca. 10-15%, lassen sie sich bei am myelodysplastischen Syndrom erkrankten Personen feststellen (Horiike 1997; Kiyoi, 1998 Vempati, 2007). Ein ähnlicher Prozentsatz gilt für die Patienten mit einer ALL.

Weiterhin treten diese Mutationen auch bei sekundärer AML auf und sind höchstwahrscheinlich mit einer Progression oder einem Rezidiv verbunden. Vor allem ältere Erkrankte sind davon betroffen (Gilliland, 2002). Kinder dagegen zeigen lediglich eine Inzidenz von ca. 12% (Kottaridis, 2003; Levis, 2003). Dabei scheint die zunehmende genetische Instabilität im Alter eine Rolle zu spielen (Kiyoi, 2002).

1.9.3 Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne (FLT3-TKD)

Diese Mutationen findet man vor allem an der Position Asp835. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um Substitutionen von Tyrosin oder Histidin, aber auch von Valin, Glutamin und Asparagin. Außerdem kann es zu Deletionen von Kodon 836 und zu Punktmutationen, kurzen Insertionen oder aber auch zu Deletionen von Kodon 842 kommen. Beschrieben wurde diese Art von Mutationen bei ca. 6-7% der Patienten mit einer AML, sie sind also insgesamt seltener als die FLT3-LM und treten unabhängig von ihr auf (Reilly, 2003).

1.9.4 Punktmutationen in der juxtamembranösen Domäne

Kürzlich wurden weitere aktivierende Mutation in der juxtamembranösen Domäne charakterisiert (Reindl, 2006; Stirewald, 2006). Es handelt sich hierbei um Punktmutationen in den Positionen 579, 590, 591, 592 und 594 und findet sich bei 2% der untersuchten Patienten.

1.9.5 Mutation in der katalytischen Domäne

Zwischen den Aminosäuren 840 und 841 kann es zu einer Insertion von sechs Nukleotiden kommen. Diese Mutation wurde von unserer Arbeitsgruppe bei nur bisher zwei Patienten mit AML beschrieben und führt auch zu einer Aktivierung des FLT3-Rezeptors (Spiekermann, 2002).

Allen Mutationen gemeinsam ist, dass der FLT3-Rezeptor aktiviert wird. Näher untersucht wurde dies insbesondere bei FLT3-LM und Mutationen der FLT3-TKD. Hier findet eine ligandenunabhängige Oligo- bzw. Dimerisation und nachfolgend eine Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors, sowie in vitro ein faktorunabhängiges Wachstum von IL-3-abhängigen Zelllinien statt (Spiekermann, 2005).

Nicht alle Mutationen haben aber dasselbe transformierende Potenzial. Punktmutationen in der juxtamembranösen Domäne haben z. B. im Vergleich zu FLT3-LM und Mutationen in der FLT3-TKD einen geringeren Effekt auf die Autophosphorylierung des Rezeptors (Reindl, 2006). Trotz dieser Tatsache kommt es zur Aktivierung verschiedener mitogener Signalkaskaden wie der RAS-RAF (RAS

aktivierbarer Faktor)-MAPK (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase) und der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-AKT (Proteinkinase B) -Signalkaskade. Im Gegensatz zum FLT3-Wildtyp wird nur von LM/TKD-Mutanten zusätzlich STAT 5 aktiviert, welches ein wichtiges Zielgen unterschiedlicher onkogener Phosphotyrosinkinase (z.B. TEL-JAK, TEL-ABL und BCR-ABL) darstellt.

1.9.6 Das 2-hit Modell

Versuche in einem Knochenmarkstransplantations(KMT)-Modell bei Mäusen konnten zeigen, dass sowohl Längenpolymorphismen in der juxtamembranösen Domäne als auch Substitutionen in der Aktivierungsschleife, sogenannte Klasse I-Mutationen, zu einem myeloproliferativen Phänotyp führen. Damit es jedoch zur vollen Ausprägung einer AML kommt, sind meist noch zusätzliche Mutationen notwendig.

Diese Klasse II-Mutationen sind meistens Fusionsgene, die durch Translokationen wie z.B. t(8;21), t(15;17), Inversionen wie inv(16) und anderen Genrearrangements entstehen. Zu dem vorhergenannten myeloproliferativen Phänotypen kommt nun hinzu, dass die Zellen nicht mehr ausdifferenzieren, d.h. es entwickelt sich das Vollbild einer AML.

Neuere Studien führen zur Annahme, dass FLT3-LM eventuell auch selbst zu Differenzierungsstörungen führen können (Gale, 2003; Reilly, 2003).

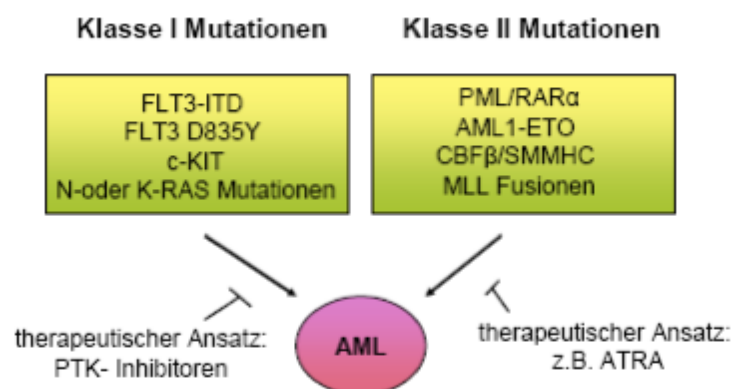


Abbildung 1.9.6: Modell der Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (Gilliland und Griffin, 2002)

2. Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahrzehnten wurden enorme Bemühungen angestellt, pathogenetische Ursachen für die Entstehung maligner Erkrankungen ausfindig zu machen. Die Entdeckung von Duplikationen in der juxtamembranösen Domäne des FLT-3 (fms-like tyrosine kinase 3) Rezeptors in hämatopoetischen Zellen, zuerst beschrieben von Nakao und seiner Arbeitsgruppe (Nakao, 1996), war ein entscheidender Schritt in diesem Prozess. Der FLT-3 Rezeptor, eine Rezeptortyrosinkinase vom Typ III, spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und ist zeitgleich der am häufigsten von Mutationen betroffene Rezeptor in der akuten myeloischen Leukämie. Bei insgesamt 20-30% der Patienten mit einer AML ist eine konstitutiv aktivierte Form des Rezeptors nachweisbar, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Auch Patienten mit einem myelodysplastischen Syndrom oder einer akuten lymphatischen Leukämie sind betroffen, insgesamt jedoch seltener (10-15%).

Schon früh wurde klar, dass es sich dabei um sehr heterogene Mutationen handelte. Ziel dieser Arbeit ist es bei einer großen Anzahl von Patienten die Mutation näher zu charakterisieren, d.h. Unterschiede und Gemeinsamkeiten hinsichtlich Länge und Lokalisation in der juxtamembranösen Domäne zu erfassen. Eine wichtige Frage dabei ist es, ob bestimmte Bereiche des FLT3 Rezeptors oder gar einzelne Aminosäuren häufiger betroffen sind als andere und ob ein gemeinsames Motiv in den duplizierten Sequenzen vorherrscht mit dem Ziel den Pathomechanismus der Rezeptoraktivierung näher zu charakterisieren.

3. Material und Methoden

3.1 Patientendaten

In unserer Studie wurden Daten von 284 Patienten mit einer, entsprechend der FAB Klassifikation, diagnostizierten primären AML ausgewertet. Außerdem konnte bei allen Patienten eine FLT3-Längenmutation nachgewiesen werden. Diese Daten wurden im Labor für Leukämiediagnostik des Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München aus einem Kollektiv von insgesamt 1003 Patienten, im Zeitraum zwischen Juli 1997 und Dezember 2000, erhoben. Alle Patienten waren über 18 Jahre alt und erklärten sich, nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung, schriftlich damit einverstanden, bevor die Daten für wissenschaftliche Zwecke herangezogen wurden. Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki (Schnittger, 2002)

3.2 Zytogenetische Analyse

Die zytogenetische Analyse (G-Bandierung) erfolgte nach standardisierten Methoden und der Karyotyp jedes einzelnen Patienten nach der ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) beschrieben (Schnittger, 2002)

3.3 Isolierung von Nukleinsäuren

Die DNA wurde durch Fällung mit Hilfe von Salzen, sog. *salting out*, aus mononukleären Knochenmarks- oder peripheren Blutzellen nach Ficoll-Separation extrahiert. Aus demselben Sediment wurde Gesamt-RNA mit RNAeasy (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Dabei wurde die Anleitung des Herstellers stets befolgt (Schnittger, 2002).

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)/ Reverse Transkriptase (RT-)-PCR

Mit dem Ziel die FLT3- Mutation zu analysieren wurde genomische DNA, insbesondere die Bereiche von Exon11 bis Exon 12, einschließlich Intron 11, mit Hilfe von Primer durch die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. RNA wurde revers transkribiert und resultierte cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (Einzelheiten siehe Schnittger, 2002). Diese amplifizierte Fragmente wurden auf Agarose Gele näher analysiert.

3.5 Semiquantitative Analyse der Mutationen

Die Analyse der amplifizierten Fragmente ergab, dass die Mutation repräsentierenden Banden nicht von gleicher Intensität waren wie das Wildtyp-Allel (Schnittger, 2002). Densitometrischen Messungen von Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen wurden mit Hilfe der gelpro32 Software (INTAS, Göttingen) durchgeführt. Daraufhin wurden die FLT3- Längenmutationen in 5 Gruppen eingeteilt: 1) mutierte Fragmente mit geringerer Intensität als das Wildtyp-Allel; 2) mutierte Fragmente mit ähnlicher Intensität; 3) mutierte Fragmente mit höherer Intensität als das Wildtyp-Allel; 4) mutierte Fragmente mit Verlust des Wildtyp-Allels und 5) Nachweis von mehr als einem mutierten Fragment.

3.6 Sequenzierung

Alle PCR Produkte die größer als das Wildtyp- Allel waren, wurden von Schnittger und Ihrer Arbeitsgruppe sequenziert und anschließend analysiert (Schnittger, 2002).

3.7 Elektronische Datenverarbeitung/Software

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| - Adobe Illustrator 9.0 | (Adobe Systems, Unterschleißheim) |
| - BioEdit 7.0 | (ISIS Pharmaceutica, Carlsbad, USA) |
| - Microsoft Office | (Microsoft, Redmond, WA, USA) |
| - SigmaPlot 10.0 | (SPSS Incorporated, Chicago, USA) |
| - SPSS 14.0 | (SPSS Incorporated, Chicago, USA) |

4. Ergebnisse

4.1 Demographische und klinische Daten der Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FLT3-LM bei insgesamt 284 Patienten mit primärer AML näher charakterisiert. Davon konnten zu 274 Personen klinische Daten eruiert werden (siehe Abbildung 4.1). Der jüngste Patient hatte zum Zeitpunkt der Datenerhebung ein Alter von 18, der älteste war 89 Jahre alt. Der Median betrug 60,5. Die Hälfte der in der Studie berücksichtigten Menschen, d.h. 137, hatte somit ein Alter von <60.

Es wurden Daten sowohl von Männern als auch von Frauen zur Auswertung herangezogen, wobei der Anteil der Angaben der weiblichen Patienten mit 56,5% (155 Patientinnen) gegenüber dem Anteil des Datenmaterials von männlichen Patienten, das 43,5% (119 Patienten) ausmachte, überwog.

Ausgewertet wurden verschiedene klinische Daten der Patienten, wie der FAB Subtyp, die Leukozyten- und Thrombozytenzahl zum Zeitpunkt der Diagnose und der Karyotyp.

Der am häufigsten vorliegende Subtyp war M1 (akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung) mit 22,9% (63 Patienten). Mit 17,8% (49 Patienten) folgte der Subtyp M2 (akute myeloische Leukämie mit Ausreifung), anschließend mit 14,2% (39 Patienten) der Subtyp M4 (akute myelomonozytäre Leukämie) und mit 10,2% (28 Patienten) der Subtyp M3 (akute Promyelozytenleukämie). Alle anderen Subtypen waren seltener repräsentiert (<10%). Der Anteil der Personen, die einem bestimmten FAB-Subtypen nicht zugeordnet werden konnten, lag bei 18,9% (52 Patienten).

Im Zuge der Diagnosestellung wurde die Leukozyten- und Thrombozytenzahl eines jeden Patienten bestimmt. Die Leukozytenzahl variierte zwischen 12.000 und 675.000, bei den Thrombozyten ließ sich eine Spannweite von 48.000 bis 596.000 feststellen.

Anhand des Karyotyps wurden die Patienten in drei prognostische Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung ergab Folgendes: 64,2% der Untersuchten hatten einen normalen Karyotyp, 35,7% zeigten eine Abnormalität in ihrer Zytogenetik. Patienten

mit Mutationen wie z. B. t(8;21), t(15;17), inv(16) haben eine günstige Prognose. Insgesamt 10,5% (29 Patienten) konnten dieser Gruppe zugeordnet werden.

Eine ungünstige Prognose besitzen Patienten mit Mutationen wie z. B. -7; -5; del(5q) 3q, sowie einen komplexen Karyotyp. Diese machten in der vorliegenden Untersuchung insgesamt 1,4% aus.

Patienten mit intermediärer Prognose haben entweder einen normalen Karyotyp, oder sie weisen Mutationen auf, die nicht zu den vorher genannten gehören. 67,5% (185 Patienten) ließen sich dieser Gruppe zuordnen. Bei 17,8% der Fälle war der Karyotyp unbekannt.

Alter	Median	60,5	Prozent der Patienten (abgerundet)
	Spannweite	18-89	
	<60 Jahre	137	
Geschlecht	Weiblich	155	56,5
	Männlich	119	43,4
FAB Subtyp	AUL	2	0,7
	Biphänotypisch	3	1
	ALL	4	1,4
	M0	6	2,1
	M1	63	22,9
	M2	49	17,8
	M3	28	10,2
	M4	39	14,2
	M5	21	7,6
	M6	4	1,4
	MDS	3	1
	Unbekannt	52	18,9
	Leukozytenzahl	Median	5.000
Spannweite		12.000-675.000	
> 10.500		201	73,3
Thrombozytenzahl	Median	56.000	
	Spannweite	48.000-596.000	
Prognose	günstig	29	10,5
	intermediär	185	67,5
	ungünstig	11	4
	unbekannt	49	17,8
Zytogenetik	normaler Karyotyp	176	64,2
	t(15;17)	28	10
	komplex	4	1,4
	t(8;21)	1	0,3

Tabelle 4.1: Demographische und klinische Daten der Patienten

4.2 Charakterisierung der FLT3-LM

4.2.1 Länge der inserierten Aminosäuren

Zunächst wurde bei jedem einzelnen Patienten die Wildtyp-FLT3-Sequenz (Wt-FLT3) mit seiner FLT3-Sequenz (cDNA) verglichen. Zu dieser Untersuchung wurden lediglich die 274 Patienten herangezogen, deren klinische Daten vorhanden waren (siehe dazu die Abbildungen 4.2.1a, b, c und 4.2.2 b, c).

Auffallend war die Heterogenität der Tandemduplikation im Hinblick auf Länge und genaue Lokalisation. Dennoch behielt jede Duplikation das Leseraster bei und die eingefügte Sequenz hatte stets die gleiche Orientierung zur Originalsequenz.

Die Anzahl der inserierten Aminosäuren erstreckte sich von zwei bis 42, mit einem Median von 17 Aminosäuren.

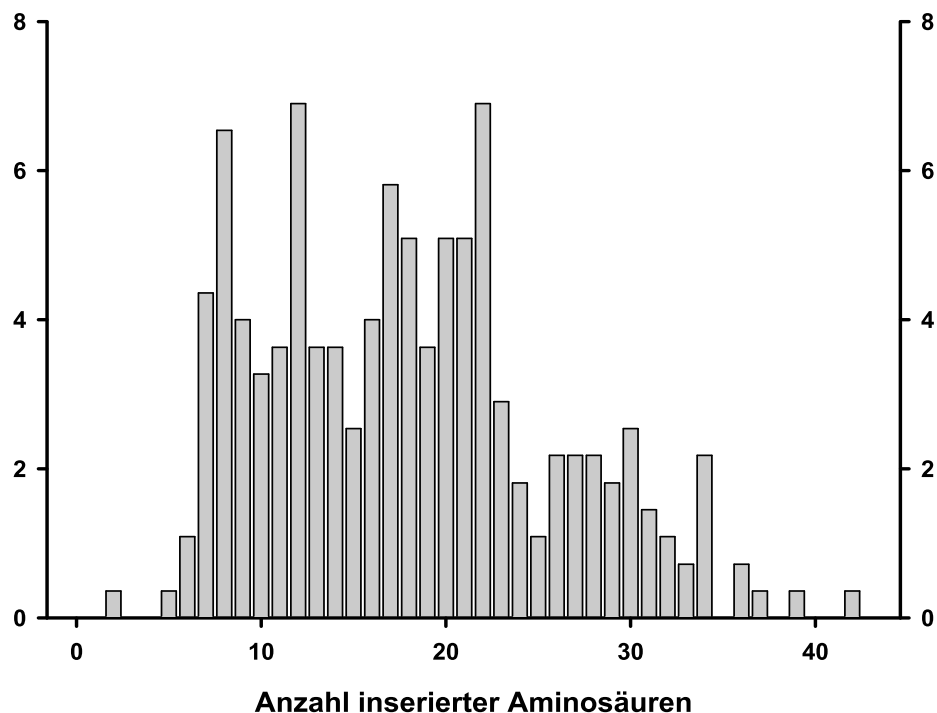


Abbildung 4.2.1a: Anzahl der inserierten Aminosäuren

Bei der Betrachtung der kumulativen Häufigkeit erkennt man, dass 30% der Patienten eine Insertion von bis zu zwölf und des Weiteren 50% der Patienten eine Insertion von bis zu 17 Aminosäuren aufwiesen. 80% des Gesamtkollektivs besaß eine Tandemduplikation, die kleiner als 24 Aminosäuren lang war.

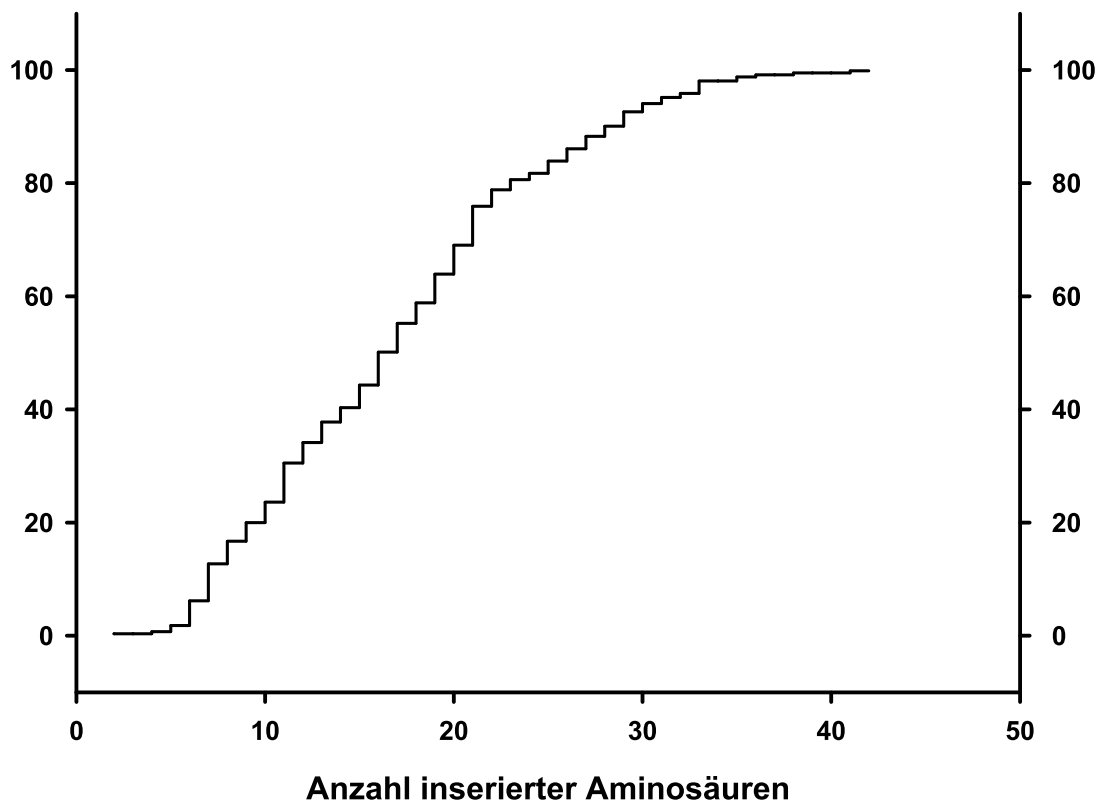


Abbildung 4.2.1b: kumulative Häufigkeit inserierter Aminosäuren

Wichtig hierbei ist, dass nur bei 78 Patienten (28,5%) eine reine Duplikation der Sequenz nachweisbar war. Bei den übrigen 196 Patienten (71,5%) traten zusätzlich zur Duplikation Nukleotide bzw. Aminosäuren unbekanntem Ursprungs vor der Tandemduplikation auf.

Wie aus der Abbildung 4.2.1c ersichtlich ist, erstreckte sich die Anzahl zusätzlicher Nukleotide von einem einzelnen Nukleotid bei 31,1% der Fälle (61 Patienten) bis zu 28 Nukleotiden, wobei dieser Fall nur bei nur einem einzigen Patienten zu beobachten war.

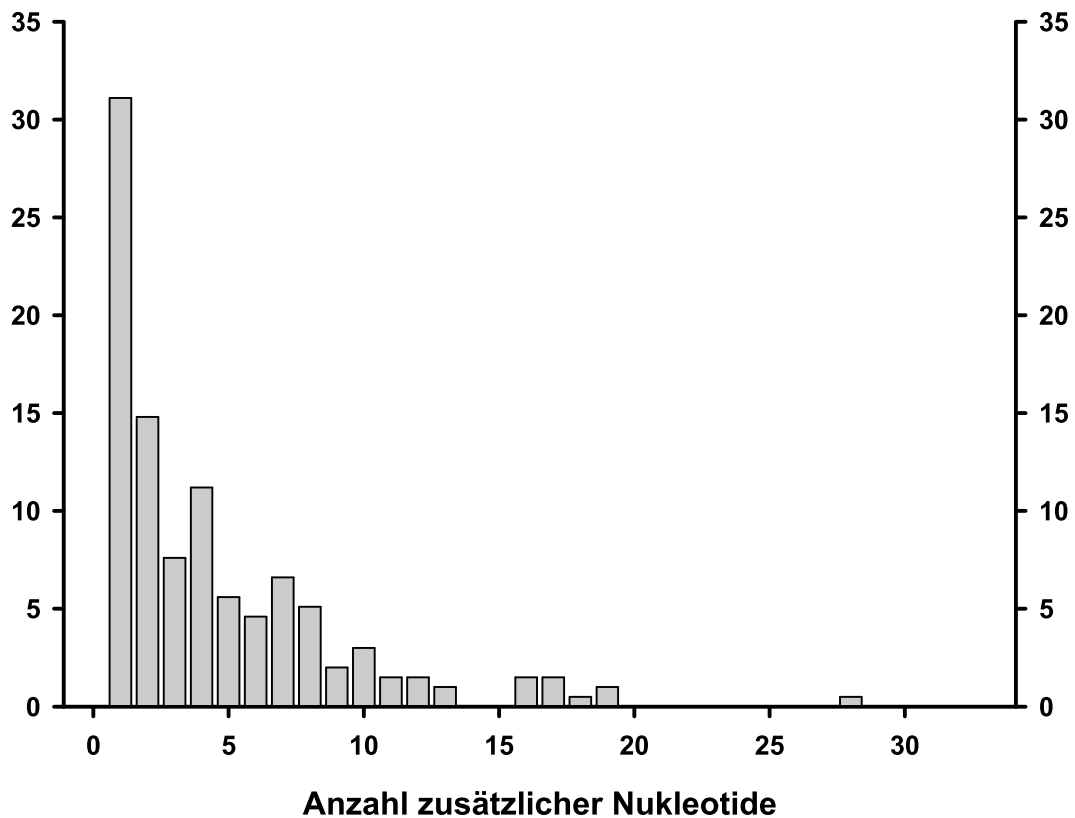


Abbildung 4.2.1c: FLT3-LM mit zusätzlichen Insertionen

Die nachfolgenden Beispiele sollen verschiedene Manifestationen der Mutation im FLT3-Rezeptor verdeutlichen. Alle ausgesuchten Fälle betreffen die Proteinsequenz zwischen V581 und W601 des FLT3 Rezeptors (**fett**)

Ausschnitt der cDNA Sequenz des FLT3 Rezeptors kodierend für die Aminosäuren R571-Y630:

1711	AGG	TAT	GAA	AGC	CAG	CTA	CAG	ATG	GTA	CAG	GTG	ACC	GGC	TCC	TCA	1755
571	R	Y	E	S	Q	L	Q	M	V	Q	V	T	G	S	S	585
1756	GAT	AAT	GAG	TAC	TTC	TAC	GTT	GAT	TTC	AGA	GAA	TAT	GAA	TAT	GAT	1800
586	D	N	E	Y	F	Y	V	D	F	R	E	Y	E	Y	D	600
1801	CTC	AAA	TGG	GAG	TTT	CCA	AGA	GAA	AAT	TTA	GAG	TTT	GGG	AAG	GTA	1845
601	L	K	W	E	F	P	R	E	N	L	E	F	G	K	V	615
1846	CTA	GGA	TCA	GGT	GCT	TTT	GGA	AAA	GTG	ATG	AAC	GCA	ACA	GCT	TAT	1890
616	L	G	S	G	A	F	G	K	V	M	N	A	T	A	Y	630

a) Beispiel einer reinen Duplikation (unterstrichen) der FLT3-Sequenz von F594-W603:

1	TAC	GTT	GAT	TTC	AGA	GAA	TAT	GAA	TAT	GAT	CTC	AAA	TGG	<u>TTC</u>	<u>AGA</u>	45
1	Y	V	D	F	R	E	Y	E	Y	D	L	K	W	<u>F</u>	<u>R</u>	15
46	<u>GAA</u>	<u>TAT</u>	<u>GAA</u>	<u>TAT</u>	<u>GAT</u>	<u>CTC</u>	<u>AAA</u>	<u>TGG</u>	GAG	TTT	CCA					78
16	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>W</u>	E	F	P					26

b) Beispiel einer Duplikation der FLT3 Sequenz von G583-E596 mit einer zusätzlichen Insertion von sechs Nucleotiden, GGG GTC:

1	GTG	ACC	GGC	TCC	TCA	GAT	AAT	GAG	TAC	TTC	TAC	GTT	GAT	TTC	AGA	45
1	V	T	G	S	S	D	N	E	Y	F	Y	V	D	F	R	15
46	GAA	<u>GGG</u>	<u>GTC</u>	<u>GGC</u>	<u>TCC</u>	<u>TCA</u>	<u>GAT</u>	<u>AAT</u>	<u>GAG</u>	<u>TAC</u>	<u>TTC</u>	<u>TAC</u>	<u>GTT</u>	<u>GAT</u>	<u>TTC</u>	90
16	E	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	30
91	<u>AGA</u>	<u>GAA</u>	TAT	GAA	TAT	GAT										108
31	<u>R</u>	<u>E</u>	Y	E	Y	D										36

Hier wird veranschaulicht, dass die Insertion (*kursiv*) vor der duplizierten Sequenz (unterstrichen) stattfand. Es entstanden damit zwei neue Aminosäuren, nämlich Glycin (G) und Valin (V).

Ganz anders kann es sich bei einer Insertion von nur einem Nukleotid verhalten, wie das nächste Beispiel verdeutlichen soll.

c) Beispiel einer Duplikation von V581-Y597 mit einer zusätzlichen Insertion des Nukleotids Guanin (G):

1	GTG	ACC	GGC	TCC	TCA	GAT	AAT	GAG	TAC	TTC	TAC	GTT	GAT	TTC	AGA	45
1	V	T	G	S	S	D	N	E	Y	F	Y	V	D	F	R	15
46	GAA	TAT	GAG	<u>GTG</u>	<u>ACC</u>	<u>GGC</u>	<u>TCC</u>	<u>TCA</u>	<u>GAT</u>	<u>AAT</u>	<u>GAG</u>	<u>TAC</u>	<u>TTC</u>	<u>TAC</u>	<u>TAC</u>	90
16	E	Y	E	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	30
91	<u>GAT</u>	<u>TTC</u>	<u>AGA</u>	<u>GAA</u>	<u>TAT</u>	GAA	TAT	GAT								114
31	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	E	Y	D								38

Der Patient besaß eine Duplikation der Aminosäuren V581 bis einschließlich Y597 (entsprechen im Beispiel den Aminosäuren V19 bis Y35, unterstrichen). Zusätzlich zu den 17 Nucleotid-Triplets werden die zwei Nukleotide **G** und **A** der Aminosäure E598 (entspricht im Beispiel Aminosäure E36, in rot) mitdupliziert. Die zusätzliche Insertion eines einzigen Nukleotids vor der duplizierten Sequenz (Guanin, **G**) vervollständigt das Triplet. Das Leseraster wird somit, trotz Insertion eines Nukleotids, beibehalten. Vor der duplizierten Sequenz entsteht in diesem Fall keine neue Aminosäure da sowohl die Nukleotide GAG als auch GAA für die Aminosäure Glutamat (E) kodieren. Von der anderen Seite kann ein zusätzliches Nukleotid dazu führen, dass vor der duplizierten Sequenz eine neue Aminosäure entsteht. Dies wird anhand des nächsten Beispiels gezeigt.

d) Beispiel einer Duplikation von R595-W603 mit einer zusätzlichen Insertion des Nukleotids Cytosin (C):

1	TAC	GTT	GAT	TTC	AGA	GAA	TAT	GAA	TAT	GAT	CTC	AAA	TGG	GAC	<u>AGA</u>	45
1	Y	V	D	F	R	E	Y	E	Y	D	L	K	W	D	<u>R</u>	15
46	<u>GAA</u>	<u>TAT</u>	<u>GAA</u>	<u>TAT</u>	<u>GAT</u>	<u>CTC</u>	<u>AAA</u>	<u>TGG</u>	GAG	TTT	CCA	AGA	GAA	AAT	TTA	90
16	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>W</u>	E	F	P	R	E	N	L	30
91	GAG	TTT	GGG	AAG	GTA	CTA										108
31	E	F	G	K	V	L										35

Bei dem Patienten konnte man eine Duplikation von Aminosäure R595 bis einschließlich W603 (entsprechen im Beispiel den Aminosäuren R15 bis W23, unterstrichen). Außer diesen Tripletts wurden die Nukleotide **G** und **A** der Aminosäuren E604(entspricht im obigen Beispiel E24) mitdupliziert. Hier entstand im Gegensatz zum vorigen Beispiel durch die zusätzliche Insertion eines Nukleotids, hier Cytosin (**C**), und der damit verbundenen minimalen Änderung in der Zusammensetzung der Nukleotide (**GAC** statt **GAG**) eine neue Aminosäure, nämlich Aspartat (**D**) statt Glutamat (**E**).

Ab drei zusätzlich inserierten Nukleotiden entstanden regelmäßig neue Aminosäuren, die immer vor der eigentlich duplizierten Sequenz auftraten.

Nur vereinzelt besaßen unterschiedliche Patienten eine identische Tandemduplikation (im folgenden Beispiel unterstrichen) mit zusätzlich identischer Insertion vor der Duplikation (*kursiv*):

Anzahl der Patienten	Duplizierte Sequenz	Anzahl Aminosäuren
5	<u>DYVDFREY</u>	8
2	<u>SQGDFYVDFRE</u>	11
2	<u>LDQVTGSSDNEY</u>	12

Andere Patienten trugen eine identische Tandemduplikation, doch die zusätzlich inserierten Nukleotide oder Aminosäuren vor dieser Sequenz waren ungleich. Dies wird im folgenden Beispiel *kursiv* dargestellt:

Patient 1: LQVTGSSDNEYFYVDFREYE (20 Aminosäuren)

Patient 2: XQVTGSSDNEYFYVDFREYE (20 Aminosäuren)

Wie bereits oben angeführt, besaßen nur 28,46% der Fälle (78 Patienten) eine reine Duplikation. Die duplizierte Sequenz differierte von Patient zu Patient und nur bei näherer Betrachtung konnten einzelne Patienten identifiziert werden welche eine identische Duplikation hatten:

Anzahl Patienten	Duplizierte Sequenz	Anzahl Aminosäuren
3	REYEYDL	7
2	DNEYFYVDFR	10
2	GSSDNEYFYVDFR	13
2	EYDLKWEFPRENLEF	15
2	VTGSSDNEYFYVDFREYE	18
4	DFREYEYDLKWEFPRENLEF	20

4.2.2 Lokalisation der Duplikation

Die FLT3-Längenmutation ist bekanntermaßen in der juxtamembranösen Domäne des FLT3-Rezeptors lokalisiert. Diese Domäne besteht aus drei Bereichen, JM-B, JM-S und JM-Z, welche sehr wichtig für die Stabilität der FLT3-Struktur sind. Eine geringfügige Alternation in der Sequenz führt zu Konformationsänderungen im Molekül und zur konsekutiven Aktivierung des Rezeptors. Nach der juxtamembranösen Domäne folgt die Kinase-Domäne, wie aus der Abbildung 4.2.2a ersichtlich ist.

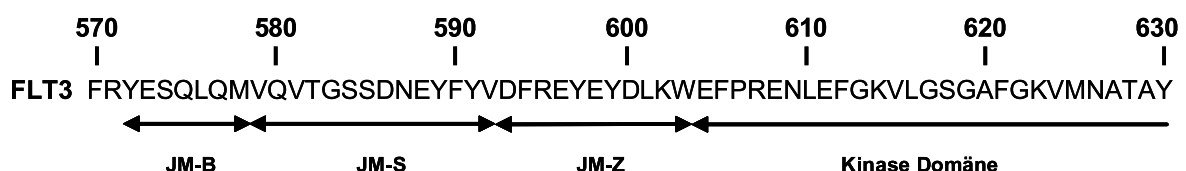


Abbildung 4.2.2a: Ausschnitt aus der Protein-Sequenz des FLT3-Rezeptors

Die Lokalisation der Tandemduplikation wurde bei jedem einzelnen Patienten näher untersucht. Dabei ergab sich, dass die Stelle der Insertion von Fall zu Fall wechselte. Das Gebiet, in dem Insertionen stattfanden, erstreckte sich über einen großen Teil der juxtamembranösen Domäne und reichte auch in die Kinase-Domäne hinein. In unserem Patientengut begannen die Insertionen an Position Y589 und endeten an Position G622.

Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit der Protein-Sequenz des FLT3-Rezeptors, erkennt man, dass im JM-B-Bereich keine Duplikation vorkam, dafür aber vereinzelt im JM-S-Bereich und noch wesentlich öfter im JM-Z-Bereich sowie in der Kinase-Domäne. Wie aus Abbildung 4.2.2b hervorgeht, gab es bestimmte Stellen in der Sequenz des Rezeptors, in denen häufiger eine Duplikation inseriert war.

Diese Stellen waren die Positionen R595, Y597, E598, L601 und des Weiteren die Positionen E612 und F613 in der Kinase-Domäne.

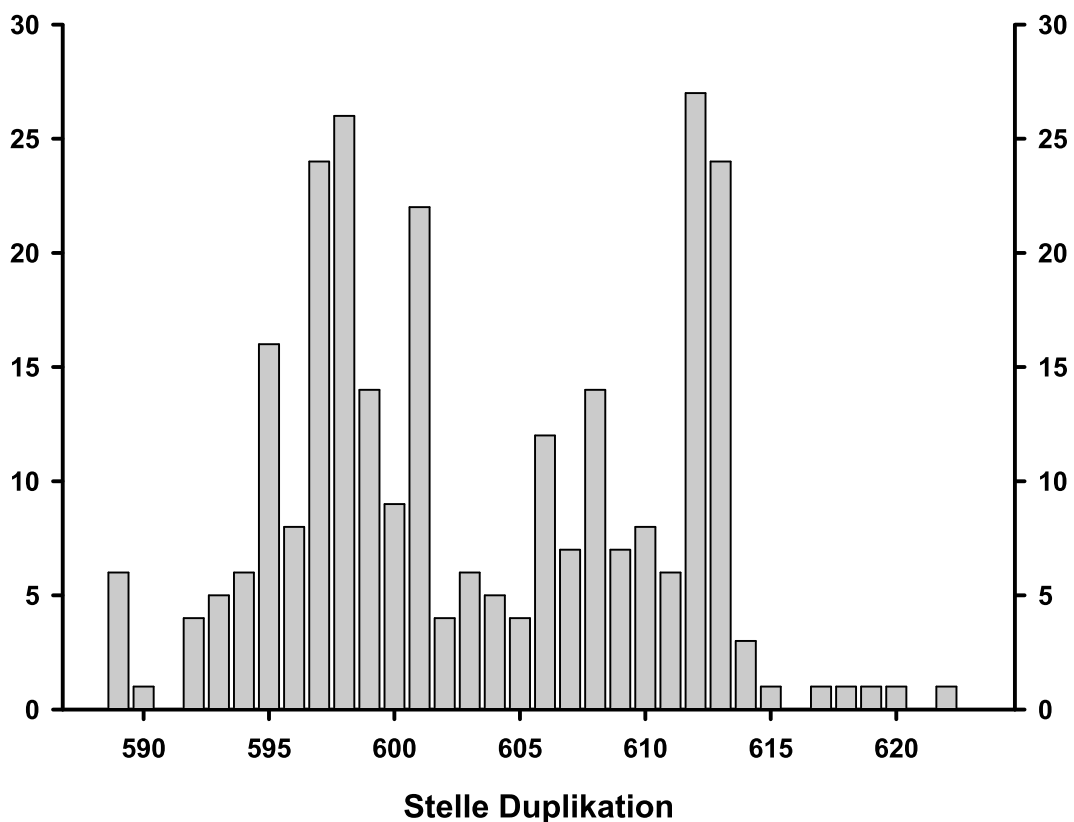


Abbildung 4.2.2b: Stelle der Duplikation

Wenn man die kumulative Häufigkeit mit einbezieht, bedeutet das, dass 55,1% der Patienten eine Insertion bis zur Position W603, dem Ende der juxtamembranösen

Domäne, aufwiesen. Bei den restlichen 44,9% der Personen lag die Tandemduplikation in der Kinase-Domäne. Wichtig hierbei ist, dass die Mutation immer Duplikationen der juxtamembranösen Domäne und nie der Kinase-Domäne waren, auch wenn sie dort inseriert waren.

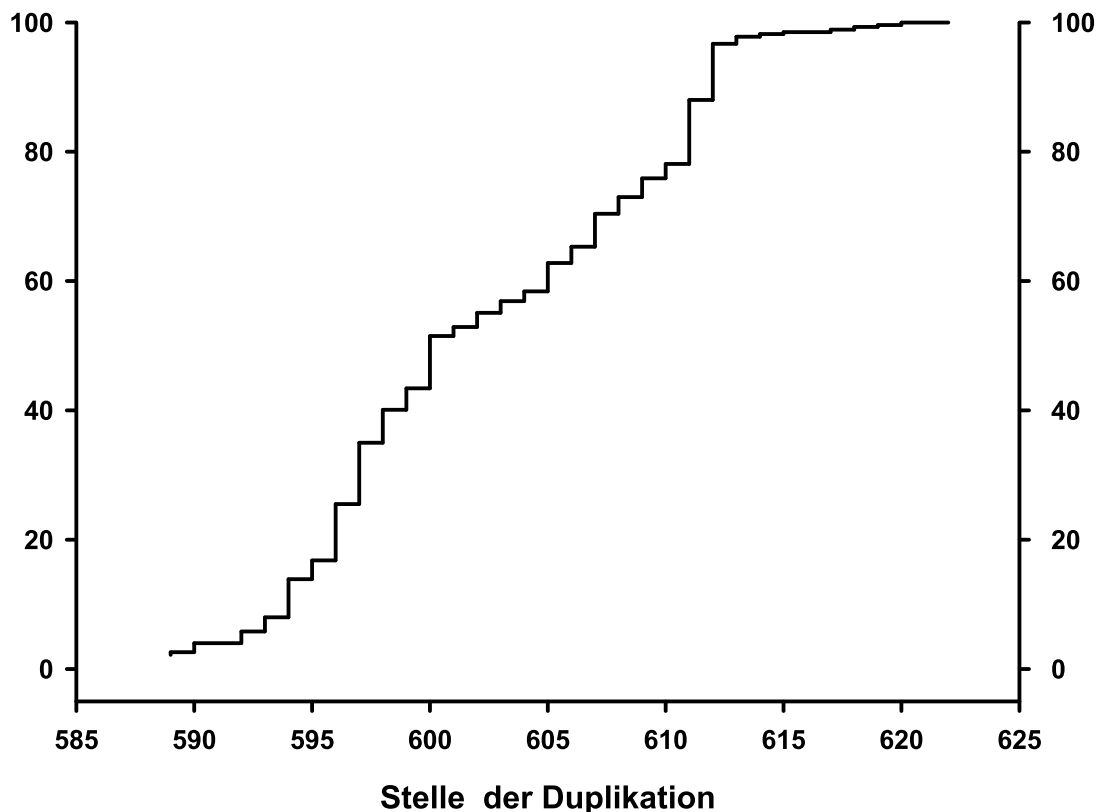


Abbildung 4.2.2c: Stelle der Duplikation

4.2.3 Zusammensetzung inserierter Aminosäuren

Die Heterogenität der Länge und der Lokalisation der FLT3-LM warf die Frage auf, ob es Gemeinsamkeiten in der duplizierten Sequenz gibt. Prof. Dr. Martin Dugas vom Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der Universität Münster untersuchte näher die duplizierten Sequenzen. Er untersuchte im Detail die Häufigkeit einzeln duplizierter Aminosäuren und stellte fest, dass die Aminosäure R595, die am häufigsten betroffene war. Anschließend wurden aufbauende Untersuchungen zur Häufigkeit von duplizierten Aminosäuren-Subsequenzen um die Aminosäure R595 gemacht. Alle Subsequenzen mit einer Länge von 1-30 Aminosäuren wurden aus der Datenlage extrahiert und anhand ihrer Häufigkeit in

der nachfolgenden Abbildung untereinander aufgeführt. Neben den verschiedenen Kombinationen ist deren Häufigkeit im Gesamtkollektiv von 284 Patienten aufgeführt (Vempati, 2007)

Erstaunlich ist, dass 77% der Personen eine Duplikation der Aminosäure Arginin (R) in Position 595 des JM-Z-Bereiches (s. u.) und 70% die Aminosäurekombinationen EY (E596-Y597) und REY (R595-Y597) aufwiesen.

Bis zu 52% der Untersuchten besaßen in ihrer Tandemduplikation die Sequenz VDFREY, 25% von ihnen die Sequenz GSSDNEYFYVDFREYE.

Auffällig war weiterhin, dass sich die meisten Aminosäurekombinationen aus der Aminosäure R595 und ihren Nachbaraminosäuren zusammensetzten.

Bei 95% der Probanden war zumindest eine der Aminosäuren im Bereich von Y591 bis Y599 (YVDFREYEY) dupliziert.

	QVTGSSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPREN	LEFGKVLGSG	% Patienten
1		R			77
2		EY			70
3		REY			70
4		FREY			63
5		DFREY			60
6		VDFREY			52
7	EY	FYVDF			48
8	EY	FYVDFR			46
9	DNEY	FYVDF			44
10	DNEY	FYVDFR			42
11	SDNEY	FYVDFR			38
12	SSDNEY	FYVDFR			36
13	SSDNEY	FYVDFRE			33
14	SSDNEY	FYVDFREY			32
15	GSSDNEY	FYVDFREY			28
16	GSSDNEY	FYVDFREYE			25
17	SSDNEY	FYVDFREYEY	D		19
18	NEY	FYVDFREYEY	DLKWE		16
19	EY	FYVDFREYEY	DLKWEFP		16
20	NEY	FYVDFREYEY	DLKWEFP		15
21	DNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFP		14
22	SDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFP		13
23	SSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFP		11
24	SDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPRE		10
25	SSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPRE		9
26	GSSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPRE		8
27	SSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPREN	L	6
28	GSSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPREN	L	5
29	GSSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPREN	LE	3
30	VTGSSDNEY	FYVDFREYEY	DLKWEFPREN	L	3

Abbildung 4.2.3a: Die häufigsten Aminosäurekombinationen

In der folgenden Grafik werden die Ergebnisse der Berechnung der Häufigkeit jeder einzelner Aminosäure in der duplizierten Sequenz dargestellt. Auch dort ist gut sichtbar, dass Arginin in Position 595 mit 77% die häufigste duplizierte Aminosäure ist, gefolgt von Y597 in 74% sowie F594 und E596 in 73% der Fälle. Je weiter die Nachbaraminosäuren von Position R595 entfernt sind, desto weniger sind sie betroffen. Zu insgesamt ca. 50% sind die Positionen D586 und L601 in der Tandemduplikation vorzufinden, die Aminosäuren T582 und L610 zu jeweils ungefähr 25%.

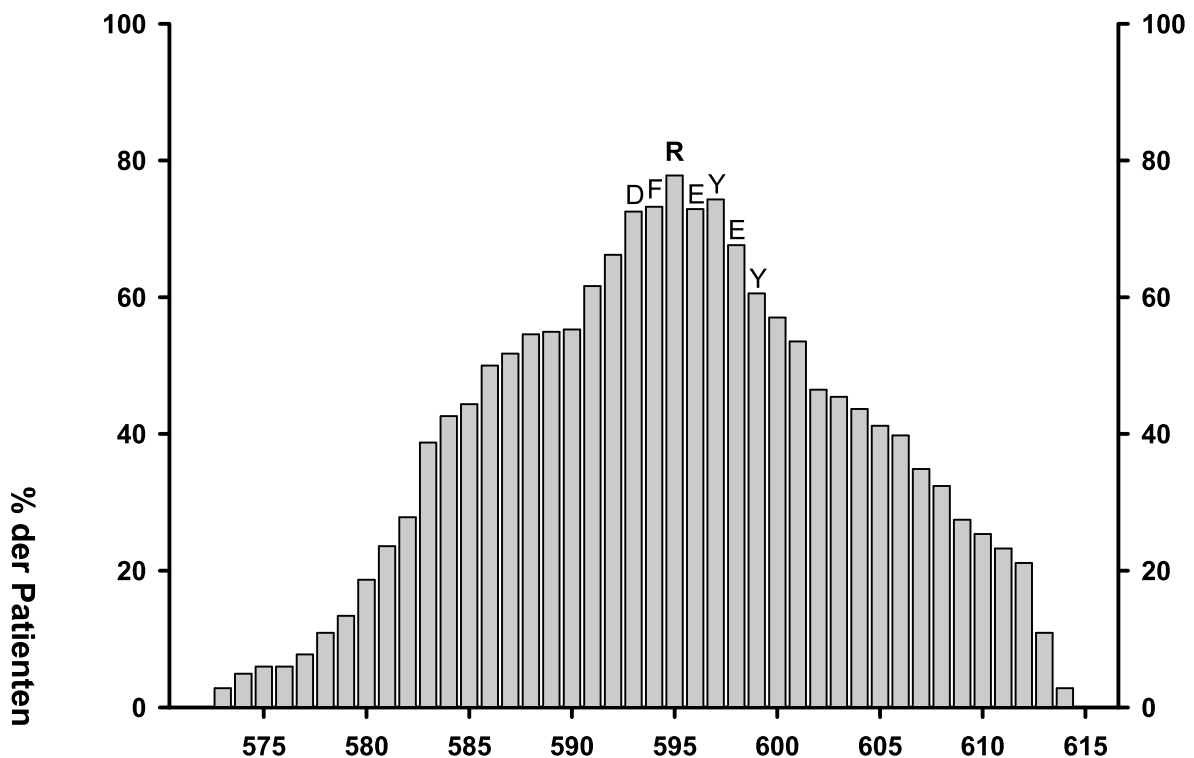


Abbildung 4.2.3b: Die am häufigsten duplizierten Aminosäuren

4.2.4 Die kürzeste inserierte Sequenz am Beispiel von 35 Patienten

Die oben angeführten Daten führten zu der Annahme, dass der tyrosinreiche Bereich von Y591 bis Y599 (YVDFREY EY) einen wichtigen Stellenwert im Transformationspotential der FLT3-Längenmutation einnimmt.

Um weitere Gemeinsamkeiten definieren zu können, wurden deshalb die kürzesten FLT3-Längenmutationen aus dem gesamten Patientengut (N=284) analysiert. Auf diese Weise wurden 30 Patienten ermittelt. Deren Untersuchung zeigte, dass die Tandemduplikationen aus zwei bis acht Aminosäuren bestanden und sich von Position D586 bis P606 erstreckten. Interessanterweise wies derjenige Patient mit der kürzesten Duplikation (2 AS) eine Duplikation von R595 auf, diejenige AS die bei der Analyse aller Patienten am häufigsten inseriert war (s. Abb. 4.2.4).

580	590	600	Anzahl AS
QVTGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN	
	RE		2
	FREYE		5
	REY EY D		6
	D YVDFR		6
	G DFREY		7
	H VDFREY		7
	YEY DLKW		7
	REY EY DL		7
	D VDFREY		7
	F DFREYE		7
	VDFREYE		7
	REY EY DL		7
	REY EY DL		7
	D VDFREY		7
	REY EY DL		7
	FREY EY D		7
	YEY DLKW		7
	Y DLKWEFP		8
	FREY EY DL		8
	EY DLKWEF		8
	YVDFREYE		8
	D YVDFREY		8
	N REY EY DL		8
	X YVDFREY		8
	D YVDFREY		8

Abbildung 4.2.4: Die kürzesten Sequenzen der FLT3-Duplikation

Der Patient mit der kürzesten Sequenz zeigte eine Insertion von R595 und E596. Bei insgesamt 21 Patienten (84%) war eine Duplikation des Arginins 595 feststellbar. Außerdem fiel auf, dass 23 Personen (92%) eine Längenmutation aufwiesen, die entweder Y597 oder Y599 des JM-Z-Bereiches beinhaltete. Bei zehn Untersuchten (40%) waren beide Tyrosinreste betroffen. Nur drei Patienten wiesen eine duplizierte Sequenz ohne diese beiden Tyrosinreste auf.

5. Diskussion

5.1 Häufigkeit der FLT3-LM

Nakao und seine Arbeitsgruppe beschrieben als Erste eine Duplikation in der juxtamembranösen Domäne des FLT3 Rezeptors in einem Kollektiv von 80 Patienten. 30 Patienten konnten einer AML zugeordnet werden und die restlichen 50 einer ALL. Von den 30 Patienten mit einer AML exprimierten insgesamt 22 (73%) FLT3 mRNA und 5 (17%) davon wiesen unerwartet längere Transkripte auf, welche der juxtamembranösen Domäne zugeordnet werden konnten. Sequenzanalysen zeigten, dass es sich dabei um eine partielle Duplikation handelte. 39 (78%) von 50 Patienten mit einer ALL waren FLT3 mRNA positiv, keiner jedoch besaß eine Tandemduplikation. Somit vermuteten sie dass diese Art der Mutation vorwiegend bei der AML zu finden ist (Nakao, 1996).

Diese Entdeckung war für viele Arbeitsgruppen Anlass sich näher mit dem FLT3 Rezeptor und dessen Mutationen zu befassen.

Zahlreiche Studien mit zum Teil höheren Patientenzahlen ergaben, dass ca. 70% der Patienten mit einer AML das FLT3-Protein und bis zu 99% FLT3-RNA exprimierten und zwar außer in normalen Stammzellen und Vorläuferzellen, vorwiegend in Blasten der myeloischen und lymphatischen Zelllinie (Drexler, 1996; Kottaridis, 2003). Dies galt auch für Patienten mit einer ALL, wobei die B-Zelllinie etwas häufiger als die T-Zelllinie betroffen war. Die Stimulation der Zellen, die FLT3 exprimierten, mit dem FLT3 Liganden führte zur Autophosphorylierung des Rezeptors. Damit wurde klar, dass der exprimierte Rezeptor intakt war und dessen Überexpression eventuell eine wichtige Rolle beim Überleben und bei der Proliferation maligner Klone spielt. (Carow, 1996)

Die Häufigkeit der FLT3 Mutation weist zwischen den Studien eine geringe Variation auf. In den meisten Arbeiten liegt sie bei 20-28%, wobei eine Altersabhängigkeit existiert. Kinder mit einer AML besitzen zu 4,3-16,5% diese Mutation, Patienten über 60 bis zu 34%. Bei Patienten mit einem myelodysplastischen Syndrom ist der Anteil geringer (10-15%) und in der ALL kommt diese Art von Mutation dann nur noch in 1-3% der Fälle vor. In der chronisch myeloischen Leukämie, der chronisch

lymphatischen Leukämie, dem Non-Hodgkin Lymphom, dem Multiplen Myelom und in normalen Zellen findet man keine Mutation des FLT3 Rezeptors (Gilliland, 2002; Gale, 2003; Kottaridis, 2003).

5.2 Häufigkeit der FAB- und zytogenetischen Subgruppen bei Patienten mit einer FLT3-LM

In der vorliegenden Arbeit wurden Charakteristika, wie der FAB Subtyp und der Karyotyp bei Patienten analysiert, die eine FLT3-LM hatten. Es konnten 30% der Patienten einer AML M1 zugeordnet werden. Der zweithäufig repräsentierte Subtyp war M2 mit 17,9%, daraufhin folgten Patienten mit einer AML M4 (14,2%), M3 (10,2%) und M5 (7,7%). 64% der Patienten hatten einen normalen Karyotyp und 10% der Patienten besaßen die Alteration t(15; 17). Dies waren die zwei häufigsten Gruppen. Patienten mit t(8;21) (0,3%) und komplexen Karyotyp (1,4%) waren seltener betroffen.

Zum Vergleich wurden in den nachfolgenden Tabellen 5.2.a und 5.2.b Daten aus 2 großen Studien herausgenommen, um sie unseren Ergebnissen gegenüberzustellen (Schnittger, 2002; Kottaridis, 2001). In der ersten Studie betrug die Anzahl der Patienten mit einer FLT3 Mutation 200 von insgesamt 1003 Patienten (19,9%) und in der zweiten 227 von insgesamt 854 Patienten (26,5%). Darunter ist die Anzahl der Patienten aufgeführt, die einer bestimmten FAB Subgruppe und Karyotyp zugeordnet werden konnten. Vergleicht man die 2 großen Studien mit unseren Daten findet man sehr vergleichbare Ergebnisse:

	Schnittger et al, 2002	Kottaridis et al, 2001	Vorliegende Arbeit
FLT3-LM positive Patienten	200 (von 1003 Patienten)	227 (von 854 Patienten)	274
M0	5 (2,5%)	0 (0%)	6 (2,1%)
M1	48 (24%)	40 (18%)	63 (22,9%)
M2	61 (30,5%)	49 (22%)	49 (17,8%)
M3	24 (12%)	58 (26%)	28 (10,2%)
M4	37 (18,5%)	51 (22%)	39 (14,2%)
M5	25 (12,5%)	20 (9%)	21 (7,6%)
M6	-	1 (<1%)	4 (1,4%)

Tabelle 5.2.a: Anzahl der FLT3-LM positiven Patienten in den verschiedenen FAB Subgruppen

	Schnittger et al, 2002	Kottaridis et al, 2001	Vorliegende Arbeit
FLT3-LM positive Patienten	200 (von 1003 Patienten)	227 (von 854 Patienten)	274
normaler Karyotyp	165 (70,5%)	96 (42,3%)	176 (64,2%)
t (15;17)	24 (10,2%)	49 (21,6)	28 (10%)
t (8;21)	6 (2,6%)	6 (2,63%)	1 (0,3%)
Komplexer Karyotyp	3 (1,3%)	1 (0,4%)	4 (1,4%)

Tabelle 5.2.b: Anzahl der FLT3-LM positiven Patienten in den verschiedenen zytogenetischen Subgruppen

5.3 Klinische Bedeutung der FLT3-LM

Eine Abschätzung der Prognose spielt bei der AML, ähnlich wie bei anderen malignen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Bislang galt der Karyotyp als wichtigster prognostischer Faktor, so dass Patienten in prognostische Gruppen, basierend auf ihre Zytogenetik, eingeteilt wurden (Yanada, 2005). Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Frage, ob die FLT3-LM zusätzlich eine schlechtere Prognose für den jeweiligen Patienten bedeutet.

5.3.1 Komplette Remission (CR)

Die komplette Remission bei Patienten nach erfolgter Therapie scheint in den meisten Studien durch das Vorhandensein einer FLT3-LM nicht signifikant erniedrigt zu sein. So betrug z.B. die CR 70,3% bei Patienten mit einer LM vs. 70,4% bei Patienten ohne Mutation (Schnittger, 2002). Analog dazu waren die Remissionsraten in zwei weiteren Studien 84% und 71% vs. 78% und 66% bei Patienten ohne Mutation (Kottaridis, 2001; Thiede, 2002). Nur eine Studie bestätigte dies nicht. Hier war die komplette Remissionsrate bei Patienten mit Mutation stark erniedrigt (47% vs. 79%) (Rombouts, 2000)

5.3.2 Rezidivraten

Im Gegensatz zur kompletten Remission scheint es, dass Patienten mit einer FLT3-Längenmutation hohe Rezidivraten aufweisen. Diese betragen z.B. 64% bzw. 75% bei Patienten mit FLT3- LM vs. 44% bzw. 25,6% bei Patienten ohne Mutation (Rombouts, 2000; Kottaridis, 2001). Dadurch scheint das Gesamtüberleben dieser Patienten erniedrigt zu sein.

Kiyoi und seine Arbeitsgruppe zeigte sogar, dass bei Patienten mit einer AML und im Alter unter 60 Jahren das Vorliegen einer FLT3-LM der wichtigste prognostische Faktor darstellt (Kiyoi, 1999).

Im Gegensatz dazu konnten 2 weitere Studien mit hohen Patientenzahlen nicht bestätigen, dass das Gesamtüberleben signifikant schlechter war als bei Patienten ohne Mutation. Doch auch hier war die ereignisfreie und rezidivfreie Überlebensrate bei Patienten mit FLT3-ITD vermindert (Schnittger, 2002; Thiede, 2002).

Die Unterschiede können darauf beruhen, dass differente Patientenkollektive untersucht wurden und dass die Therapie der Patienten, die einen wichtigen Faktor für die Prognose darstellt, von Studie zu Studie ungleich war (Kottaridis, 2003; Spiekermann, 2005).

Abschließend muss noch erwähnt werden, dass die FLT3 Mutation quantitative Unterschiede zeigt. Bei ungefähr 60% der Patienten mit einer diagnostizierten AML tragen alle Leukämiezellen diese Mutation. Andere aber weisen nur in einem Subklon die FLT3-LM auf. Außerdem gibt es Patienten mit teilweisem oder komplettem Verlust des FLT3-WT-Allels. Vor allem diese zeigen eine Assoziation mit einer besonders schlechten Prognose (Whitman, 2001; Thiede, 2002; Spiekermann, 2005).

5.4 Länge und Lokalisation der FLT3- LM

Nakao und seine Arbeitsgruppe untersuchten näher die Tandemduplikation, die sie bei 5 von insgesamt 30 Patienten mit dieser Diagnose vorgefunden haben. 3 Patienten hatten eine reine Duplikation und zwei Patienten hatten zusätzlich eine Insertion. Die Sequenzen konnten der juxtamembranen und der Tyrosinkinase Domäne 1 (TK1) zugeordnet werden, stammend aus Exon 14 und 15 (früher Exon 11 und 12) (Nakao, 1996). Die Mutation war immer *in-frame*, d.h. das Leseraster wurde

beibehalten. Die weitere Analyse auf der genomischen Ebene bestätigte das Vorhandensein der FLT3-LM.

Seitdem verifiziert sich immer wieder diese Beobachtung. Studien mit auch weitaus zahlreicheren Patientenkollektiven ergaben, dass die Länge der Tandemduplikation sich von 12 bis 204 Basenpaare erstreckt (Kottaridis, 2003). Schnittger und ihre Arbeitsgruppe berichtete über Längenmutationen, die 3 bis >400 Basenpaare lang waren (Schnittger, 2002). Mit unterschiedlicher Häufigkeit wurde immer wieder auch das Vorhandensein einer zusätzlichen Insertion unbekannter Herkunft vor der eigentlichen Duplikation bestätigt. Die Länge variierte von 2 bis 22 Nukleotiden (Yokota, 1997; Stirewald, 2001). Eine Arbeitsgruppe entdeckte auch eine Triplikation der FLT3 Sequenz (Stirewald, 2001).

Stirewald und dessen Arbeitsgruppe untersuchte die Korrelation zwischen Länge der Mutation und deren klinische Bedeutung bei insgesamt 151 Patienten. Interessanterweise gab es Hinweise, dass Patienten mit einer längeren FLT3-LM eine etwas schlechtere Gesamt- und remissionsfreie Überlebensrate vorwiesen, als Patienten mit einer kürzeren Tandemduplikation oder aber auch keiner FLT3-LM (Stirewald, 2006).

Alle bis dato näher analysierten Längenmutationen waren *in-frame*. Sie stammten aus Exon 14, manche erstreckten sich über Intron 14 bis Exon 15. Genauer gesagt waren es Duplikationen, die in der juxtamembranösen Domäne des FLT3 Rezeptors stattfanden und die zum Teil auch bis in die Tyrosinkinase Domäne 1 reichten. Andererseits wurde keine einzige Tandemduplikation vorgefunden, die nur in TK1 inseriert war und in welcher die juxtamembranöse Domäne ausgespart blieb.

Obwohl die genaue Lokalisation der FLT3-LM von Patient zu Patient differierte, fiel auf, dass vor allem die tyrosinreiche Sequenz zwischen Y589 und Y599 häufig dupliziert war (Kiyoi, 1997, Kiyoi, 1998; Rombouts, 2000; Kiyoi, 2002; Reindl, 2006). Kiyoi untersuchte wie häufig die einzelnen Tyrosine in dieser Region des Rezeptors betroffen waren. Y599 war bei einem Kollektiv von 50 Patienten mit 72% das häufigste duplizierte Tyrosin. Es folgte Y597 mit 66%, Y591 mit 56% und Y589 mit 50%.

In dieser Arbeit bestätigten sich in vielerlei Hinsicht die Ergebnisse der meisten Studien. Auch hier war die Mutation sehr inhomogen im Hinblick auf Länge und Lokalisation. Die Anzahl der duplizierten Aminosäuren erstreckte sich von 2-42 und der Median betrug 17 Aminosäuren. 71,53% aller Patienten hatten zusätzlich

insetierte Nukleotide vor der eigentlichen Längenmutation. Die Tandemduplikation konzentrierte sich vorwiegend im JM-Z Bereich des FLT3 Rezeptors und reichte in vielen Fällen bis in die Kinasedomäne. Die häufigste duplizierte Aminosäure war mit 77% R595, gefolgt von Y597 in 74% und F594 und E596 in 73% der Fälle. Alle Aminosäuren N- und C-terminal der Position R595 waren in abnehmender Häufigkeit betroffen.

Im Hinblick auf die von Kiyoi angeführten Tyrosinreste, gab es interessanterweise eine weitgehende Übereinstimmung in deren Häufigkeiten. Auch hier war Y597 mit 74,2% am häufigsten betroffen. Es schlossen sich Y591 mit 61,6%, Y599 mit 60,5% und zum Schluss Y589 mit 54,9% an.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit am Beispiel von 30 Patienten die kürzeste insetierte Sequenz näher betrachtet um ein eventuell vorhandenes gemeinsames Motiv der FLT3 Mutation ausfindig zu machen. Bei 23 Patienten (92%) waren entweder Y597 und/oder Y599 betroffen. Bei 10 Patienten (40%) kamen in der Duplikation beide Tyrosinreste vor. Nur in 2 von insgesamt 30 Fällen war weder Y597 noch Y599 in der Mutation vorzufinden.

5.5 Erklärungsversuch für die Entstehung der FLT3-LM

Weshalb bestimmte Patienten diese Mutation aufweisen und welche Voraussetzungen für die Entstehung der FLT3-LM gegeben sein müssen, ist größtenteils noch ungeklärt. Einen Erklärungsversuch für die Ausbildung von Tandemduplikationen liefert die Abbildung 5.5. Als erstes ist schematisch der FLT3 Rezeptor dargestellt. Am aminoterminalen Ende befinden sich die 5 immunoglobulinähnlichen Strukturen des Rezeptors, es folgt die transmembranöse und juxtamembranöse Domäne und die zwei Tyrosinkinasedomänen die durch eine kleine Sequenz voneinander getrennt sind. Darunter ist ein kleiner Ausschnitt der juxtamembranösen Domäne. Hier finden sich häufig Tandemduplikationen.

Betrachtet man die Einzel-Strang DNA, die für die Aminosäuresequenz von D593 bis K602 der JM-Domäne kodiert, erkennt man ein Palidrom (Abb. 4.5b) (Kiyoi, 1998; Kohl, 2005). Während der Replikation kann sich hier eine Haarnadelstruktur bilden. Wenn zeitgleich das Reparatursystem der DNA dann nur fehlerhaft funktioniert, kann es zu einer Duplikation der Sequenz kommen.

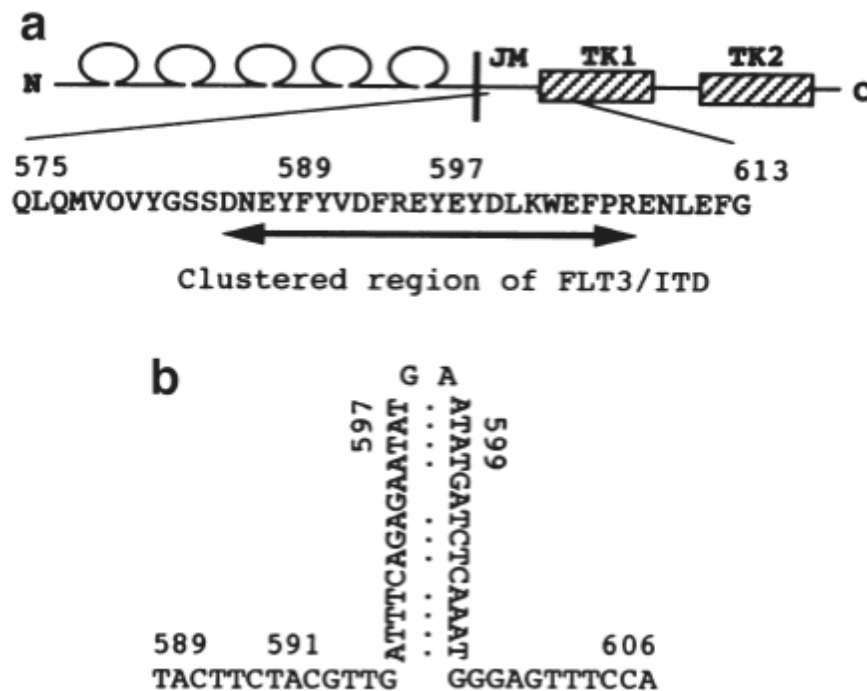


Abbildung 5.5: Lokalisation der FLT3-Längenmutation. (a) Ausschnitt aus dem FLT3 Rezeptor, die juxtamembranöse Domäne. (b) Die palindromen Sequenzen der Einzelstrang DNA bilden eine Haarnadelstruktur

5.6 Biologische Bedeutung der FLT3-LM

Welche Rolle die FLT3-LM bei der Genese der akuten myeloischen Leukämie spielt ist zum Teil noch abklärungswürdig. Kiyoi und seine Arbeitsgruppe, die sich damit näher befasst haben, benutzten Cos7 Zellen um die biologische Aktivität der FLT3-LM besser charakterisieren zu können. Bei Zellen, die eine Tandemduplikation aufwiesen, kam es zu einer ligandenunabhängigen Dimerisation und Phosphorylierung des Rezeptors unabhängig von Länge und Lokalisation der Längenmutation. Auch in Zellen in welchen FLT3-Wt und FLT3-ITD nebeneinander vorkamen wurde der Rezeptor aktiviert, so dass man annehmen konnte, dass FLT3-Wt und mutiertes FLT3 ein Heterodimer bilden und dadurch auch FLT3-Wt aktiviert wurde. Eine wichtige Erkenntnis war in diesem Zusammenhang, dass diese Oligomerisierung ohne vorangeschaltete FL Stimulation erfolgte, d.h. ligandenunabhängig war.

Zum Schluss wurden die kritischen Domänen des Rezeptors näher untersucht, welche eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen z. B. durch Phosphorylierung. Vergleicht man den PDGF-Rezeptor mit den FLT3 Rezeptor so entspricht die

Position Y579 des ersteren Y589 des FLT3 Rezeptors. Y579 ist an der Signaltransduktion beteiligt, indem sie phosphoryliert wird und als Andockpunkt für weitere Signalproteine dient. Um die Frage zu beantworten ob die Zunahme der Tyrosine in der JM Region eine Bedeutung für die Aktivierung des Rezeptors eine Rolle spielt, wurden die Tyrosine in Position 589 und 591 zu Phenylalanin mutiert. Interessanterweise kam es auch hier zu einer konstitutiven Phosphorylierung.

Somit scheint die Konformationsänderung, die in diesem Fall durch die Elongation der juxtamembranösen Domäne entstanden ist und dem damit verbundenen Verlust ihrer autoinhibitorischen Funktion (Kiyoi, 1998) die wichtigste Rolle bei der Aktivierung des Rezeptors zu spielen.

Neuere Studien haben zusätzlich gezeigt, dass es qualitative Unterschiede bei der Signaltransduktion gibt, je nach dem ob der Wildtyprezeptor oder der mutierte Rezeptor aktiviert wird (Spiekermann, 2003; Rocnik, 2006). Als Beispiel wird STAT5 nur vom mutierten Rezeptor aktiviert. STAT5 stellt einen wichtigen Faktor für das transformierende Potential des konstitutiv aktivierten FLT3 Rezeptors dar. Über STAT5 kommt es zu einer veränderten Expression von verschiedenen Genen, welche wichtig für die Regulierung der Apoptose, Proliferation und des Zellzyklus sind (Spiekermann, 2005; Reindl, 2006).

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass die Tyrosine 589 und 591 wichtige Andockpunkte für STAT5 sind. Eine Substitution dieser Tyrosine zu Phenylalanin führte zu einer signifikant schwächeren Aktivierung von STAT5 und zu einem deutlich langsameren Wachstum von 32D Zellen. Somit vermutet man dass Y589 und Y591 durch eine Konformationsänderung, bedingt durch Längenmutationen im JM Bereich, exponiert werden und es somit zur Aktivierung des Rezeptors kommt (Rocnik, 2006).

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit hat sich unsere Arbeitsgruppe mit der Rolle des Arginins in Position 595 eingehend beschäftigt, um die Frage nach dem Mechanismus der Rezeptoraktivierung zu beantworten. Da R595 die häufigste duplizierte Aminosäure in unserem Patientengut war, veranlasste uns diese Beobachtung nachzuprüfen, ob eine Duplikation dieser Aminosäure in der Lage war das transformierende Potential des FLT3 Rezeptors zu aktivieren (Vempati, 2007). In der Tat führte eine Insertion von Arginin in Position 595 (FLT3-ins595R) zu einem IL-3 unabhängigen Wachstum von Ba/F3 Zellen, murinen lymphatischen pro-B-Zellen, die durch eine stabile IL-3 Abhängigkeit gekennzeichnet sind (Kohl, 2005). Die

zusätzliche Insertion von Nachbaraminosäuren des Arginins (FLT3-ins596RE, FLT3-ins597REY) erhöhte das transformierende Potential. Tandemduplikationen, die diese Aminosäure nicht beinhalteten wie z.B. FLT3-ins595EY, hatten im Vergleich dazu ein geringeres transformierendes Potential. Allen Zellen mit Duplikationen war gemeinsam, dass sie in Anwesenheit von FL eine höhere Proliferationsrate zeigten als FLT3-Wt.

Diese Daten führten uns zu der Annahme, dass die positive Ladung des Arginins verantwortlich für bestimmte Interaktionen mit anderen Aminosäuren ist und es dadurch zu einer Beeinträchtigung der Autoinhibition durch die JM-Domäne kommt. Zu diesem Zweck wurde das positiv geladene Arginin zunächst durch Alanin (neutral), dann durch Glutamat (negativ geladen) und zuletzt durch eine andere positiv geladene Aminosäure, Lysin ersetzt. Interessanterweise zeigte der Austausch von Arginin mit Alanin oder Glutamat eine Reduktion des transformierenden Potentials von 55 bis 70%, die Substitution mit Lysin hingegen erbrachte keinen Unterschied im Vergleich zur Mutante FLT3-ITD-W51 (FLT3-ITD-W51: REYEYDL). Deletionen von Aminosäuren benachbart zu R595 im FLT3-ITD-W51 Konstrukt führten auch zu keinem signifikanten Unterschied im transformierenden Potential, wohl aber eine Deletion von R595 (FLT3-W51 Δ R595). Hier kam es zu einer Reduktion der Wachstumsrate von Ba/F3 um bis zu 64% im Vergleich zu FLT3-ITD-W51. Die Deletion von R595 im FLT3-Wildtyp (FLT3-Wt- Δ R595) führte unter Stimulation mit dem FLT3 Liganden zu einem Arrest des Zellwachstums, ganz im Gegensatz zu Zellen die FLT3-Wt exprimierten. All diese Erkenntnisse zeigen klar, dass das Arginin 595 und insbesondere die positive Ladung eine entscheidende Rolle in der Aktivierung, sowohl des Wt-Rezeptors als auch seiner Mutanten spielt.

In mehreren Studien wurden die Signalkaskaden, die durch die Aktivierung des Rezeptors in Gang gesetzt werden, näher betrachtet. Dabei muss zwischen Signalketten, die vom Wt-Rezeptor und solchen die von mutierten FLT3 aktiviert werden, unterschieden werden. Die RAS-RAF (RAS aktivierbarer Faktor)-MAPK (Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase) und die PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-AKT (Proteinkinase B) Signalkaskaden werden durch beide Formen des Rezeptors angeschaltet. Im Gegensatz dazu wird STAT5 nur vom mutierten Rezeptor aktiviert.

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Rolle des positiv geladenen Arginins in der Aktivierung des FLT3-Rezeptors, haben wir gesehen, dass auch dieser Signalweg, von FLT3-ITD-W51 stark aktiviert wird. Im Unterschied dazu führten alle anderen

Konstrukte, denen das Arginin fehlte, z. B. durch Deletion oder Substitution mit Aminosäuren differenter Ladung zu einer verminderten Aktivierung von STAT5.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, dass R595 die häufigste duplizierte Aminosäure ist und dass sie aller Voraussicht nach, eine besonders wichtige Rolle bei der Transformation von FLT3 Zellen spielt (Vempati, 2007).

6. Zusammenfassung

Aktivierende Mutationen des FLT3 Rezeptors sind, im Rahmen einer AML, die häufigsten vorzufindenden Alterationen, mit einem Anteil von bis zu 30%. In abnehmender Häufigkeit sind auch das NPM1-Gen, das ras-Gen, das MLL- und p53-Gen betroffen.

In dieser Arbeit wurden Längenmutationen der juxtamembranösen Domäne des FLT3-Rezeptors näher betrachtet, die bei 20-30% der Patienten mit dieser Diagnose vorzufinden sind.

Zunächst wurden klinische Daten von insgesamt 274 mit primärer AML ausgewertet. Diese wurden vom Labor für Leukämiediagnostik des Klinikum Grosshadern der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum von Juli 1997 bis Dezember 2000 erhoben. 64,2% der Patienten waren zytogenetisch unauffällig, weitere 10% wiesen die Translokation t(15;17) auf. Patienten mit komplexem Karyotyp oder Alterationen wie z.B. t(8;21) waren seltener betroffen. 73,3% der Patienten hatten bei Diagnosestellung eine Leukozytenzahl von über 10.500 und somit eine Leukozytose.

Weiterhin wurde die FLT3-LM im Hinblick auf Länge und Lokalisation näher betrachtet. Die Anzahl inserierter Aminosäuren erstreckte sich von 2 bis 42 und der Median betrug 17 Aminosäuren. 80% der Patienten besaßen eine Tandemduplikation die kleiner als 24 Aminosäuren war. Bei 71,5% der Patienten lag eine zusätzliche Insertion vor, die vor der eigentlich duplizierten Sequenz zu

liegen kam. Die Länge dieser Insertion von Nukleotiden unbekanntem Ursprungs erstreckte sich von einem Nukleotid bei 31,1% der Fälle bis 28 Nukleotide.

Die duplizierten Sequenzen waren im Wesentlichen im JM-Z-Bereich und in der Kinase Domäne inseriert. Dabei handelte es sich in erster Linie um Duplikationen der juxtamembranen Domäne. Seltener war die Lokalisation der Längenmutation im JM-S-Bereich zu finden und im JM-B-Bereich kam keine einzige Tandemduplikation vor. Häufige Stellen einer Insertion waren in der juxtamembranen Domäne R595, Y597, E598, L601 und in der Kinase Domäne E612 und F613.

Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass 77% der Patienten eine Duplikation des Arginins in Position 595 und insgesamt 70% der Aminosäuren EY (596-597) und REY (595-597) aufwiesen. Nachbaraminosäuren von R595 waren mit zunehmender Entfernung zum N- und C-Terminus seltener betroffen.

Mit dem Ziel ein gemeinsames Motiv der Längenmutationen zu erkennen, haben wir die kürzesten Sequenzen von insgesamt 30 aus dem Gesamtkollektiv von 284 Patienten analysiert. 84% der Patienten wiesen eine Duplikation des Arginins R595 auf. Bei 92% waren entweder Y597 oder Y599 dupliziert und bei 40% der Patienten waren beide Tyrosinreste betroffen.

Um den molekularen Mechanismus der malignen Transformation von FLT3-LM besser zu verstehen, hat unsere Arbeitsgruppe die Rolle von R595 näher definiert. Es wurde gezeigt, dass die alleinige Duplikation von R595 zu einem ligandenunabhängigen Wachstum von Ba/F3 Zellen führte und in der Lage war STAT5 zu aktivieren. Deletion oder Substitution dieser Aminosäure reduzierte das transformierende Potential, vor allem wenn die substituierte Aminosäure eine differente Ladung besaß. Somit konnten wir zeigen, dass die häufigste duplizierte Aminosäure R595 eine Schlüsselrolle im transformierenden Potential von FLT3-Längenmutationen besitzt.

7. Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B; Serin/Threonin-Proteinkinase mit Funktionen in verschiedenen Signaltransduktionswegen
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMLCG	AML Cooperative Group
ATP	Adenosintriphosphat
CBF	Core binding factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPO	Erythropoetin
FAB	French-American-British-Group
FL	FLT3 Ligand
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
FLT3-LM	FLT3-Längenmutation
FMS	macrophage colony stimulating factor receptor
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
IL	Interleukin
JM	Juxtamembranöse Domäne
JM-B	JM binding motif
JM-S	JM switch motif
JM-Z	JM zipper motif
KIT	Receptor for stem cell factor
KMT	Knochenmarkstransplantations-Modell
MAPK	mitogen activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MLL	mixed lineage leukemia
NPM	Nukleophosmin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR α,β	platelet derived growth factor receptor α, β

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PTK	Phosphotyrosinkinase
RAS	RAS Protein: G-Protein, erstmals beim Ratten-Sarkom Virus gefunden
RAF	RAS aktivierbarer Faktor
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptorphosphotyrosinkinase
SCF	stem cell factor
STAT-5	signal transducer and activator of transcription 5
TK	Tyrosinkinase
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TM	Transmembranöse Domäne
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp

8. Literaturverzeichnis

1. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe EA, Winship PR, Reilly JT. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000; 111(1):190-5.
2. Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001;:62-86.
3. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001 17; 411(6835):355-65.
4. Büchner T, Hiddemann W. Therapiestrategien bei acuter myeloischer Leukämie. *Internist* 2002; 43: 1203-1211
5. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 1996 1; 87(3):1089-96.
6. Dietel M, Dudenhausen J, Suttrop N (Hg). *Harrisons Innere Medizin* 2003;
7. Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996; 10(4):588-99.
8. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352(3):254-66.
9. Feuring- Buske M, Hiddemann W, Buske C. Pathogenese und Biologie der Leukämien. *Internist* 2002; 43:1179-1189
10. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122(4):523-38.
11. Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol* 2002; 9(4):274-81.
12. Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol* 2002; 39(4 Suppl 3):6-11

13. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004; 13(2):169-78.
14. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92(7):2322-33.
15. Haferlach T, Schoch C. *Internist* 2002; 43:1190-1202
16. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19(5):624-31.
17. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2002; 99(1):310-8.
18. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, Tamura J, Shimazaki C, Matsue K, Kobayashi H, Arima N, Suzuki R, Morishita H, Saito H, Ueda R, Ohno R. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia* 1997 Sep; 11(9):1447-52.
19. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998;12(9):1333-7.
20. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93(9): 3074-80.
21. Kiyoi H, Naoe T. FLT3 in human hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2002; 43(8):1541-7.

22. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(6):905-13.
23. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98(6):1752-9.
24. Levis M, Small D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* 2003; 17(9): 1738-52.
25. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000; 96(12):3907-14.
26. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10(12):1911-8.
27. Reilly JT. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol* 2002; 116(4):744-57.
28. Reilly JT. FLT3 and its role in the pathogenesis of acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(1):1-7.
29. Reilly JT. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Rev* 2003; 17(4):241-8.
30. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006; 107(9):3700-7.
31. Rocnik JL, Okabe R, Yu JC, Lee BH, Giese N, Schenkein DP, Gilliland DG. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 2006; 108(4):1339-45.

32. Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia* 2000; 14(4):675-83
33. Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 1996; 10(2):238-48.
34. Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 2002; 21(21):3314-33.
35. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100(1):59-66.
36. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96(13):4075-83.
37. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100(9):3423-5.
38. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W. Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clin Cancer Res* 2003;9(6):2140-50.
39. Spiekermann K, Hiddemann W, Schnittger S. Mutationen im Gen für die Rezeptortyrosinkinase FLT3 bei akuter myeloischer Leukämie. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130: 1020-1025
40. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97(11):3589-95.

41. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107(9):3724-6.
42. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99(12):4326-35.
43. Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 2000; 14(10):1766-76.
44. Vempati S, Reindl C, Kaza SK, Kern R, Malamoussi T, Dugas M, Mellert G, Schnittger S, Hiddemann W, Spiekermann K. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. *Blood* 2007; 110(2):686-94.
45. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61(19):7233-9.
46. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 2005; 19(8):1345-9.
47. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, Naoe T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997; 11(10):1605-9.

9. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Theodora Malamoussi
Geburtsdaten: 19 April 1980 in Ludwigshafen am Rhein
Nationalität: griechisch
Email: malamoussi@gmx.de

Berufliche Tätigkeit

Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, seit Oktober 2006
 Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität
 München

Hochschulbildung

Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München	04 / 1999 – 05 / 2006
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)	12.05.2006
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 1,66)	15.03.2006
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2.0)	29.08.2002
Ärztliche Vorprüfung (Gesamtnote: 3,0)	05.09.2001

Praktisches Jahr

Innere Medizin:	Klinikum Augsburg Akademisches Lehrkrankenhaus der LMU München	11 / 2005 – 03 / 2006
Anästhesiologie:	Klinikum Augsburg Akademisches Lehrkrankenhaus der LMU München	08 / 2005 – 11 / 2005
Chirurgie:	Klinikum München – Neuperlach Akademisches Lehrkrankenhaus der LMU München	04 / 2005 – 08 / 2005

Famulaturen

Innere Medizin:	Southern Regional Hospital Dangriga, Belize	09 / 2003 – 10 / 2003
Allgemeinmedizin:	Dr.med Theodora Ikonomidis Allgemein – und Laborärztin	02 / 2003 – 04 / 2003
Innere Medizin:	The George Papanicolaou General Hospital of Thessaloniki	09 / 2002 – 10 / 2002
Chirurgie	Chirurgische Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München	02 / 2002 – 03 / 2002

Schulbildung

Europäische Schule München 09 / 1987 – 07 / 1998

Abschluss: Europäische Reifeprüfung

(Gesamtnote: 1,0)

Privatschule der Republik Griechenland 09 / 1986 – 07 / 1987

Publikationen

Vempati S, Reindl C, Kaza SK, Kern R, **Malamoussi T**, Dugas M, Mellert G, Schnittger S, Hiddemann W, Speikermann K. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. Blood 2007; 110(2):686-94.