

Aus der  
III. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Bedeutung der *FLT3* internen Tandemduplikation Allel-Ratio im Rahmen der  
Therapiestratifizierung bei Patient\*innen mit akuter myeloischer Leukämie**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
Jonathan Frederik Sauer  
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

12. Juni 2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Zielsetzung der Arbeit .....	- 2 -
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>- 3 -</b>
2.1 Akute Myeloische Leukämie.....	- 3 -
2.2 Hämatopoetische Stammzellen.....	- 4 -
2.3 Zytogenetik und Molekulargenetik der AML .....	- 4 -
2.4 Pathogenese der AML.....	- 7 -
2.5 Die Rezeptortyrosinkinase <i>FLT3</i> .....	- 10 -
2.6 <i>FLT3</i> in der AML .....	- 12 -
2.7 Interne Tandemduplikation des <i>FLT3</i> -Rezeptors .....	- 13 -
2.8 Prognose für AML Patient*innen mit einer <i>FLT3</i> -ITD .....	- 14 -
2.9 Therapie der AML.....	- 16 -
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>- 20 -</b>
3.1 Material .....	- 20 -
3.1.1 Geräte und Zubehör .....	- 20 -
3.1.2 Chemikalien/Substanzen .....	- 22 -
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	- 24 -
3.1.4 Fertigsysteme .....	- 25 -
3.1.5 Zellkulturmedien, Zusätze und verwendete Materialien.....	- 26 -
3.1.6 Lösungen und Puffer .....	- 26 -
3.1.7 Längenstandards .....	- 27 -
3.1.8 <i>FLT3</i> -PCR Primer .....	- 28 -
3.1.9 Zelllinien .....	- 28 -
3.1.10 Antikörper .....	- 28 -
3.1.11 Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	- 29 -
3.1.12 Software .....	- 29 -
3.1.13 Datenbanken .....	- 29 -
3.2 Methoden .....	- 30 -
3.2.1 Studiendesign und Ethik .....	- 30 -
3.2.2 Patientenkollektiv mit Ein- und Ausschlusskriterien .....	- 31 -
3.2.3 Materialgewinnung.....	- 31 -
3.2.4 Zellen auftauen .....	- 31 -
3.2.5 Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Vitalfärbung .....	- 32 -

## Inhaltsverzeichnis

3.2.6	DNase-Verdau .....	- 32 -
3.2.7	Magnetische Zellseparation .....	- 33 -
3.2.8	Durchflusszytometrie .....	- 37 -
3.2.9	Colony-Forming-Unit-Assay.....	- 37 -
3.2.10	DNA-Extraktion .....	- 38 -
3.2.11	ITD-Vervielfältigung mittels PCR .....	- 38 -
3.2.12	Kapillarelektrophorese / GeneScan-Analyse .....	- 40 -
3.2.13	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 42 -
3.2.14	Dokumentation, Statistik und Auswertung .....	- 43 -
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>- 44 -</b>
4.1	Gesamtüberblick der Studienkohorte .....	- 44 -
4.2	Stammdaten .....	- 45 -
4.3	CD33/34 Anreicherung.....	- 45 -
4.4	Nachweis der ITD durch GeneScan-Analyse .....	- 49 -
4.5	Nachweis der ITD durch Agarose-Gelelektrophorese .....	- 50 -
4.6	Quantifizierung der <i>FLT3</i> -ITD Allelic Ratio .....	- 51 -
4.7	Charakteristika und Analyse der verbliebenen Studienkohorte .....	- 56 -
4.7.1	Ansprechrate auf Induktionstherapie .....	- 56 -
4.7.2	Therapiewahl für die Konsolidierung und Überlebensanalyse .....	- 56 -
4.7.3	Überlebensanalyse in Abhängigkeit einer <i>NPM1</i> Mutation .....	- 57 -
4.7.4	Überlebensanalyse in Abhängigkeit der Allel-Ratio .....	- 58 -
4.8	Quantifizierung der Kolonien des CFU-Assays .....	- 60 -
4.8.1	Ansprechrate der Inhibitoren .....	- 62 -
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>- 65 -</b>
5.1	Inzidenz und Quantität der <i>FLT3</i> -ITD .....	- 65 -
5.2	Aufreinigung mittels magnetischer Zellseparation .....	- 66 -
5.3	Sensitivitätsvergleich konventionelle PCR mit Agarose-Gelelektrophorese..... und GeneScan Analyse .....	- 68 -
5.4	Bedeutung der Allel-Ratio in der AML .....	- 70 -
5.5	Perspektive für die AML Diagnostik und Therapie .....	- 74 -
5.6	Inhibitoren .....	- 77 -
5.6.1	Midostaurin .....	- 77 -
5.6.2	Crenolanib .....	- 78 -
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>- 80 -</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>XXVI</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AKT	Protein Kinase B
alloHSCT	allogene haematopoietic stem cell transplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AML-MRC	AML- Myelodysplasie-assoziierte Veränderungen
AML1	acute myeloid leukemia 1 protein
ANKRD26	Ankyrin repeat domain-containing protein 26
APL/PML	akute Promyelozytenleukämie
AR	allelic Ratio
AS	Aminosäure
ASXL1	Additional Sex Combs Like 1
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
autoHSCT	autologe haematopoietic stem cell transplantation
AZ	Allgemeinzustand
B-ALL	B-Zell akute lymphatische Leukämie
BM	bone marrow
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
<i>CEBPA</i>	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
c-FMS	formerly McDonough feline sarcoma viral oncogene homolog
CFU	colony forming unit
<i>c-KIT</i>	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
CML	chronische myeloische Leukämie
CPX-351-Formel	Daunorubicin (liposomal) / Cytarabin
CR	complete remission
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytiditriphosphat
DDX41	Probable ATP-dependent RNA helicase
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

DNA	deoxyribonucleic acid
<i>DNMT1/3A/3B</i>	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1/3A/3B
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	event-free survival
ELN	European LeukemiaNet
ETV6	translocation-Ets-leukemia virus 6
FAB	French-American-British
FACS	fluorescence-activated cell scanning/sorting
FBS/FCS	fetal bovine/calf serum
FL	<i>FLT3</i> -Ligand
FLK2	fetal liver kinase 2
<i>FLT3</i>	<i>FMS like tyrosine kinase 3</i>
FLT3i	<i>FLT3</i> -Inhibitor
<i>FLT3</i> -JM-PM	<i>FLT3</i> - Juxtamembrandomäne-Punktmutation
FSC	forward scatter
G	Guanin
HR	Hazard Ratio
HSC	haematopoietic stem cell
HSCT	haematopoietic stem cell transplantation
IQR	interquartile range
i.v.	intra venös
IDH 1/2	Isocitrate dehydrogenase 1/2
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
ITD	interne Tandemduplikation
JMD	juxtamembranäre Domäne
kb	Kilobasenpaare
KI	Kinase Insertion
KM	Knochenmark
<i>KRAS</i>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LA	Leukozytapherese
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCL1	Myeloid cell leukemia 1
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MLL	mixed-lineage leukemia

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>MYH11-CBFB</i>	myosin heavy chain 11
<i>NPM1</i>	<i>Nucleophosmin 1</i>
Nr.	Nummer
<i>NRAS</i>	<i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
OS	overall survival
p.o.	per os
P13K	Phosphoinositide 3-kinases
PB	peripheres Blut
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR A/B	platelet derived growth factor receptor A/B
RARA	- retinoic acid receptor alpha
PRT	Postremissionstherapie
PTD	partielle Tandemduplikation
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RFS	relapse-free survival
RNA	ribonucleic acid
<i>RUNX1</i>	runt-related transcription factor 1
<i>RUNX1T1/ETO</i>	runt-related transcription factor 1, translocated to, 1 (cyclin D- related)
<i>SMC1S</i>	Structural Maintenance of Chromosomes 1S
SSC	sideward scatter
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
STK1	stem cell tyrosine kinase 1
T	Thymin
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
tAML	therapieassoziierte AML
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TET 1/2	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1/2
TK 1/2	Tyrosinkinase 1/2
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TMD	transmembranäre Domäne
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
<i>WT1</i>	Wilms-Tumorsuppressorgen
z.T.	zum Teil

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mutationsverteilung der AML.....	- 6 -
Abbildung 2:	Häufigkeitsverteilung der Mutationen einer AML.....	- 8 -
Abbildung 3:	Häufigkeitsverteilung der Mutationen einer AML.....	- 9 -
Abbildung 4:	<i>FLT3</i> -Rezeptor .....	- 10 -
Abbildung 5:	Koexistierende Mutationen bei Vorliegen einer <i>FLT3</i> -Mutation..	- 12 -
Abbildung 6:	Flussdiagramm des Experimentenablaufs .....	- 30 -
Abbildung 7:	Schematische Darstellung eines MicroBead .....	- 33 -
Abbildung 8:	Schematische Darstellung einer magnetischen Zellseparation..	- 34 -
Abbildung 9:	Beispiel einer GeneScan-Fragmentanalyse-Darstellung. ....	- 41 -
Abbildung 10:	Kalibrierungskurve mit der Zellreihe MV4-11 .....	- 42 -
Abbildung 11:	Beispiel einer Gelelektrophorese .....	- 43 -
Abbildung 12:	Flowchart zum Studienkollektiv .....	- 44 -
Abbildung 13:	Aufreinigung aller Patientenproben je nach Population.....	- 46 -
Abbildung 14:	Aufreinigungsanteil von CD33 <sup>+</sup> -Zellen je Population.....	- 47 -
Abbildung 15:	Aufreinigungsanteil von CD34 <sup>+</sup> -Zellen je Population.....	- 47 -
Abbildung 16:	Gelelektrophorese bei Patient*innen mit zwei <i>FLT3</i> -ITD Klonen	- 50 -
Abbildung 17:	Gegenüberstellung des Allel-Ratio je nach Population .....	- 51 -
Abbildung 18:	Individuelle Allel-Ratio Differenz für die Patientenproben .....	- 53 -
Abbildung 19:	Korrelation Allel-Ratio Differenz und Anreicherungsfaktor .....	- 55 -
Abbildung 20:	Gesamtüberleben in Abhängigkeit der gewählten Therapie.....	- 57 -
Abbildung 21:	Gesamtüberleben in Abhängigkeit einer <i>NPM1</i> -Mutation .....	- 57 -
Abbildung 22:	Gesamtüberleben im Vergleich der bulk- und aufgereinigten..... Population in Abhängigkeit der Allel-Ratio .....	- 58 -
Abbildung 24:	Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Allel-Ratio Differenz.....	- 59 -
Abbildung 25:	Kolonien im CFU-Assay .....	- 60 -
Abbildung 26:	Ansprechrate Crenolanib.....	- 63 -
Abbildung 27:	Ansprechrate PKC412 .....	- 64 -
Abbildung 28:	Variationskoeffizient in Abhängigkeit der Mutationsfrequenz .....	- 72 -
Abbildung 29:	Überlebensanalyse von Patient*innen mit..... aufgereinigter AR $\geq$ 0,5 .....	- 75 -
Abbildung 30:	Überlebensanalyse von Patient*innen mit..... aufgereinigter AR $<$ 0,5 .....	- 75 -



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML) .....	- 5 -
Tabelle 2:	Geräte und Zubehör in alphabetischer Reihenfolge .....	- 22 -
Tabelle 3:	Chemikalien und Substanzen in alphabetischer Reihenfolge .....	- 24 -
Tabelle 4:	Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge .....	- 25 -
Tabelle 5:	Fertigsysteme in alphabetischer Reihenfolge.....	- 25 -
Tabelle 6:	Zellkulturmedien und Zusätze in alphabetischer Reihenfolge .....	- 26 -
Tabelle 7:	Lösungen und Puffer in alphabetischer Reihenfolge .....	- 27 -
Tabelle 8:	Längenstandards in alphabetischer Reihenfolge .....	- 27 -
Tabelle 9:	<i>FLT3</i> -PCR Primer in alphabetischer Reihenfolge .....	- 28 -
Tabelle 10:	Zelllinien in alphabetischer Reihenfolge .....	- 28 -
Tabelle 11:	Antikörper in alphabetischer Reihenfolge .....	- 28 -
Tabelle 12:	Tyrosinkinase-Inhibitoren in alphabetischer Reihenfolge .....	- 29 -
Tabelle 13:	Software in alphabetischer Reihenfolge .....	- 29 -
Tabelle 14:	Datenbanken in alphabetischer Reihenfolge .....	- 29 -
Tabelle 15:	PCR-Ansatz.....	- 39 -
Tabelle 16:	Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion .....	- 39 -
Tabelle 17:	Charakteristika des Studienkollektivs .....	- 45 -
Tabelle 18:	Immunphänotypisierung des Patientenkollektivs.....	- 46 -
Tabelle 19:	Ergebnisse der Aufreinigung .....	- 48 -
Tabelle 20:	Erfolge der Aufreinigung nach den Einschlusskriterien .....	- 49 -
Tabelle 21:	Gegenüberstellung der Allel-Ratio.....	- 51 -
Tabelle 22:	Stammdaten der verbliebenen Studienkohorte .....	- 56 -
Tabelle 23:	Entscheidungen zur Konsolidierungstherapie .....	- 56 -
Tabelle 24:	Quantifizierung der Kolonien im CFU-Assay .....	- 61 -
Tabelle 25:	Ansprechrate Crenolanib.....	- 62 -
Tabelle 26:	Ansprechrate PKC412.....	- 63 -

# 1 Einleitung

Leukämien sind biologisch heterogene Erkrankungen des Blutes bzw. des blutbildenden Systems. Dabei kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation lymphatischer oder myeloischer Blutzellen sowie einer Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Diese Leukämiezellen treten im Verlauf vermehrt im peripheren Blutkreislauf auf und befallen teilweise lymphatische Organe wie Leber und Milz, was zu einer Beeinträchtigung der Organfunktionen führt. Da im Rahmen einer Leukämie alle drei Zellreihen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) befallen sein können, kann die Erkrankung zu einer Anämie, Neutropenie oder Thrombozytopenie führen. Klinisch äußern sich Leukämien dabei häufig nur durch B-Symptomatik im Sinne von Fieber, Fatigue, Blässe, Gewichtsverlust und nächtliches Schwitzen (Southam et al. 1951).

Aufgrund der Entität des Erkrankungsverlaufs sowie der betroffenen Zellreihe unterteilt man die Leukämien in akut oder chronisch ebenso wie in myeloisch und lymphatisch. Dabei führten akute Verläufe vor der Verfügbarkeit von wirksamen Therapien binnen 5-12 Monaten zum Tode (Southam et al. 1951). Chronische Leukämien hingegen weisen zu Beginn der Erkrankung eher wenige Symptome auf und der Verlauf erstreckt sich über mehrere Jahre (Rozman und Montserrat 1995; Hehlmann et al. 2007).

Die akute myeloische Leukämie (AML) führt unbehandelt ebenfalls innerhalb kürzester Zeit zum Tod. Aktuell wird allerdings eine spezifische Klassifizierung der Erkrankung mittels morphologischer, molekularbiologischer und zytogenetischer Untersuchungen durchgeführt und dahingehend eine individuell adaptierte Therapieentscheidung getroffen. Intention ist dabei für Patient\*innen<sup>1</sup> mit gutem Allgemeinzustand stets eine kurative Therapie (Döhner et al. 2017).

Durch den stetigen Fortschritt in der Forschung in Form von Detektionen zahlreicher Mutationen und damit verbundenen neuen Therapiemöglichkeiten konnte in den vergangenen Jahrzehnten unter anderem eine Mutation im *FLT3*-Gen identifiziert werden. Diese ist Bestandteil zahlreicher Studien, da sie in 30 % aller AML-Fälle

---

<sup>1</sup> Anmerkung: Im Hinblick auf die einfachere Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit lediglich für alleinstehende Nomen das Gendersternchen, in zusammengesetzten Wörtern jedoch stets die maskuline Form verwendet. Damit sind, sofern im Text nicht anders spezifiziert, jedoch Personen jedweden Geschlechts gleichwertig inkludiert.

vorliegt und abhängig von co-existierenden Mutationen das Risiko der Patient\*innen stark variiert, was einen entscheidenden Einfluss auf die Therapiewahl hat (Thiede et al. 2002).

### 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Aktuell wird in der Routinediagnostik die *FLT3*-ITD Allel-Ratio (AR) mittels der *polymerase chain reaction* (PCR) bestimmt, wofür in der Regel peripheres Blut (PB) oder Knochenmark (KM) verwendet wird. Dabei wird sowohl das mutierte als auch das wildtypische *FLT3* Gensegment vervielfältigt und die PCR-Produkte ins Verhältnis gesetzt, um die AR zu bestimmen. Allerdings variiert die Beimengung nicht-leukämischer Blutzellen, die z.T. > 50% im Untersuchungsmaterial ausmachen und auf beiden Allelen das wildtypische *FLT3* tragen, sehr stark, so dass es zu einer relevanten Verschiebung der *FLT3*-ITD AR kommen kann. Ausschlaggebend für die Einordnung der Patient\*innen sowie die Therapieentscheidung ist die *FLT3*-ITD AR. Daher geht die vorliegende Arbeit der Fragestellung nach, ob eine vorherige Aufreinigung leukämischer Blasten zu einer relevanten Änderung der *FLT3*-ITD AR führt und somit zu einer spezifischeren Therapiestratifizierung beitragen kann.

Für diese Fragestellung konnten innerhalb der letzten 10 Jahre von 60 an einer AML erkrankten Personen (20-95% Blastengehalt) KM und PB-Proben in der Biobank der III. Medizinischen Klinik asserviert werden. Des Weiteren wird dafür die Quantifizierung des wt-*FLT3* und *FLT3*-ITD Gens mittels der GeneScan-Analyse etabliert. Nach der Aufreinigung anhand für Blasten spezifischer Oberflächen-Proteinen werden je Patientenprobe das Ergebnis der AR der konventionellen PCR mit dem der GeneScan-Analyse verglichen. Durch das Vorliegen der klinischen Daten erfolgt in einem weiteren Schritt der Abgleich mit der tatsächlich durchgeführten Therapie, deren Ansprechrate sowie dem Überleben der Patient\*innen. Sollten sich hierbei Änderungen in der Prognose für die Patient\*innen ergeben, könnte dies zukünftig einen Einfluss auf jede patientenorientierte Therapieentscheidung eines Individuums haben.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wird die Ansprechrate der zwei *FLT3*-Inhibitoren Midostaurin (PKC412) und Crenolanib auf Patientenzellen in colony-forming-unit-Assays (CFU) untersucht.

Zur Klärung der Effektivität der Inhibitoren auf leukämische Blasten wurde das Ansprechen der Inhibitoren in der bulk- Population sowie in der aufgereinigten Population betrachtet.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Akute Myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen (HSC), wobei diese ihre Fähigkeit zur Ausdifferenzierung verlieren und in eine unregulierte Proliferation übergehen (Löwenberg et al. 1999). Das Resultat ist die Erhöhung der Blasten (unreife myeloide Zellen) im Knochenmark und peripheren Blut (PB). Klinisch manifestiert sich die Erkrankung durch eine Knochenmarkinsuffizienz und eine eingeschränkte Hämatopoese mit konsekutiver Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie, wobei sich „akut“ auf den klinischen Verlauf bezieht (Estey und Döhner 2006).

Unter den Leukämien macht die AML einen Anteil von 34% aus, obwohl sie in Bezug auf alle Krebsarten weniger als 1% darstellt (Ferrara und Pinto 2007). In Deutschland und Österreich liegt die jährliche Inzidenz der AML bei 3-4 Personen pro 100.000, wobei die Inzidenz im Alter deutlich ansteigt. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren (Nagel et al. 2017). Vergleichbare Zahlen konnten Visser et al. 2012 für die damaligen EU27 Mitgliedstaaten erheben, wobei der Anteil an AML-Erkrankten mit 43% wesentlich höher liegt (Visser et al. 2012).

Die Exposition mit Substanzen, die das Erbgut schädigen (z.B. Benzol), genetische Prädispositionen wie Trisomie 21 (Down-Syndrom) aber auch radioaktive Strahlung erhöhen das Risiko an einer AML zu erkranken (Little et al. 2009). Eine Metaanalysenstudie aus dem Jahre 2014 zeigt zudem eine signifikante Relation zwischen dem Zigarettenkonsum einer Person und dem Risiko an einer AML zu erkranken (Fircanis et al. 2014). Häufig entstehen auch nach Chemotherapie (meist solider Tumore) und Radiation therapieassoziierte Leukämien (Estey und Döhner 2006). Des Weiteren können sich aus Knochenmarkerkrankungen, wie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder der myeloproliferativen Neoplasie, sekundäre Leukämien entwickeln (Weinberg et al. 2009; Guerenne et al. 2016).

## 2.2 Hämatopoetische Stammzellen

HSCs sind Vorläuferzellen im Knochenmark, aus denen sich durch Zellteilung und Differenzierung die gesamten Zellen des Blutes sowie des Abwehrsystems eines Menschen neu entwickeln können. Diese HSC sind durch das Fehlen einer terminalen Differenzierung charakterisiert und weisen in immunhistochemischen Untersuchungen den Oberflächenmarker CD34 auf (Civin et al. 1984; Katz et al. 1985). Die Fähigkeit von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem KM zur vollständigen Wiederherstellung eines hämatopoetischen Systems in einem Organismus konnten Berenson et al. bei Pavianen und Menschen zeigen (Berenson et al. 1988; Berenson et al. 1991). Im Laufe der Differenzierung zu den unterschiedlichen Blutzellreihen erfolgt der Verlust der CD34- Positivität (Hao et al. 1995).

Der Verlust der CD34- Positivität bzw. die Herunterregulation des CD34- Oberflächenmarkers wird durch das Vorliegen einer *Nukleophosmin 1 (NPM1)*- Mutation, die bei einer AML auftreten kann und nachstehend weiter thematisiert wird, begünstigt (Falini et al. 2005).

## 2.3 Zytogenetik und Molekulargenetik der AML

Die AML ist eine heterogene Funktionsstörung der hämatopoetischen Progenitorzellen, bei der in etwa 55% der Erwachsenen eine chromosomale Veränderung nachzuweisen ist (Döhner und Döhner 2008; Kindler et al. 2010). Während in der Vergangenheit die AML mit Hilfe der FAB-Klassifikation (French-American-British) eingeteilt wurde, bei der mikroskopisch auffällige Kriterien sowie Oberflächenmerkmale (Immunphänotypisierung) herangezogen werden (Bennett et al. 1985), wird heute die World Health Organization (WHO)- Klassifikation verwendet. Dabei werden zytogenetische, molekularbiologische und klinische Merkmale berücksichtigt (Vardiman et al. 2002). Insgesamt gilt ein Blastenanteil von  $\geq 20\%$  als Diagnosekriterium, woran sich zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen anschließen.

In der 2016/2017 veröffentlichten Aktualisierung der WHO-Klassifikation für AML (siehe Tabelle 1) werden nicht nur zytogenetische Aberrationen berücksichtigt, sondern auch Genmutationen in *Nukleophosmin 1 (NPM1)* und *CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)* (Kansal 2019; Arber et al. 2016).

<b>AML mit rekurrenten, genetischen Aberrationen</b>
AML mit t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17); <i>PML-RARA</i>
AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML mit t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i>
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
vorläufige Einteilung: AML mit t(9;22); <i>BCR-ABL1</i>
AML mit mutiertem <i>NPM1</i>
AML mit biallelisch mutiertem <i>CEBPA</i>
vorläufige Einteilung: AML mit mutiertem <i>RUNX1</i>
<b>AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen</b>
<b>Therapie-assoziierte myeloide Neoplasien</b>
<b>AML, nicht anderweitig charakterisiert</b>
AML mit minimaler Differenzierung
AML ohne Ausreifung
AML mit Ausreifung
Akute myelomonozytäre Leukämie
Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
Reine erythroide Leukämie
Akute megakaryoblastische Leukämie
Akute basophile Leukämie
Akute Panmyelose mit Myelofibrose
<b>Myeloisches Sarkom</b>
<b>Myeloische Proliferation bei Down Syndrom</b>
vorübergehende abnormale Myelopoese
myeloische Leukämie assoziiert mit Down Syndrom
<b>Blastische plasmazelluläre dendritische Zell Neoplasie</b>

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML) nach (Arber et al. 2016)

Hinsichtlich der Prognostik einer AML ist neben des Alters und der Leukozytenzahl im Blut auch der Karyotyp von großer Bedeutung. Anhand der Zytogenetik wurden die Patient\*innen früher in 4 Risikogruppen eingeteilt: niedrig-, intermediär I-, intermediär II- und hoch-Risikogruppe (Döhner et al. 2010; Medinger et al. 2016). Eine

## Literaturdiskussion

Überarbeitung der ELN Richtlinien aus dem Jahr 2017 fasst die intermediären Gruppen zusammen, da sie sich prognostisch, vor allem in Bezug auf ältere Menschen ( $\geq 60$  Jahre), die den Großteil dieser Gruppe darstellen, nicht signifikant unterscheiden (Döhner et al. 2017; Mrózek et al. 2012). Zur intermediären Gruppe zählen unter anderem Patient\*innen mit einem regelrechten Karyotyp, der bei etwa 40-50% der Erwachsenen mit AML zu finden ist (Mrózek et al. 2012; Döhner et al. 2017). Anhand der chromosomalen Aberrationen konnten viele Studien eine Assoziation einer kompletten Remission (CR) mit der allgemeinen Überlebensrate belegen (Grimwade et al. 1998; Bray et al. 2018; Slovak et al. 2000; Mrózek et al. 2012).

Molekulargenetisch konnten einige Veränderungen und Dysregulationen der Genexpression in der AML entdeckt werden. Die am häufigsten aufgetretenen Mutationen sind die *NPM1* Mutation, interne Tandemduplikationen (ITD) des *FMS-like tyrosine kinase (FLT3)* Gens, die *CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA)* Genmutation und die *neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog (NRAS)* Genmutation sowie die partielle Tandemduplikation (PTD) des *mixed lineage leukemia (MLL)* Gens. In etwa 50% der Fälle kommen neben des dominanten Hauptklons mindestens ein weiterer Subklon vor, so dass die einzelnen genetischen Veränderungen gleichzeitig bei einer erkrankten Person auftreten (Papaemmanuil et al. 2016). Kombinierte Mutationen und deren Häufigkeiten sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

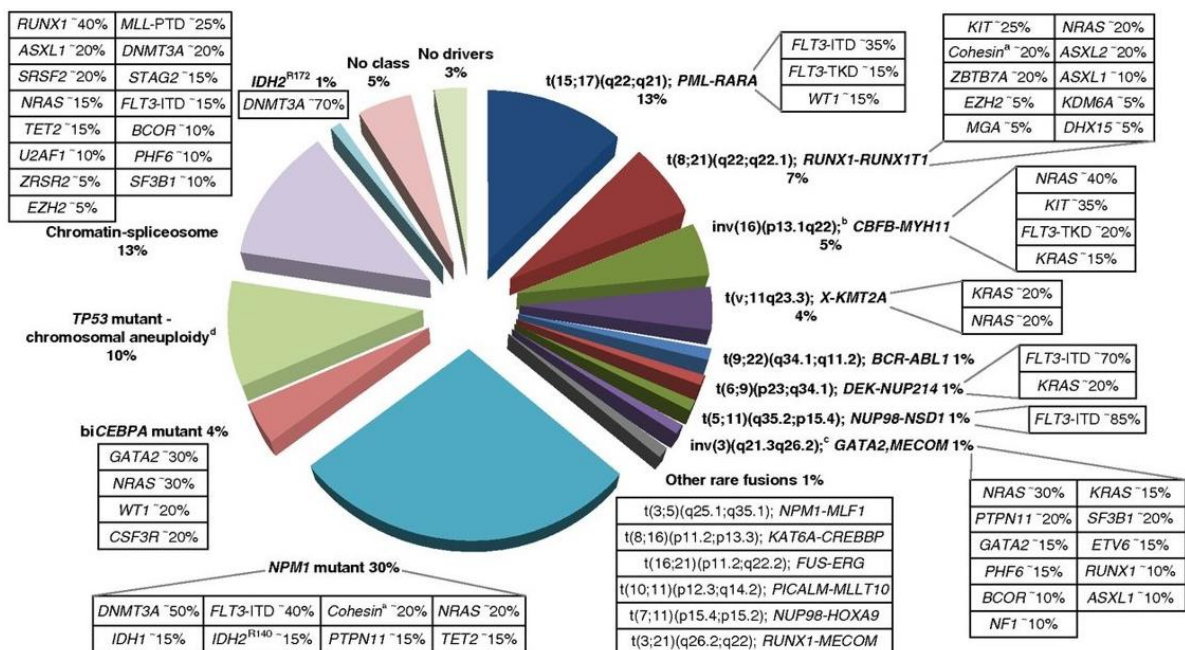


Abbildung 1: Mutationsverteilung der AML nach Döhner et al. 2017

## 2.4 Pathogenese der AML

Das ursprüngliche Modell zur Ausprägung einer AML wurde mit einem „two-hit-Modell“ begründet. Grundlage dieses Modells waren zwei komplementäre Klassen an Mutationen, die koexprimiert sein müssen, um den Phänotyp einer AML auszulösen (Gilliland et al. 2004).

Dabei verursachen Mutationen der Klasse I eine Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden mit einem konsekutiven Proliferations- und Überlebensvorteil für hämatologische Vorläuferzellen (Fröhling et al. 2005). An murinen KM-Transplantationsmodellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *FLT3*-ITD (Lee et al. 2007) sowie das konstitutiv aktivierte *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)*-Gen (Chan et al. 2003) jeweils zu einer Myeloproliferation führen, jedoch beide allein nicht ausreichen, um das Vollbild einer AML auszubilden. Weitere zur Klasse I gehörende Mutationen sind: *FLT3*-TKD, *CKIT*, *NRAS* (Gilliland und Griffin 2002b).

Durch Klasse-II-Mutationen sind Transkriptionsfaktoren oder Koaktivierungskomplexe der Transkription betroffen, die zu einer Beeinträchtigung der Zelldifferenzierung führen. Ein Beispiel für eine solche Klasse-II-Mutation ist die Translokation  $t(8;21)(q22;q22)$  mit einer Expression des Fusionsgens *RUNX1/RUNX1T1 (runt-related transcription factor)*. Dieses führt zu einer Anhäufung unreifer myeloischer Vorläuferzellen (Fenske et al. 2004). Allerdings reichen alleinige Mutationen der Klasse II nicht aus, um den Phänotyp einer AML auszulösen (Schessl et al. 2005; Gilliland und Griffin 2002b). Zu Klasse-II-Mutationen zählen unter anderem *MLL*-Fusionsgene, *AML1-ETO* Fusionen (Yuan et al. 2001; Gilliland und Griffin 2002a), *CEBPA*-Mutationen und *NPM1*-Mutationen (Ley et al. 2013; Kouchkovsky und Abdul-Hay 2016).

Schessl et al. zeigten anhand eines „in vivo“ Mausmodells, dass durch die funktionelle Interaktion einer *FLT3*-ITD (Klasse-I-Mutation) und der Expression des *RUNX1/RUNX1T1* (Klasse-II-Mutation) eine aggressive AML ausgelöst wird. Auch in diesem Mausmodell konnten die Mutationen allein nicht zur Ausprägung einer AML führen (Schessl et al. 2005).

Durch stetige Forschung an der Pathogenese der AML konnte das „two-hit-Modell“ in den letzten Jahren spezifiziert werden, so dass aufgrund neue Erkenntnisse aktuell



## Literaturdiskussion

neun Mutationsklassen unterschieden werden (Metzeler et al. 2016; Papaemmanuil et al. 2016; Paschka et al. 2010; Kouchkovsky und Abdul-Hay 2016):

1. Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden (*FLT3*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, u.a.)
2. Mutationen in Genen der DNA-Methylierung (*TET1*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3B*, *DNMT1*, *DNMT3A*)
3. Chromatin-Modifikatoren Mutationen (*mixed-lineage leukemia* – partial tandem duplication (*MLL-PTD*), *additional sex combs like 1* (*ASXL1*), u.a.)
4. *NPM1*-Mutationen
5. aktivierende Mutationen von myelischen Transkriptionsfaktoren (*RUNX1*, *CEBPA*, u.a.)
6. Fusionen von Transkriptionsfaktor-Genen (*promyelocytic leukemia - retinoic acid receptor alpha* (*PML-RARA*), *myosin heavy chain 11 – core binding factor subunit b* (*MYH11-CBFB*), u.a.)
7. Mutationen in Tumorsuppressorgenen (*TP53*, *WT1*, u.a.)
8. Spliceosomen-Mutationen
9. Kohesin-Komplex-Mutationen (*SMC1S*, u.a.)

Deren Häufigkeitsverteilungen sind in Abbildung 2 und Abbildung 3 zu erkennen. Die untersuchten Kohorten der Studien betrug 1540 bzw. 200 Patient\*innen (Ley et al. 2013; Papaemmanuil et al. 2016).

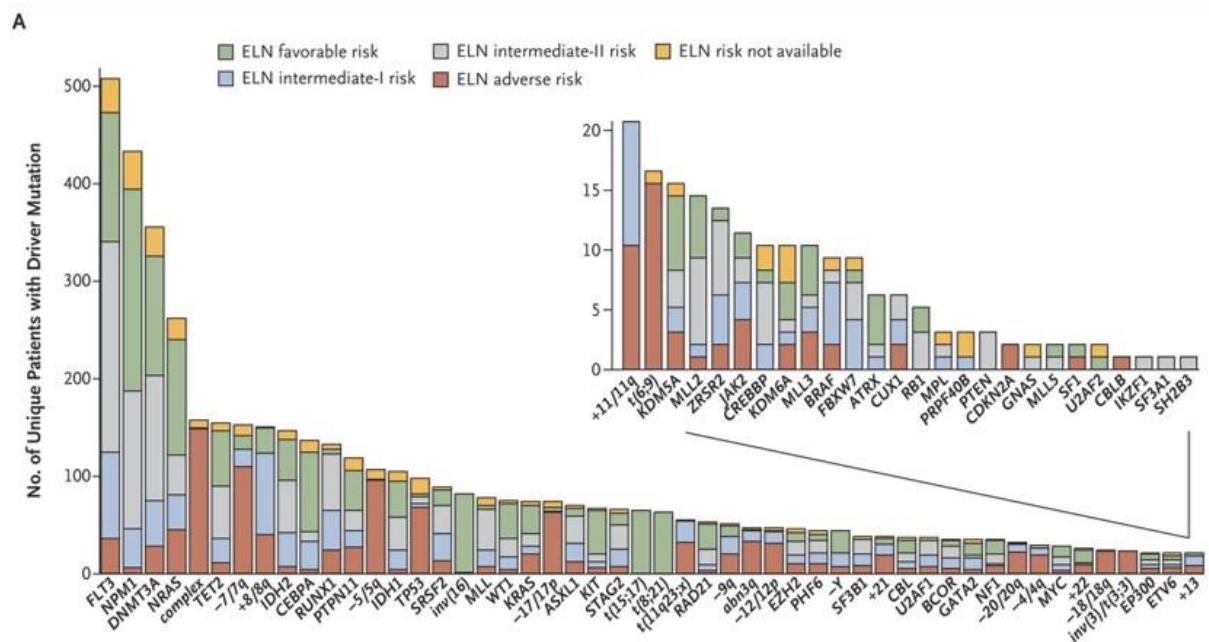


Abbildung 2: Häufigkeitsverteilung der Mutationen einer AML (n = 1540) (Papaemmanuil et al. 2016)

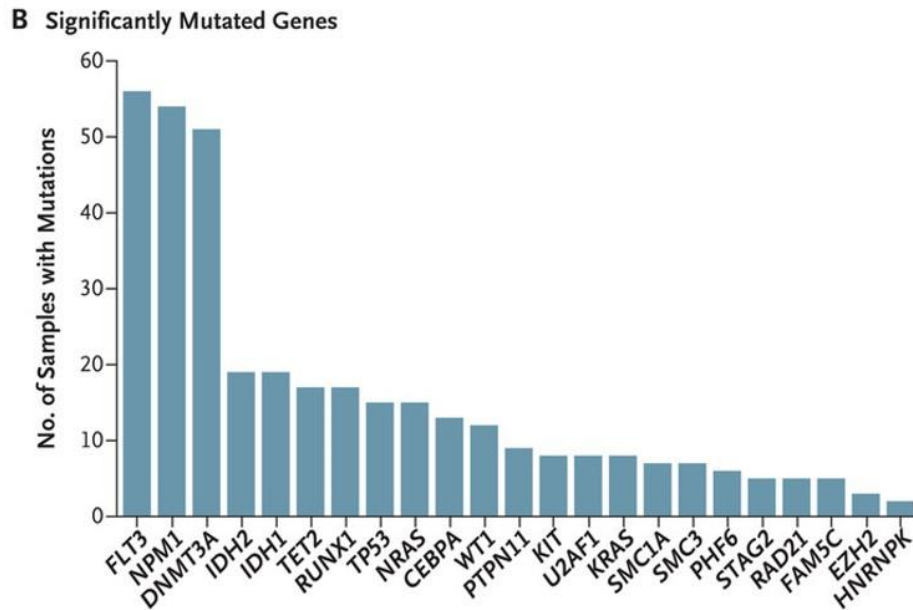


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der Mutationen einer AML (n = 200) (Ley et al. 2013)

Trotz der erheblichen Fortschritte in der Erforschung der Pathogenese einer AML gibt es bezüglich der Bedeutung jeder einzelnen Mutation für die Entwicklung einer AML noch zu klärende Fragen. Wie schon im „two-hit-Modell“ beschrieben, hängen die Pathogenese sowie das Verhalten einer AML stark von den Wechselwirkungen zwischen verschiedenen somatischen Veränderungen und chromosomalen Umlagerungen ab (Kouchkovsky und Abdul-Hay 2016). Dabei besitzen Patient\*innen im Durchschnitt 5 wiederkehrende Mutationen pro Klon, jedoch können in einem erkrankten Menschen mehrere unterschiedliche Leukämieklone vorliegen, was die Therapieentscheidung erschwert und das Risiko eines Rezidivs erhöht (Ley et al. 2013; Metzeler et al. 2016)

## 2.5 Die Rezeptortyrosinkinase *FLT3*

Das Gen für die Rezeptortyrosinkinase *FLT3* liegt auf dem Chromosom 13q12 bis 13q13 (Carow et al. 1995). Aktivierende Mutationen dieses *FLT3*-Gens sind bei der AML mit 30-40% relativ häufig und haben eine prognostisch schlechtere Bedeutung für die Erkrankung (Schlenk et al. 2008).

Der Genabschnitt besteht aus 24 Exons mit einer Größe zwischen 83 und 562 bp (Abu-Duhier et al. 2001). Insgesamt enthält das Gen ca. 100 kb, so dass der Rezeptor aus 993 Aminosäuren zusammen gesetzt ist (Lagunas-Rangel und Chávez-Valencia 2017; Rosnet et al. 1991).

Der *FLT3*-Rezeptor gehört zu der Gruppe III der Tyrosinkinasen und wird auch als fetal liver kinase 2 (FLK2), cluster of differentiation antigen 135 (CD135) oder stem cell kinase 1 (STK1) bezeichnet. Dieser membrangebundene Rezeptor (Abbildung 4) besteht aus 5 Immunglobulin-ähnlichen Regionen, die extrazellulär liegen. Des Weiteren besitzt er eine transmembranäre Domäne (TMD), eine zytoplasmatisch-juxtamembranäre Domäne (JMD) und eine Tyrosinkinase Domäne. Letztere ist durch ein Kinase-Insert (KI) in zwei Teile (TK1 und TK2) untergliedert (Agnès et al. 1994). Neben dem *FLT3*-Rezeptor zählen auch der *c-KIT* (stem cell factor-Rezeptor), *c-FMS* (macrophage colony-stimulating factor-Rezeptor) sowie *PDGFR A* und *B* (platelet derived growth factor-Rezeptor) zu den Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Matthews et al. 1991).

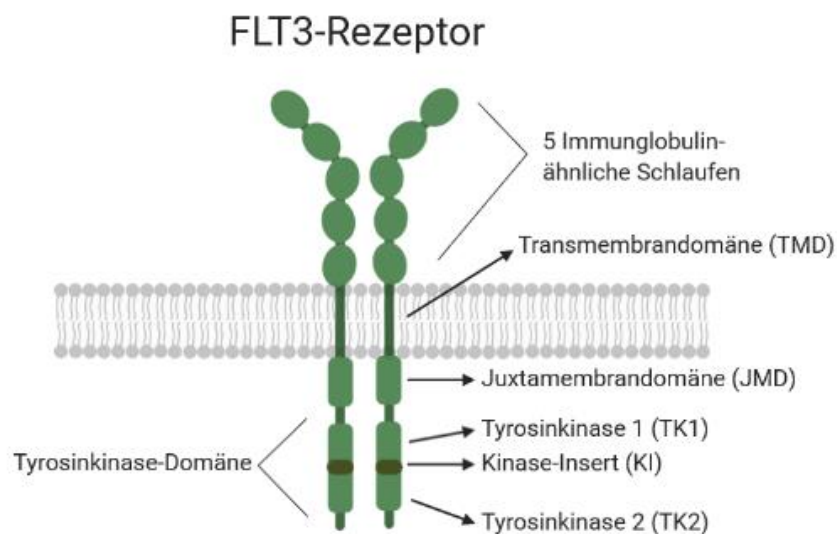


Abbildung 4: *FLT3*-Rezeptor (eigene Darstellung)

Diese Tyrosinkinase-Rezeptoren werden durch die Bindung ihres spezifischen Liganden aktiviert und können dadurch ein extrazelluläres Signal in ein intrazelluläres Signal umwandeln. Die *FLT3* Rezeptortyrosinkinase wird durch den *FLT3*-Liganden (FL) aktiviert, so dass es zu Dimerisierung des Rezeptors, einer Stabilisierung der offenen Konformation und einer anschließenden Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste kommt (Turner et al. 1996). Intrazellulär führt dies zur Aktivierung der *FLT3*-Kinase und nachgeschalteter Signalwege mittels signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), RAS/mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K/AKT) (Zhang et al. 2000). Diese Signaltransduktion bedingt eine Zelldifferenzierung sowie -proliferation.

Gegen eine Überaktivierung dieses Signalweges existiert ein Kontrollmechanismus der juxtamembranären Domäne. Die Tyrosinreste der JMD können durch Tyrosin-Phosphatasen dephosphoryliert werden, wodurch die JMD ihre autoinhibitorische Struktur wieder annehmen kann und dadurch die katalytische Funktion der Kinase gehemmt wird (Griffith et al. 2004; Chan et al. 2003; Kindler et al. 2010).

Vor allem in den unreifen Vorläuferzellen der Hämatopoese, wie den CD34<sup>+</sup>-Zellen und lymphatischen Vorläuferzellen, wird der *FLT3*-Rezeptor exprimiert. Allerdings ist er auch in den Zellen der Gonaden, des Gehirns sowie der Plazenta zu finden (Maroc et al. 1993). Dabei spielt er eine zentrale Rolle in der Hämatopoese ebenso wie in der Entwicklung des Immunsystems. Der *FLT3*-Rezeptor sorgt durch Zellproliferation für die Aufrechterhaltung des Stammzellpools und wirkt an der Differenzierung der Zellen sowohl in der hämatopoetischen als auch der lymphatischen Reihe mit (Sitnicka et al. 2003; Adolfsson et al. 2001). In einem Mausmodell konnten McKenna et al. zeigen, dass aus einem Fehlen des FL eine verminderte Hämatopoese mit niedrigen dendritischen Zellen, Killerzellen sowie hämatopoetischen Vorläuferzellen resultiert (McKenna et al. 2000). In einem in-vitro Zellkultursystem konnte Harada et al. nachweisen, dass die Bindung des FL an den *FLT3*-Rezeptor den Prozess der Proliferation von CD34<sup>+</sup>-Zellen und die Reifung von dendritischen Zellen begünstigt (Harada et al. 2007).

Insgesamt lässt sich sagen, dass der *FLT3*-Rezeptor eine essenzielle Rolle in der Regulation der Proliferation, Differenzierung sowie der Apoptose hämatopoetischer Stammzellen einnimmt.

## 2.6 *FLT3* in der AML

In leukämischen Blasten ist die sonst physiologische *FLT3*-Expression in hämatologischen Vorläuferzellen aufgrund von Mutationen deutlich erhöht. Viele Studien konnten solche erhöhten *FLT3*-Expressionslevel bei Patient\*innen mit einer AML, B-ALL, APL, CML und teilweise bei T-ALL nachweisen (Cheng et al. 2018; Lilakos et al. 2006; Griffith et al. 2016). Schon im Jahre 1996 konnten Carow et al. nicht nur erhöhte *FLT3*-Proteine, sondern auch *FLT3*-RNA in Patient\*innen mit einer AML nachweisen (Carow et al. 1996). Kuchenbauer et al. untersuchten mittels „Real Time PCR“ die *FLT3*-Transkriptionslevel von AML-Patient\*innen und verglichen diese mit gesunden Knochenmarkspendenden. Dabei konnte eine erhöhte *FLT3*-Expression bei den AML-Patient\*innen nachgewiesen werden, die signifikant mit der Anzahl an myeloischen Blasten und Leukozyten korreliert (Kuchenbauer et al. 2005). Die Bedeutung der Stimulation des *FLT3*-Rezeptors durch seinen Liganden für die AML liegt vor allem in dem antiapoptotischen Effekt mit konsekutiver Proliferation (Stirewalt und Radich 2003).

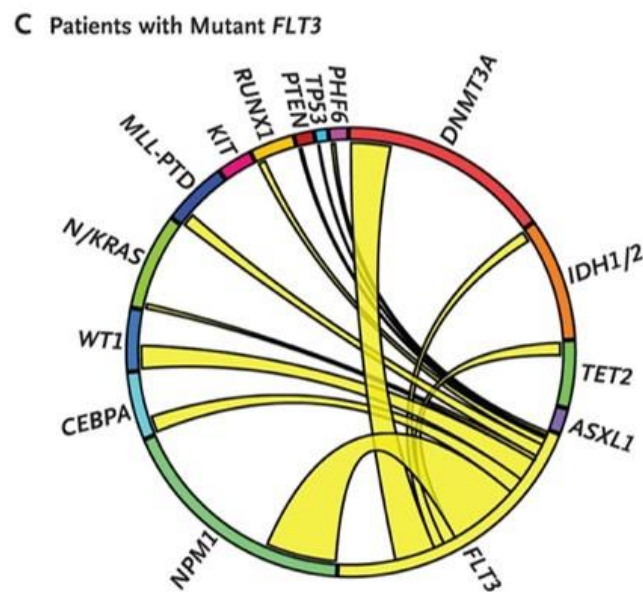


Abbildung 5: Koexistierende Mutationen bei Vorliegen einer *FLT3*-Mutation (Patel et al. 2012)

In den meisten Fällen koexistieren weitere Mutationen bei Vorliegen einer *FLT3*-Mutation, was in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist. Die Koexistenz einer *NPM1*-Mutation bei vorliegender *FLT3*-Mutation ist am häufigsten vorzufinden, wie an der Dicke der verbindenden Balken deutlich zu erkennen ist (Patel et al. 2012).

## 2.7 Interne Tandemduplikation des *FLT3*-Rezeptors

Mit 30% zählt eine Mutation des *FLT3*-Gens zu den häufigsten in der AML. Darunter lassen sich drei aktivierende Mutationen unterscheiden: Interne Tandemduplikationen des *FLT3*-Gens (*FLT3*-ITD) mit 20-30% aller AML-Patient\*innen, Punktmutationen der Tyrosinkinasedomäne (*FLT3*-TKD) in 5-10% der Fälle (Thiede et al. 2002; Stirewalt und Radich 2003) und Punktmutationen der juxtamembranären Domäne in ca. 2% (*FLT3*-JM-PM) (Reindl et al. 2006).

Die interne Tandemduplikation des *FLT3*-Gens wurde erstmals 1996 von Nakao et al. beschrieben (Nakao et al. 1996) und seither vielseitig untersucht, um sie besser verstehen zu können. *FLT3*-ITDs liegen in der juxtamembranären Domäne des *FLT3*-WT-Gens auf Exon 14 oder 15 (Abu-Duhier et al. 2001). Die Länge der internen Duplikationen variiert von 3 bis über 402 bp, wobei diese stets ein Vielfaches von drei Basenpaaren darstellen und somit immer eine in-frame Mutation vorliegt (Stirewalt und Radich 2003; Schnittger et al. 2002; Abu-Duhier et al. 2000). Dabei inserieren die *FLT3*-ITDs nicht nur in der JM-Domäne, sondern in ca. 30% der Fälle auch im beta1 Faltblatt der TKD1 (Breitenbuecher et al. 2009; Kayser et al. 2009). Kayser et al. konnten nachweisen, dass Patient\*innen mit einer ITD im beta1-Faltblatt der TKD1 ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben sowie rezidivfreies Überleben im Vergleich zu allen anderen Insertionsstellen aufweisen (Kayser et al. 2009). Bei Insertionsstellen außerhalb der JM-Domäne erfolgt eine konsekutive Hochregulation des antiapoptotischen Proteins MCL1 (induced myeloid leukemia cell differentiation protein), was Breitenbuecher et al. als mögliche Ursache einer Therapieresistenz ansehen (Breitenbuecher et al. 2009).

Die Folge einer Mutation/Insertion im *FLT3*-Gen ist die Änderung der Aminosäuresequenz, welche in einer Unterbrechung der Autoinhibition des *FLT3*-Rezeptors resultiert (Griffith et al. 2004). Dadurch kommt es zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung mit Autophosphorylierung und Aktivierung konsekutiver Signalkaskaden wie STAT5, RAS/AKT und MAPK (Choudhary et al. 2007; Kiyoi et al. 2002; Okamoto et al. 2007).

## 2.8 Prognose für AML Patient\*innen mit einer *FLT3*-ITD

Verschiedene Studien konnten bei einer AML mit *FLT3*-ITD ein schlechteres progressionsfreies Überleben und eine erhöhte Rezidivrate nachweisen (Abu-Duhier et al. 2000; Rombouts et al. 2000). Darüber hinaus konnten weitere Studien ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben zeigen (Kottaridis et al. 2001; Fröhling et al. 2002).

Für eine bessere Risikostratifizierung der AML wurde die *FLT3*-ITD AR definiert. Diese bildet das Verhältnis zwischen der „Fläche unter der Kurve“ (AUC, von engl. „area under the curve“) der Mutation und der AUC des wt (wild-typischen) Allels ab. Sollte mehr als eine Mutation vorhanden sein, werden die einzelnen Mutationen addiert und gemeinsam ins Verhältnis zu den wt-Allelen gesetzt (Schlenk et al. 2014; Sakaguchi et al. 2018). Dabei ist die *FLT3*-ITD AR ausschlaggebend für die Risikoermittlung. Sobald die AR  $\geq 0,5$  beträgt, haben die betroffenen Patient\*innen ein schlechteres prädiktives *overall survival* (OS) und *relapse-free survival* (RFS). Bei einer AR  $< 0,5$  haben Patient\*innen ein niedrigeres Risiko und ein besseres prädiktives Outcome (Gale et al. 2008; Schlenk et al. 2014; Döhner et al. 2017). Liegt bei der *FLT3*-ITD die Insertionsstelle in der TKD1, so gilt dies als zusätzlich ungünstiger Faktor (Schlenk et al. 2014).

Ob die ITD-Länge einen Einfluss auf das OS und RFS hat, wird in vielen Studien untersucht. Erste Ergebnisse lassen darauf schließen, dass längere ITD mit einem signifikant kürzerem OS und RFS assoziiert sind. Allerdings konnte noch kein exakter „cut-off“-Wert ermittelt werden, ab welcher Länge eine ITD zur Gruppe der ungünstigeren Prognose zu zählen ist. Die aktuellen Studien verwenden für den „cut-off“-Wert meist den Median der ITD-Länge ihrer untersuchten Studienkohorte, so dass dieser stark variiert und zwischen 39 und 70 bp liegt (Chen et al. 2020; Kim et al. 2015; Liu et al. 2019).

## Literaturdiskussion

---

Auch wenn bei Vorliegen einer *FLT3*-ITD der *NPM1* Mutationsstatus keinen Einfluss auf das OS von Patient\*innen hat (*NPM1*<sup>mut</sup> 39±4%; *NPM1*<sup>wt</sup> 39±8%), lässt sich ein signifikanter Unterschied bezogen auf das OS zwischen *NPM1*- mutierten Patient\*innen in Abhängigkeit von deren *FLT3*-ITD Mutationen feststellen (*FLT3*-ITD<sup>mut</sup> 39±4%; *FLT3*-ITD<sup>wt</sup> 71±4%). Dadurch lassen sich bezüglich des OS und RFS folgende Zuordnungen in die Risikogruppen ermöglichen (Versluis et al. 2017; Döhner et al. 2017):

- Vorteilhaftes Outcome bei *NPM1*<sup>mut</sup> und *FLT3*-ITD<sup>wt</sup>/*FLT3*-ITD<sup>low ratio</sup>
- Intermediäre Risikogruppe bei *NPM1*<sup>wt</sup> und *FLT3*-ITD<sup>wt</sup>/*FLT3*-ITD<sup>low ratio</sup> oder *NPM1*<sup>mut</sup> und *FLT3*-ITD<sup>high ratio</sup>
- Hochrisikogruppe bei *NPM1*<sup>wt</sup> und *FLT3*-ITD<sup>high ratio</sup>



## 2.9 Therapie der AML

Die aktuelle Therapie der AML basiert auf einer Induktionstherapie (evtl. Doppelinduktionstherapie) mit anschließender risikoadaptierter Postremissions-therapie.

Seit den 1970er Jahren ist die Induktionstherapie der AML weitestgehend gleichgeblieben. Diese setzt sich aus Cytarabin (*Cytosin arabinosid*) und einem Anthrazyklin/Anthracendion zusammen und wird auch „7+3“-Regime genannt. Dabei wird Cytarabin von Tag 1-7 mit einer Dosis von 100-200 mg/m<sup>2</sup> kontinuierlich per Infusion verabreicht und an Tag 1-3 ein Anthrazyklin/Anthracendion (z. B. Daunorubicin 60 mg/m<sup>2</sup>, Idarubicin 10-12 mg/m<sup>2</sup> oder Mitoxantron 10-12mg/m<sup>2</sup>) hinzu gegeben (Yates et al. 1973; Burnett et al. 2015; Pautas et al. 2010; Löwenberg et al. 2011). Durch das „7+3“-Regime wird eine komplette Remission (CR) bei jungen Erwachsenen (< 60 Jahre) in 60% bis 80% und bei älteren Erwachsenen (≥ 60 Jahre) in 40% bis 60% der Fälle erreicht (Dombret und Gardin 2016). Als CR gilt, wenn im KM der Patient\*innen <5% Blasten und keine Auerstäbchen nachgewiesen werden können. Außerdem muss die Blutanalyse ≥1.000 Neutrophile/μl Blut und ≥100.000 Thrombozyten/μl Blut sowie keine frei zirkulierenden Blasten bestätigen. Des Weiteren darf keine extramedulläre Manifestation der Leukämie vorliegen und die Patient\*innen müssen unabhängig von Bluttransfusionen sein, jedoch sind keine konkreten Hämoglobin- bzw. Hämatokritwerte festgelegt (Cheson et al. 2003).

Neuere Studien diskutieren eine Induktionstherapie nach der CPX-351-Formel, bei der Cytarabin und Daunorubicin in einer 5:1 molaren Ratio gegeben werden, was 100 mg/m<sup>2</sup> Cytarabin und 44 mg/m<sup>2</sup> Daunorubicin entspricht (Lancet et al. 2014). Für die Patientensubgruppen der therapieassoziierten AML (tAML) und Myelodysplasie-assoziierten AML (AML-MRC) wird seit einigen Jahren die Behandlung nach der CPX-351-Formel empfohlen (Lancet et al. 2018).

Stone et al. konnten in einer randomisierten Placebo-Studie nachweisen, dass die Gabe von Midostaurin (Multikinase-Inhibitor) bei *FLT3*-mutierten Patient\*innen eine signifikante Verlängerung auf das OS (P=0.009) sowie das EFS (P=0.002) hatte (Stone et al. 2017). Die dafür verwendete Dosis von 50 mg Midostaurin p.o. zweimal täglich für 14 Tage, beginnend an Tag 8 direkt nach der Induktionschemotherapie, konnten Stone et al. in früheren Studien erarbeiten und in Abhängigkeit der Nebenwirkungen festlegen (Stone et al. 2012).

Für Patient\*innen in der CR muss eine Postremissionstherapie (PRT) eingeleitet werden, da anderenfalls schnelle Rezidive zu erwarten sind. Die Wahl der sogenannten Konsolidierungstherapie hängt vom patientenindividuellen Allgemeinzustand und Risikoprofil der AML ab und kann in Form einer allogenen Stammzelltransplantation (alloHSCT) oder mit hochdosiertem Cytarabin ( $3000 \text{ mg/m}^2$ ) erfolgen. Bei der hochdosierten Cytarabin Therapie als PRT konnten jedoch weder überzeugende Vorteile der hohen Dosis von  $3000 \text{ mg/m}^2$  gegenüber der intermediären Dosis von  $1000\text{-}1500 \text{ mg/m}^2$  noch konkrete Applikationszyklen durch Studien belegt werden (Döhner et al. 2017). Als alternative Konsolidierungstherapie zu dem hochdosierten Cytarabin steht die myeloablative Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation (autoHSCT) zur Verfügung, da sie eine ähnlich niedrige therapieassoziierte Mortalität aufweist. Allerdings ist das Rezidivrisiko im Vergleich zur alloHSCT deutlich erhöht und bislang konnte keine Überlegenheit im OS gegenüber hochdosiertem Cytarabin gezeigt werden (Zuckerman et al. 2016). Die alloHSCT sollten Patient\*innen mit ungünstiger Zytogenetik oder einer *FLT3*-ITD AR  $\geq 0,5$  als PRT erhalten. Der Transplantationserfolg ist dabei unter anderem vom Krankheitsrisiko, Begleiterkrankungen und dem Risiko der Transplantation an sich abhängig, so dass selbst für Patient\*innen aus der intermediären Risikogruppe eine frühzeitige Diskussion mit einem Transplantationsteam angestrebt werden sollte (Cornelissen et al. 2012; Sureda et al. 2015). Verluis et al. führten eine Studie durch, die ein besseres Outcome für Patient\*innen der intermediär Risikogruppe nach einer alloHSCT nachweist (Verluis et al. 2017). Eine Studie von Sakaguchi et al. zeigt ein signifikant besseres Outcome für alle Patient\*innen, die unabhängig der *FLT3*-ITD AR und des *NPM1* Status eine alloHSCT in der kompletten Remission 1 (CR1) erhalten haben (Sakaguchi et al. 2018).

Nach den aktuellen Therapieempfehlungen wird für Patient\*innen mit *FLT3*-TKD-Mutation oder *FLT3*-ITD AR  $< 0,5$  als Konsolidierung eine Cytarabin-basierte Chemotherapie mit fortgeführter (wenn schon in Induktionstherapie begonnen) Midostaurin Gabe von  $50 \text{ mg p.o.}$  zweimal täglich verabreicht. Anschließend sollte eine Midostaurin-Erhaltungstherapie über 12 Zyklen à 28 Tage angestrebt werden (Stone et al. 2017; Schlenk et al. 2019). Vor allem bei Patient\*innen mit einer *FLT3*-ITD AR  $\geq 0,5$ , aber auch bei anderen Patient\*innen nach individueller

Risikoprofilabwägung wie beispielsweise *NPM1*-Status oder *AZ*, sollte in der ersten CR eine alloHSCT angestrebt werden.

Im Rahmen der SORMAIN-Studie konnte für alle *FLT3*-ITD positiven Patient\*innen, die in der ersten CR eine alloHSCT erhielten, gezeigt werden, dass durch eine Erhaltungstherapie mit Sorafenib das Risiko eines Rezidivs oder des Todes um 61% senkt, sowie das OS signifikant verlängert wird (HR 0,45) (Burchert et al. 2018). Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Sorafenib Erhaltungstherapie für eine Dauer von 2 Jahren, beginnend ab Tag 60-100 nach Transplantation, für oben genannte Patientengruppe empfohlen.

Neben den oben genannten Inhibitoren Sorafenib und Midostaurin werden speziell für die AML mit *FLT3*-Mutationen zahlreiche weitere potente und teilweise auch selektive Hemmstoffe der *FLT3* Tyrosinkinase-Aktivität untersucht, wobei diese meist direkte Inhibitoren (FLT3i) der Kinase sind (Kindler et al. 2010; König und Santos 2015). Dies sind niedermolekulare Inhibitoren (small molecules), die in Monotherapien oder aber in Kombination mit Chemotherapeutika untersucht werden. In den aktuellen Forschungsarbeiten sind erste Anzeichen erkennbar, dass FLT3i für die physiologische Hämatopoese weniger schädlich sind als DNA-interkalierende Chemotherapeutika (Grunwald und Levis 2015). Die FLT3i lassen sich in zwei Generationen einteilen, wobei zu der ersten Generation unter anderem Midostaurin (PKC412), Lestaurtinib (CEP-701), Sorafenib (BAY43-9006), Tandutinib (MLN518), Semaxanib und Sunitinib (SU11248) zählen (Kindler et al. 2010). Die zweite Generation an FLT3i weist sowohl eine höhere *FLT3*-Selektivität als auch größere und länger anhaltende Erfolge in der AML Behandlung auf. Bekannte Inhibitoren dieser Generation sind Gilteritinib, KW-2449, Crenolanib (CP-868,596) und Quizartinib (AC 220) (Larrosa-Garcia und Baer 2017; Daver et al. 2019). Alle FLT3i können allerdings auch nach ihrem Inhibitionsverhalten mit dem *FLT3*-Rezeptor eingeteilt werden (Ke et al. 2015). Dabei binden Typ I- Inhibitoren an die ATP-Bindungsstelle, wenn der Rezeptor aktiviert ist, während Rezeptoren des Typs II mit einer hydrophoben Region direkt neben der ATP-Bindungsstelle interagieren, die nur im inaktiven Zustand des Rezeptors zugänglich ist (Daver et al. 2019). Weitergehend zeigt sich, dass Typ I- Inhibitoren sowohl den Signalweg bei *FLT3*-ITD als auch *FLT3*-TKD mutierter AML hemmen, wohingegen Typ II- Inhibitoren lediglich *FLT3*-ITD Mutationen hemmen. Anhand dieser Eigenschaften lassen sich die Inhibitoren Sunitinib, Lestaurtinib,

Midostaurin, Crenolanib und Gilteritinib dem Typ I zuordnen und Sorafenib, Quizartinib und Ponatinib dem Typ II (Larrosa-Garcia und Baer 2017).

Klinische Ergebnisse der *FLT3*-Inhibitoren in Einzel- oder Kombinationstherapien werden in zahlreichen Studien untersucht. So konnte für den Multikinaseinhibitor Midostaurin (PKC412) in einer randomisierten, kontrollierten Phase 3 Studie ein signifikant verlängertes OS und EFS gezeigt werden (Stone et al. 2017). Diese und aus weiteren Studien herausgearbeitete Ergebnisse führten dazu, dass Midostaurin in die aktuellen Therapieempfehlungen bei *FLT3*-mutierten AML-Patient\*innen aufgenommen wurde (Kim und Williams 2018; Döhner et al. 2017).

Crenolanib, welches ursprünglich als *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR)-Inhibitor entwickelt wurde (Lewis et al. 2009), zeigte vielversprechende Ergebnisse sowohl bei *FLT3*-ITD als auch bei *FLT3*-TKD Mutationen und wird daher auch wie oben erwähnt dem Typ I an Tyrosinkinase-Inhibitoren zugeordnet (Galanis et al. 2014; Smith et al. 2014). Obgleich Inhibitoren des Typs I oftmals unselektiv sind (Liu und Gray 2006), hemmt Crenolanib *FLT3*-ITD und die TKD-Mutante circa 100-fach potenter als *c-KIT*. Diese Eigenschaft ist besonders relevant, da eine kombinierte Hemmung von *FLT3* und *c-KIT* schädlich für die physiologische Hämatopoese ist (Smith et al. 2014; Galanis et al. 2014; Zimmerman et al. 2013). Zwei Studien konnten einen positiven Effekt auf das OS von Crenolanib als zusätzliches Therapeutikum in refraktären AML bzw. für Rezidivbehandlungen feststellen. Dabei kommen Idarubicin und hochdosiertes Cytarabin (Ohanian et al. 2016) bzw. hochdosiertes Cytarabin in Kombination mit Mitoxantron (HAM) (Iyer et al. 2016) zum Einsatz. Eine andere aktuelle Studie zeigt zudem einen synergistischen Effekt von Crenolanib in Kombination mit auf *FLT3* zielgerichtet T-Zellen (Jetani et al. 2018).

Perspektivisch ist ein großes Ziel der Inhibitorenentwicklung ein Molekül, welches *FLT3*-ITD und *FLT3*-TKD hemmt, wobei andere Kinasen – vor allem *c-KIT* – nicht inhibiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav		Systemec GmbH, Wettenberg
Brutschrank	CB150	Binder, Tuttlingen
eukaryotische Kultur		
Brutschrank	Typ 6200	Heraeus, Hanau
prokaryotische Kultur		
Biologische Sicherheitswerkbank	HeraSafe KS18	Thermo Scientific Waltham, MA, United States of America
Computer	Optiplex GX 620	Dell Inc., Round Rock, TX, United States of America
Dreidimensionaler Taumelrollmischer		Keison products, Chelmsford, United Kingdom
Durchflusszytometer	FACS Canto	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
Elektrophorese-System vertical	Mini-Protean 3	BioRad, München
Erlenmeyer-Kolben	50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Geldokumentationssystem	Transilluminator IPCEFO1-SO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, United States of America
Genetic Analysis System	CEQ 8000	Beckman Coulter/Sciex, Framingham, USA)
Kühlschrank 4°C	Glass-Line KGK 4055	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Kühlschrank -20°C	Froster 520	Philipp Kirsch GmH, Offenburg
Kühlschrank -80°C	U570-86 New Brunswick™	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer	MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Messbecher	50 ml, 100 ml, 500 ml	Schott AG, Mainz
Messkolben	500 ml, 1000 ml, 2000 ml	Schott AG, Mainz

## Material und Methoden

<b>Messzylinder</b>	50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml	Nalgene, Rechester, NY, United States of America
<b>Mikroskop</b>	CHT	Olympus Corp. Shinjuku, Tokyo, Japan
<b>Mikrowelle</b>	R-937-IN	Sharp Corp., Abeno-ku, Osaka, Japan
<b>Netzgerät</b>	Power Pac 200	BioRad, München
<b>Neubauerzählkammer</b>		Neolab, Heidelberg
<b>PCR-Gerät</b>	iCycler Thermo Cycler	BioRad, München
<b>Pipetten</b>	PIPETMAN Classic™ P10, P20, P100, P1000	Gilson Inc, Middleton,WI, United States of America
<b>Pipetten</b>		Eppendorf
<b>Pipettierhilfe</b>	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt
<b>Pipettierhilfe</b>	Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
<b>RT-PCR-Cycler</b>	Light Cycler 480	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
<b>Schüttelapparat</b>	3017, mit Kreisbewegung	GFL, Burgwedel
<b>Schüttler</b>	7-2020 Vortex	Neolab, Heidelberg
<b>Stickstofftank</b>	EuroCyl 230/4 SB TPED	Chart Ferro, Decin, Tschechische Republik
<b>Thermomix</b>	Thermomixer	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, United States of America
<b>Tischzentrifuge</b>	Rotilabo® Mini-centrifuge	CarlRoth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>Waage</b>	U4100; ISO-9001	Satorius AG, Göttingen
<b>Waage</b>	SE-203-LW	VWR science education Radnor, PA, United States of America
<b>Wasseraufbereitungsanlage</b>	Astacus	membraPure GmbH, Bodenheim
<b>Wasserbad</b>	WB-10	P-D-Industries GmbH, Dresden
<b>Wasserbad</b>	Sw-20c	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
<b>Wasserbad</b>	3047	Köttermann Systemlabor, Uetze/Hänigen
<b>Zentrifuge</b>	Heraeus Multifuge 3s	Thermo Scientific Waltham, MA, United States of America

## Material und Methoden

<b>Zentrifuge</b>	Heraeus Multifuge 3sr	Thermo Scientific Waltham, MA, United States of America
<b>Zentrifuge</b>	Heraeus Biofuge Fresco	Thermo Scientific Waltham, MA, United States of America
<b>Zentrifuge</b>	Sorvall® RC6 Plus	Thermo Scientific Waltham, MA, United States of America

Tabelle 2: Geräte und Zubehör in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.2 Chemikalien/Substanzen

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</b>	HEPES	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, United States of America
<b>Agarose StarPure Standard</b>	500 g	Stoss-Medica GmbH, Wiesbaden
<b>β-Mercaptoethanol</b>	unsteril	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, United States of America
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Gibco®, steril, 50 mM, Zellkultur geeignet	Life technologies, Carlsbad, CA, United States of America
<b>Biozym LE Agarose</b>	500 g	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
<b>Bovines Serum Albumin</b>	BSA, lyophilisiertes Pulver	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, United States of America
<b>Bromphenolblau</b>		Merck KGaA, Darmstadt
<b>Clean Solution</b>	BD FACSTM Clean Solution	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
<b>Desoxyribonukleotidtriphosphate</b>	dNTP-Mix je 100 mM, 4 x 25 µmol	Roche Life Science, Mannheim
<b>Dimethylsulfoxid</b>	RNase-, DNase-, Phosphatase-, Protease-frei	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, United States of America
<b>Ethanol</b>		CarlRoth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>Ethidium bromide aqueous solution</b>	10 ml	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, United States of America
<b>Ethylendiaminotetraessigsäure</b>	EDTA	CarlRoth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## Material und Methoden

<b>FACSFlow™</b>	BD FACSFlow™ Sheath Fluid	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
<b>Gelatine</b>	Aus bovine Haut Typ B	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, United States of America
<b>Glycerin</b>		Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>Glycin</b>		AppliChem GmbH, Darmstadt
<b>Hexadimethrinbromid</b>	Polybrene	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, United States of America
<b>HotStar-Taq + 10x PCR Puffer</b>	1000 U	Qiagen, Hilden
<b>Isopropanol</b>		Hedinger Aug. GmbH & Co. KG, Stuttgart
<b>Kaliumhydroxid</b>		CarlRoth GmbH & Co. KG
<b>L-Glutamin</b>	200 mM	GE Healthcare Amersham, United Kingdom
<b>Natriumazid</b>		CarlRoth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>Natriumchlorid</b>		CarlRoth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>Natriumfluorid</b>		Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>Natriumhydroxid</b>	Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Natriumlaurylsulfat</b>		Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>Natriumorthovanadat</b>		Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>Natriumpyruvat</b>	100 mM	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>Orange Dye</b>		Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>PBS in Pulverform</b>	Ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG Biotechnologie, Berlin
<b>Phosphat gepufferte Salzlösung</b>	Dulbecco's phosphate buffered saline, PBS	Life technologies, Carlsbad, CA, United States of America
<b>Propidiumiodid</b>		Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, United States of America
<b>Proteinstandard</b>	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Darmstadt



## Material und Methoden

<b>Rinse Solution</b>	BD FACS™ Rinse Solution	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
<b>Shutdown-Solution</b>	BD FACS™ Shutdown Solution	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
<b>1xTAE-Puffer</b>	Verdünnt aus 50xTAE-Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</b>	Tris	CarlRoth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>Trypanblau</b>	0,4%-ig	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>Trypsin</b>	Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America

Tabelle 3: Chemikalien und Substanzen in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>6,12,24,96-Loch Platten</b>	Adhärenzkultur, aus PS	Greiner Bio One, Frickenhausen
<b>Desinfektionslösung</b>	Terralin@Liquid	Schülke & Mayr GmbH, Nordernstedt
<b>Kryoröhrchen</b>	1 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht-Rommelsdorf
<b>NCC-Platten</b>		Automated Lab Solutions GmbH, Jena
<b>Nitrilhandschuhe</b>		Starlab, Hamburg
<b>Pasteurpipetten</b>	Aus Kalksodaglas	CarlRoth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>PCR-Platte, 96-Loch</b>	FrameStar® 96 PCR Plate for LC480	Gene One, Ludwigshafen
<b>Pipettenspitzen 10 µl</b>		Greiner Bio One, Frickenhausen
<b>Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl</b>	TipOne®, kein Filter	STARLAB GmbH, Hamburg
<b>Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml</b>	Schnapdeckel, graduiert	Greiner Bio One, Frickenhausen
<b>Rundbodenröhrchen</b>	Aus PS für Durchflusszytometrie	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg

## Material und Methoden

<b>Serologische Pipetten 2ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml</b>	steril	Greiner Bio One, Frickenhausen
<b>Spüllösung</b>	Aqua B. Braun, sterile, pyrogenfrei	B. Braun Sharing, Melsungen
<b>Sterilindikatorband</b>	XC20.1 für Dampfsterilisation	CarlRoth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>SybrGreen Mastermix</b>	LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Life Science, Mannheim
<b>Thermodruckpapier</b>	Mitsubishi Thermopapier K91HG-CE	Mitsubishi Electronics, Chiyoda, Tokyo, Japan
<b>Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml</b>	aus PP, steril, mit konischem Boden	Greiner Bio One, Frickenhausen

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.4 Fertigsysteme

<b>Fertigsystem</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CD34 MicroBeads Kit</b>		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
<b>CD33 Micro Beads Kit</b>		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
<b>Dead Cell Removal Kit</b>		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
<b>DNeasy Blood and Tissue Kit</b>		Qiagen, Hilden
<b>Human Methylcellulose Complete Media</b>	Methylcellulose, Cell Resuspension Solution	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

Tabelle 5: Fertigsysteme in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.5 Zellkulturmedien, Zusätze und verwendete Materialien

Zellkulturmedien/Zusätze	Bezeichnung	Hersteller
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Gibco, Eggenstein
<b>DMSO</b>	<i>Dimethylsulfoxid</i>	Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, Mo, United States of America
<b>D-PBS</b>	Dulbecco's phosphate-buffered saline	Gibco, Eggenstein
<b>Einfriermedium</b>	90 % FCS, 10 % DMSO	
<b>FCS</b>	Fetal calv serum	Biochrom AG Biotechnologie, Berlin
<b>L-Glutamin</b>	200 mM	Gibco, Eggenstein
<b>RPMI 1640 Medium</b>		Gibco, Eggenstein

Tabelle 6: Zellkulturmedien und Zusätze in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.6 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
<b>Additiva</b>	100 ml PBS 100 ml Pyruvat 100 ml Glutamin 100 ml 2 mM Mercaptoethanol 60 ml Non-Essentielle Aminosäuren 20 ml Asparagin 100 ml Hepes
<b>Auftaumedium</b>	500 ml IMDM 20% FCS 29 ml Additiva
<b>Cell Resuspension Solution</b>	IMDM 50% FCS
<b>DNase Treatment Puffer</b>	PBS 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5% BSA 100 U/ml Dnase

## Material und Methoden

<b>Ethidiumbromidlösung</b>	10 mg/ml Ethidiumbromid (Lagerung bei 4°C)
<b>FACS-Puffer</b>	PBS 0,5% BSA 2mM EDTA
<b>Elektrophorese Ladepuffer</b>	Orange Dye 70% Glycerin
<b>MACS Puffer</b>	PBS 0,5% BSA 2mM EDTA
<b>Methylcellulose</b>	IMDM 1,4% Methylcellulose 25% FCS 2% BSA 2 mM L-Glutamine 5 x 10 <sup>-5</sup> M 2-Mercaptoethanol 50 ng/ml Recombinant Human SCF 10 ng/ml Recombinant Human GM-CSF 10ng/ml Recombinant Human IL-3 3 IU/ml Recombinant Human Epo

Tabelle 7: Lösungen und Puffer in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.7 Längenstandards

<b>Längenstandard</b>	<b>Hersteller</b>
<b>100 bp Leiter, äquimolar</b>	CarlRoth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<b>D1 CEQ DNA size standard 600</b>	Beckman Coulter/Sciex

Tabelle 8: Längenstandards in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.8 *FLT3*-PCR Primer

Primer	Bemerkungen	Sequenz
11 F		5'-GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC-3'
12 R	5'wellRED D4 markiert	5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC-3'

Tabelle 9: *FLT3*-PCR Primer in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Bemerkungen	Nährmedium	Bezugsquelle
MV4-11	Akute myeloische Leukämie (Homo sapiens)	<i>FLT3</i> -Mutation	RPMI 10 % FCS	ATCC
MOLM-13	Akute myeloische Leukämie (Homo sapiens)	<i>FLT3</i> -Mutation	RPMI 10 % FCS	ATCC
OCI-AML-3	Akute myeloische Leukämie (Homo sapiens)	<i>FLT3</i> -Wildtyp <i>NPM1</i> -Mutation	Alpha-MEM 20 % FCS	ATCC

Tabelle 10: Zelllinien in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.10 Antikörper

Antikörper	Organismus	Hersteller
CD34 anti-human PE	Mouse	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
CD33 anti-human APC	Mouse IgG1, k	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
IgG1 PE	Mouse	Beckman & Coulter GmbH, Krefeld
IgG1 k-isotype control APC	Mouse	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg

Tabelle 11: Antikörper in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.11 Tyrosinkinase-Inhibitoren

<b>Tyrosinkinase-Inhibitoren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Crenolanib</b>	Apotheke Universitätsklinikum Mainz
<b>PKC-412</b>	Apotheke Universitätsklinikum Mainz

Tabelle 12: Tyrosinkinase-Inhibitoren in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.12 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Citavi 6.3.0.0</b>	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
<b>FACS Diva</b>	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
<b>FlowJo 10.5.0</b>	Tree Star Inc., Ashland, Oregon, United States of America
<b>GenomeLab GeXP software 11.0.24</b>	Beckman Coulter/Sciex
<b>GraphPad Prism 5.01</b>	Graphpad Software Inc., La Jolla, California, United States of America
<b>LightCycler® 480 Software</b>	Roche Life Science, Mannheim
<b>Microsoft Office</b>	Microsoft, Redmond, Washington, United States of America

Tabelle 13: Software in alphabetischer Reihenfolge

### 3.1.13 Datenbanken

<b>Datenbank</b>	<b>URL</b>
<b>NCBI/PudMed</b>	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/</a>

Tabelle 14: Datenbanken in alphabetischer Reihenfolge

## 3.2 Methoden

Um einen Überblick zu den verwendeten Methoden der vorliegenden Arbeit zu erhalten, ist der Ablauf des Experiments im nachfolgenden Flussdiagramm dargestellt.

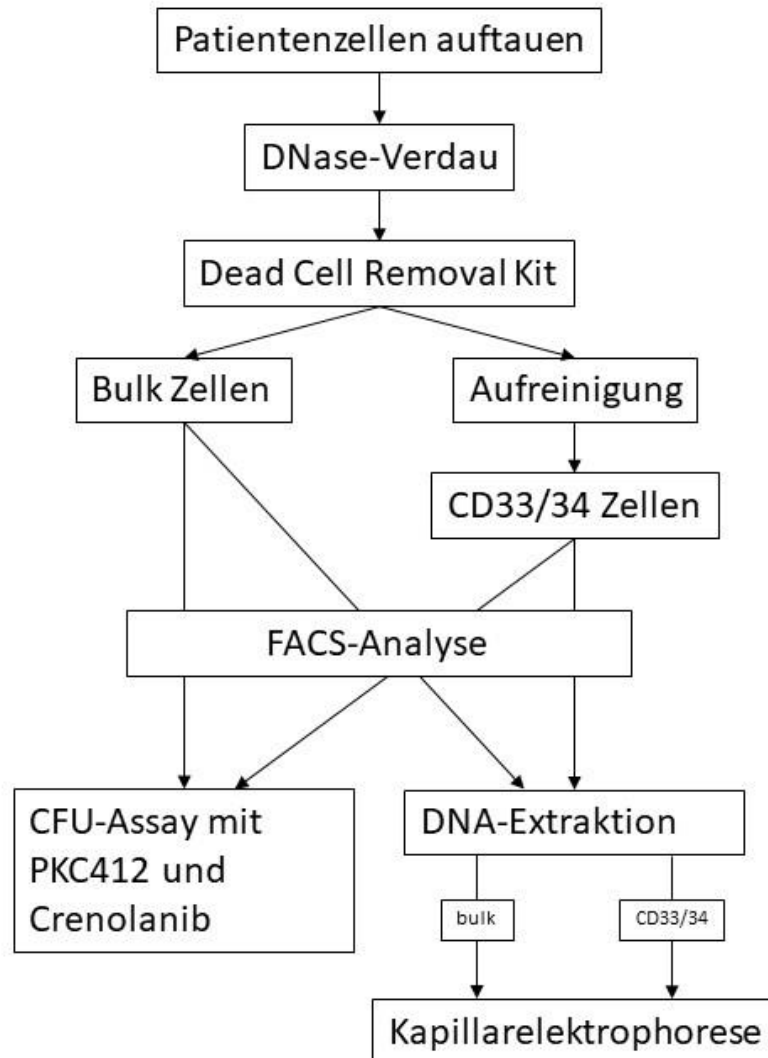


Abbildung 6: Flussdiagramm des Experimentenablaufs

### 3.2.1 Studiendesign und Ethik

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel - Bedeutung der *FLT3*-ITD-Ratio im Rahmen der Therapiestratifizierung bei Patient\*innen mit akuter myeloischer Leukämie - ist eine monozentrische, retrospektive Kohortenstudie.

Die Einhaltung von ethischen und wissenschaftlichen Standards nach der Good Clinical Practice auf Basis der Deklaration von Helsinki wurden bei der Durchführung und Dokumentation jederzeit gewahrt. Das Studienprotokoll wurde gemäß des

## Material und Methoden

---

Ethikantrags Nr. 837.270.05 (4928) durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt.

Die schriftliche und mündliche Aufklärung der Patient\*innen erfolgte vor Beginn der Untersuchung durch einen Studienarzt und umfasste die pseudonymisierte Verwendung der erhobenen Daten. Nach dem schriftlichen Einverständnis der Patient\*innen und dem Erhalt einer Kopie der Erklärung nebst zugehörigem Patienteninformationsbogen wurden die Patient\*innen in die Studie aufgenommen.

### 3.2.2 Patientenkollektiv mit Ein- und Ausschlusskriterien

Das Kollektiv umfasste 58 Patient\*innen, die zwischen dem 01.06.2007 und dem 31.12.2016 ambulant oder stationär in der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz vorstellig wurden. In Frage kamen alle Patient\*innen mit einer *FLT3*-ITD AML, welche mittels PCR diagnostiziert wurde. Zum Ausschluss von Patient\*innen führte eine bereits begonnene Therapie.

### 3.2.3 Materialgewinnung

Die Knochenmark- Proben wurden durch Punktion des Beckenkamms und die Proben des peripheren Blutes sowie die Leukozytapherese mittels Venenpunktion gewonnen. Zur Gerinnungshemmung wurde den Proben Heparin-Natrium beigemischt. Durch die Dichtegradienten-Zentrifugation wurden mononukleäre Zellen selektiert und bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### 3.2.4 Zellen auftauen

Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Vorbereitend wurden 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis vorgekühlt und mit 40 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) + 20% Fetal Bovine Serum (FBS) + Additiva befüllt. Nach der Entnahme der Zellen aus dem Stickstofftank erfolgten unmittelbar eine Reinigung des Einfrierröhrchens mittels Alkohols und das Auftauen der Patientenprobe in der Hand. Zur Überführung der Patientenprobe wurde das vorgekühlte Medium verwendet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1400 U/min und 4°C für 8 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 2 ml 4°C kühlem Phosphate-Buffered Saline (PBS) mit 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert.



Nach einer Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Vitalfärbung (siehe unten) wurde die Zellsuspension durch einen 30 µm Filter pipettiert.

### 3.2.5 Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Vitalfärbung

Für die Zellzahlbestimmung wurden 10 µl homogene Zellsuspension mit 90 µl 0,2%-igem Trypanblau gefärbt und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Abgestorbene und perforierte Zellen lagern das Trypanblau ein, so dass nur die nicht dunkelblau gefärbten Zellen gezählt wurden. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Kammerfaktors ( $10^4$ ) konnte mit Hilfe des Mittelwerts aus allen vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro Milliliter bestimmt werden.

$$\frac{X}{4} * V * 10^4 = \text{Zellen}/_{ml}$$

X = gezählte Zellen aus 4 Quadranten

V = Verdünnungskoeffizient (bei 1:1 Verdünnung: 2, bei 1:10 Verdünnung: 10)

### 3.2.6 DNase-Verdau

In 20 ml 4°C kühles PBS mit 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM CaCl<sub>2</sub> wurden 333,6 µl 30%-iges Bovine serum albumin (BSA) hinzugefügt, so dass eine 0,5% BSA Konzentration entstand. Abschließend wurden 100 Units/ml DNase hinzugegeben und für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die Patientenprobe bei 300G für 10 min und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend das Dead Cell Removal Kit Protokoll verfolgt.

### 3.2.7 Magnetische Zellseparation

#### 3.2.7.1 Allgemeines Prinzip der magnetischen Zellseparation

Für die Aufreinigungen wurden die MicroBead Kits von Miltenyi Biotec verwendet. Um Zellen mit einer hohen Reinheit aus komplexen Zellgemischen zu isolieren, kann die magnetische Zellseparation (engl.: magnetic cell sorting, MACS®) verwendet werden. Dabei kommen supraparamagnetische Mikropartikel (ca. 50 nm Durchmesser) zum Einsatz, die an Antikörper gekoppelt sind (siehe Abbildung 7).

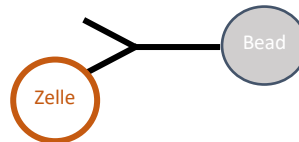


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines MicroBead

Während der Inkubationszeit binden diese konjugierten Antikörper (MicroBeads) spezifisch an die gewünschten Zellen und werden anschließend auf eine spezielle Trennsäule, die mit Stahlwolle oder Stahlkugeln gefüllt ist, gegeben. Die Säule befindet sich in einem starken magnetischen Feld, so dass die markierten Zellen zwischen den Fäden der Stahlwolle zurückgehalten werden und die unmarkierten Zellen als negative Fraktion eluiert werden.

Nach dem Herausnehmen der Säule aus dem magnetischen Feld können die markierten Zellen durch kräftiges Durchspülen mit dem Kolben gewonnen werden (positive Fraktion) (siehe Abbildung 8).

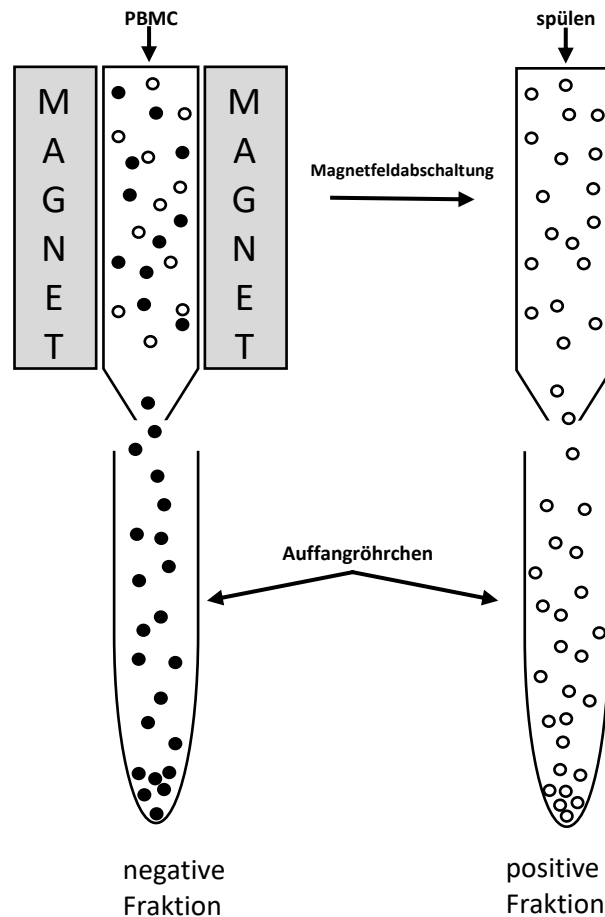


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer magnetischen Zellseparation

### 3.2.7.2 Dead Cell Removal Kit

Nach einer Zentrifugation bei 300G für 10 min wurde das Patientenzellpellet in 100  $\mu$ l Dead Cell Removal MicroBeads pro ca.  $10^7$  Zellen insgesamt resuspendiert. Anschließend wurde die Patientenprobe mit den MicroBeads für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Vorbereitung des 1x Binding Buffers wurden pro Patientenprobe 1 ml 20x Binding Buffer mit 19 ml sterilem  $H_2O$  verdünnt. Abhängig von der Zellzahl wurde eine MS (bis zu  $10^7$  tote Zellen und  $2 \times 10^8$  Gesamtzellen) oder LS (bis zu  $10^8$  toten Zellen und  $2 \times 10^9$  Gesamtzellen) Säule verwendet, diese im Magneten platziert und zur Vorbereitung mit 1x Binding Buffer gespült (MS: 500  $\mu$ l; LS: 3 ml). Anschließend wurde die Zellsuspension in entsprechender Menge 1x Binding Buffer (MS: 500-1000  $\mu$ l; LS: 3 ml) auf die Säule gegeben und 4 Mal mit 1x Binding Buffer (MS: 4 x 500  $\mu$ l; LS: 4 x 3 ml) durchgespült. Der Durchfluss wurde in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen und zählte als lebende Zellfraktion. Die Zellzahl wurde erneut mit der Trypanblau-Vitalfärbung bestimmt.

### 3.2.7.3 CD34-Aufreinigung

Vor Beginn der Aufreinigung wurde die Patientenprobe bei 300 G und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstands wurde das Zellpellet in 300 µl MACS Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA) je  $10^8$  Gesamtzellen resuspendiert. Im Anschluss wurden 100 µl FcR Blocking Reagenz und 100 µl CD34 MicroBeads hinzugefügt. Je nach Blastenanteil in der Patientenprobe wurde die Menge der beiden Reagenzien erhöht, da die 100 µl FcR Blocking Reagenz und MicroBeads auf 30% Blasten kalibriert sind. Für die 30-minütige Inkubation wurde die Probe im Kühlschrank auf einen Rollenmischer gelegt. Nach der Inkubation wurde die Patientenprobe mit 5-10 ml MACS Puffer gewaschen und erneut bei 300 G für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurde das Zellpellet in 500 µl MACS Puffer pro  $10^8$  Gesamtzellen resuspendiert. Abhängig von der Zellzahl wurde eine MS (bis zu  $10^7$  markierte Zellen und  $2 \times 10^8$  Gesamtzellen) oder LS (bis zu  $10^8$  markierte Zellen und  $2 \times 10^9$  Gesamtzellen) Säule verwendet. Die Säule wurde im Magneten platziert und durch Waschen mit MACS Puffer vorbereitet (MS: 500 µl; LS: 3 ml). Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Während des dreimaligen Waschens (MS: 3 x 500 µl; LS: 3 x 3 ml) wurde der Durchfluss aufgefangen, welcher die unmarkierten Zellen enthielt. Daraufhin wurde die Säule aus dem Magneten genommen, über einem Zentrifugenröhrchen mit MACS Puffer (MS: 3 x 1 ml; LS: 3 x 5 ml) und dem Kolben der Säule kräftig durchgespült und somit die markierten CD34+ Zellen von der Säule gelöst und aufgefangen.

### 3.2.7.4 CD33-Aufreinigung

Vor Beginn der CD33-Aufreinigung wurde die Patientenprobe bei 300 G und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet in 80 µl MACS Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA) und 20 µl CD33 MicroBeads pro  $10^7$  Gesamtzellen resuspendiert. Je nach Blastenanteil in der Patientenprobe wurde die Menge der beiden Reagenzien angepasst, da die Menge von 20 µl MicroBeads auf 30% Blasten kalibriert sind. Für die 15-minütige Inkubation wurde die Probe im Kühlschrank auf einen Rollenmischer gelegt. Nach der Inkubation wurde die Patientenprobe mit 1-2 ml MACS Puffer pro  $10^7$  Gesamtzellen gewaschen und erneut bei 300 G für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurde das Zellpellet in 500 µl MACS Puffer pro  $10^8$  Gesamtzellen resuspendiert. Abhängig von der Zellzahl wurde eine MS (bis zu  $10^7$  markierte Zellen und  $2 \times 10^8$  Gesamtzellen) oder LS (bis zu

## **Material und Methoden**

---

$10^8$  markierte Zellen und  $2 \times 10^9$  Gesamtzellen) Säule verwendet. Die Säule wurde im Magneten platziert und durch Waschen mit MACS Puffer vorbereitet (MS: 500  $\mu$ l; LS: 3 ml). Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Während des dreimaligen Waschens (MS: 3 x 500  $\mu$ l; LS: 3 x 3 ml) wurde der Durchfluss aufgefangen, welcher die unmarkierten Zellen enthielt. Daraufhin wurde die Säule aus dem Magneten genommen, über einem Zentrifugenröhrchen mit MACS Puffer (MS: 3 x 1 ml; LS: 3 x 5 ml) und dem Kolben der Säule kräftig durchgespült und somit die markierten CD33+ Zellen von der Säule gelöst und aufgefangen.

### **3.2.7.5 Einschlusskriterien der Aufreinigung**

Als erfolgreich galt die Aufreinigung, wenn der Reinheitsgrad  $> 80\%$  lag (enges Einschlusskriterium) oder eine Reinheit  $> 65\%$  mit gleichzeitigem Vorliegen eines Anreicherungs-faktors von  $> 1,7$  (erweiterte Einschlusskriterien) gemessen wurde.

### 3.2.8 Durchflusszytometrie

Eine Untersuchung von Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaft und intrazellulären Eigenschaften von Einzelzellen einer Zellpopulation in ungetrenntem Zustand wird durch die Durchflusszytometrie ermöglicht. Dabei kommen an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte spezifische Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe, die an spezifische Zellstrukturen binden, zum Einsatz.

Die Zellen werden durch den Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette gesaugt, so dass die Zellen im Flüssigkeitsstrom perlenkettenartig aneinander gereiht vorliegen, was es dem gebündelten Laserstrahl ermöglicht, einzelne Zellen zu erfassen. Durch den Laser wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt, der wiederum Licht einer spezifischen Wellenlänge emittiert. Innerhalb des Durchflusszytometers wird das emittierte Licht mit Hilfe von Spiegeln und Filtern gebündelt sowie zerlegt, so dass bestimmte Signale für jeden einzelnen Farbstoff entstehen. Dabei verhält sich die Photonenkonzentration proportional zur eingesetzten Menge des Farbstoffes.

Unabhängig vom eingesetzten Farbstoff lassen sich auch Aussagen über die Größe und Granularität der Zellen treffen. Dafür erfasst der Forward Scatter (FSC) das nach vorne abgelenkte Streulicht, welches als Maß für die Größe der Zelle gilt. Durch die Erfassung des im 90° Winkel abgestrahlten Seitenstreulichts im Sideward Scatter (SSC) kann die Granularität der Zellen ermittelt werden.

Die folgenden Messungen wurden an dem Durchflusszytometer FACS Canto II von der Firma Becton Dickinson (BD) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die Programme FACS Diva und FlowJo.

### 3.2.9 Colony-Forming-Unit-Assay

Mit Hilfe des CFU (Colony Forming Unit)- Assays kann die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber verschiedener Inhibitoren untersucht werden. Dazu wurde Methylcellulose jeweils mit den *FLT3*-Inhibitoren Crenolanib bzw. PKC412 in einer Konzentration von 10 nM für Crenolanib und 200 nM für PKC412 versetzt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Behandlung mitgeführt. Dadurch entstanden 6 Ansätze pro Probe, da die zwei Inhibitoren und die Kontrolle sowohl für die bulk- Population als auch für die aufgereinigte Population angesetzt wurden. Bei der bulk- Population wurden 50.000 Zellen und für die aufgereinigten Zellen CD34<sup>+</sup>/33<sup>+</sup> 10.000 Zellen eingesetzt.

Nach dem Aussäen der Zellen in der Methylcellulose schloss sich eine 14-tägige Inkubationszeit bei 37°C, 5vol% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit an, woraufhin die Kolonien quantifiziert wurden.

### 3.2.10 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen verwendet und diese nach deren Protokoll durchgeführt.

### 3.2.11 ITD-Vervielfältigung mittels PCR

Die PCR sowie die Gelelektrophorese wurden in Kooperation mit dem Hämatologie-Labor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) lassen sich schnell geringe Mengen spezifischer DNA in-vitro vervielfältigen. Dabei kommt eine thermostabile DNA-Polymerase/taq-Polymerase zum Einsatz, die als Ansatzpunkte zwei das interessierende Gen flankierende Oligonukleotide (Primer) angeboten bekommt und ausgehend davon die DNA synthetisiert. Dabei wiederholen sich die Schritte der DNA-Denaturierung, Primer-Bindung an die DNA (Annealing) und DNA-Extension, so dass der zwischen den Primern liegende Genabschnitt in Anwesenheit der Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) exponentiell amplifiziert wird.

Zum einen diente die PCR in dieser Arbeit dem Nachweis von internen Tandemduplikationen (ITD) des *FLT3*-Gens auf konventionelle Weise, zum anderen wurden die PCR-Produkte mittels GeneScan analysiert.

In der vorliegenden Arbeit kamen für die PCR der Forward-Primer 11F und, damit in der GeneScan-Analyse die Detektion der DNA-Fragmente gelingen kann, der am 5'-Ende mit einem Fluorochrom versehene Reverse-Primer 12R zum Einsatz. Als Fluorochrom wurde das Cyanin basierte „well red dye D4“ verwendet. Dabei liegt sein Absorptionsmaximum bei 650 nm und sein Emissionsmaximum bei 670 nm.

- 11 F: 5'-GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC-3'
  - 12 R: 5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC-3'
- 5': well red dye D4

## Material und Methoden

Vor Beginn der PCR wurde der DNA-Gehalt der Patientenprobe gemessen, so dass 5 ng/ $\mu$ l DNA je PCR-Ansatz eingesetzt wurde.

Der PCR-Ansatz enthielt:

H <sub>2</sub> O	17,38 $\mu$ l
10xPCR Puffer (mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	2 $\mu$ l
Primer 11F (20 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Primer 12R (20 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
QIAGEN HotStar Taq Polymerase	0,125 $\mu$ l
<b>Gesamt</b>	<b>23 <math>\mu</math>l</b>

jeweils 23  $\mu$ l Mastermix wie linksseitig beschrieben vorlegen und 2  $\mu$ l DNA als Template dazu geben!

Tabelle 15: PCR-Ansatz

Um Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle mitgeführt, die zwar alle Reagenzien jedoch kein DNA-Template enthielt.

Die PCR wurde anhand des folgenden Protokolls durchgeführt:

Deckelheizung 105°C

Vorheizen auf 95°C

### Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion:

Reaktionsschritt	Temperatur [Celsius]	Zeit [Minuten]	
Initiale Denaturierung	95	15:00	
Denaturierung	95	00:30	30 Zyklen
Annealing	55	1:00	
Extension	72	00:45	
Finaler Syntheseschritt	72	10	
Abkühlung	4	$\infty$	

Tabelle 16: Ablauf der Polymerase-Ketten-Reaktion



### 3.2.12 Kapillarelektrophorese / GeneScan-Analyse

Die GeneScan-Analyse wurde in Kooperation mit dem Hämatologie Labor/Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

#### GeneScan-Analyse

Das verwendete CEQ 8000 Genetic Analysis System ist eine Kombination aus einer Kapillarelektrophorese mit der Möglichkeit zur Fluoreszenz-Detektion, so dass mit Fluoreszenz markierte DNA detektiert, deren Fragmentlänge bestimmt und quantifiziert werden kann.

Das Kernstück des Analysis Systems ist eine auf 50°C beheizte Glaskapillare mit einem Durchmesser von 75 µm und einer Länge von 33 cm. Zur Stabilisierung der Glaskapillare ist diese mit Polyimid beschichtet. Zu Beginn des Ablaufs wird die Probe durch einen Autosampler zum einen Ende der Glaskapillare transferiert, an dem sich die Kathode befindet. An dem anderen Ende befindet sich die Anode, die ebenso wie die Kathode in einem Elektrophoresepuffer eingetaucht ist. Vor dem Start der Analyse wurden die Proben für 120 sec auf 90°C erhitzt, was eine Denaturierung zur Folge hat. Damit die Auftrennung beginnen kann, wird für 60 sec eine Spannung von 2,0 kV angelegt, so dass die sogenannte elektrokinetische Injektion erfolgt, bei der ein kleiner Teil der Probe in die Kapillare injiziert wird. Anschließend wird das Kathodenende erneut in den Elektrophoresepuffer getaucht. Daraufhin wird eine Spannung von 4,8 kV für 60 min zwischen Kathode und Anode angelegt, woraufhin sich die negativ geladene DNA im Spannungsfeld der Größe nach auftrennen kann.

Für die Detektion wird ein Diodenlaser mit einer Hauptemission zwischen 650 nm und 750 nm verwendet. Das Laserlicht wird durch einen Spiegel auf die Kapillare gelenkt und regt dort die mit D4 markierte DNA an. Anschließend wird die emittierte Fluoreszenzstrahlung durch eine Linse gebündelt, prismatisch aufgespalten und mittels eines Hohlspiegels und einer CCD-Kamera detektiert.

Die Fragment- Detektion, die Berechnung der Amplifikationslänge und die Quantität der AUC (Fläche eines als ITD-Klon klassifizierten Peaks der Analyse) werden mit der GenomeLab GeXP Software Version 11.0.24 durchgeführt. Dazu werden die Längen der DNA-Fragmente mit dem mitlaufenden D1 markierten CEQ DNA Längenstandard 600 verglichen, sobald diese vom Laser angeregt werden.

Für alle Patientenproben dieser Arbeit wurden jeweils eine 1:20 und eine 1:40 Verdünnung angesetzt. Dafür wurde die Patient\*innen-DNA mit Natriumlaurylsulfat

## Material und Methoden

(SLS, von engl.: *sodium lauryl sulfate*) verdünnt. Je Fragmentanalyseansatz wurden 1 µl verdünnter Patientenprobe, 0,5 µl D1 CEQ DAN size standard 600 (Beckman Coulter/Sciex) und 40 µl SLS eingesetzt. Ein Beispiel solch einer Analyse ist in Abbildung 9 zu sehen.

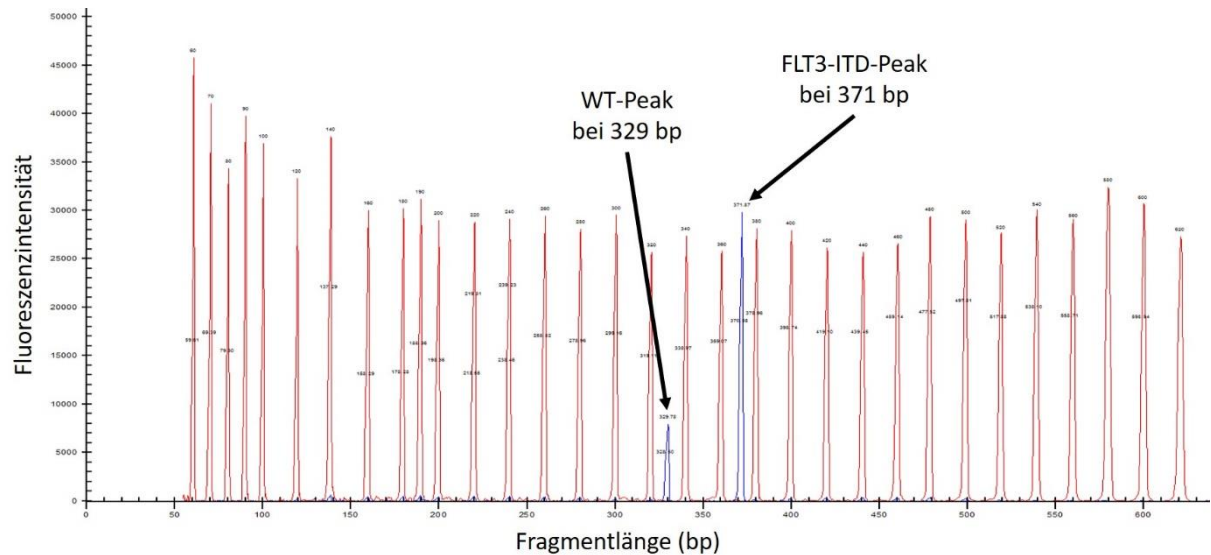


Abbildung 9: Beispiel einer GeneScan-Fragmentanalyse-Darstellung  
Blau: Patientenprobe, rot: Längenstandard  
Zusätzlich zum WT-Peak bei 329 Basenpaaren ist bei diesem Patienten ein *FLT3*-ITD-Peak bei 371 Basenpaaren dargestellt.

Für die Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe mit der homozygot mutierten Zellreihe MV4-11 durchgeführt. Dabei wurden Proben verschiedener vordefinierter Konzentrationen (100%, 75%, 50%, 37,5%, 25%, 18,75%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%) analysiert. Für die Amplifikation mittels PCR wurden 30 Zyklen verwendet und anschließend eine 1:50 Verdünnung für den Sequenzer angesetzt. Abschließend wurden Ergebnisse in Korrelation mit den tatsächlichen Konzentrationen gesetzt, wodurch nachstehende kalibrierte Formel entwickelt werden konnte.

$$y = 0,0027x^2 + 0,7197x + 1,9287$$

Mit Hilfe dieser lässt sich die Mutationsrate anhand der AUC berechnen, wie in Abbildung 10 ersichtlich wird.

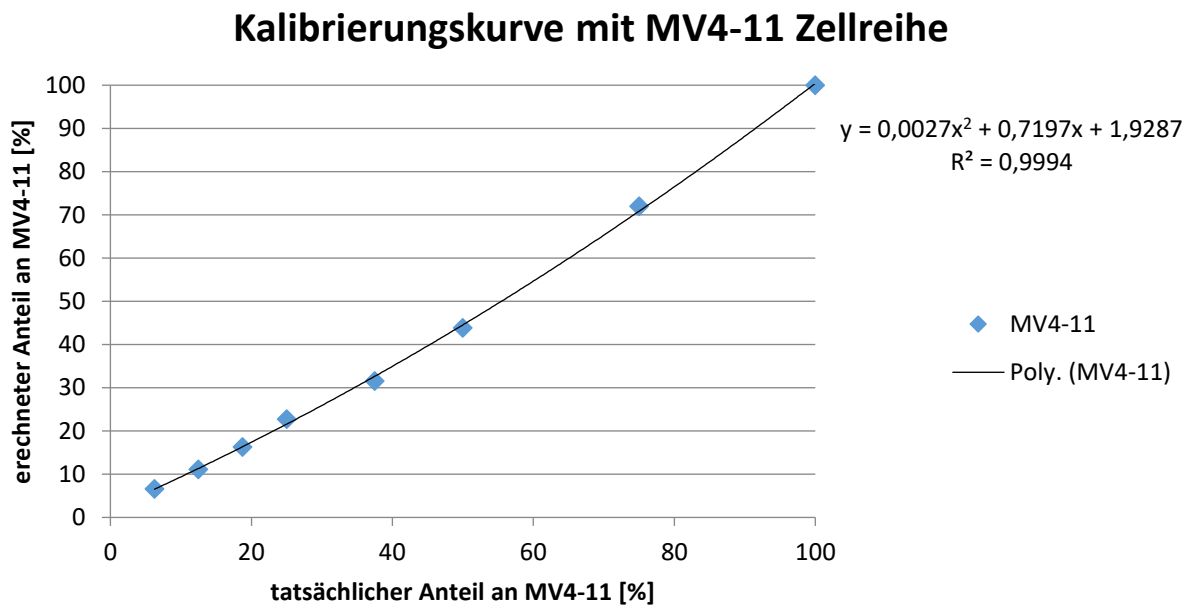


Abbildung 10: Kalibrierungskurve mit der Zellreihe MV4-11

### 3.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladene DNA im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt wird, wobei kleinere Moleküle weiter wandern als größere. Hierfür wurde ein 1,8 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid gegossen und die Taschen mit jeweils 15 µl des PCR-Produkts mit 2 µl Ladepuffer gemischt sowie mit einem 100 Basenpaare-Längenstandard befüllt. Des Weiteren wurde eine negative Zellreihe (OCI-3) und eine positive Kontrollzellreihe (MV4-11) aufgetragen. Um etwaige Verunreinigungen auszuschließen, wurden zusätzlich noch zwei negative Kontrollen mitgeführt. Eine davon beinhaltete lediglich Wasser, die andere hingegen alle im PCR-Ansatz enthaltenen Inhaltsstoffe (Mastermix) ohne zugefügte Patient\*innen-DNA. Insgesamt betrug die Laufzeit 5-6 h bei 90 Volt. Da Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert und durch UV-Licht angeregt wird, kann die Bandenanordnung der DNA-Fragmente mittels UV-Licht und eines Transilluminators sichtbar gemacht und ausgewertet werden. Zur Dokumentation wurden Fotos aufgenommen, wovon eines als Beispiel in Abbildung 11 zu sehen ist.

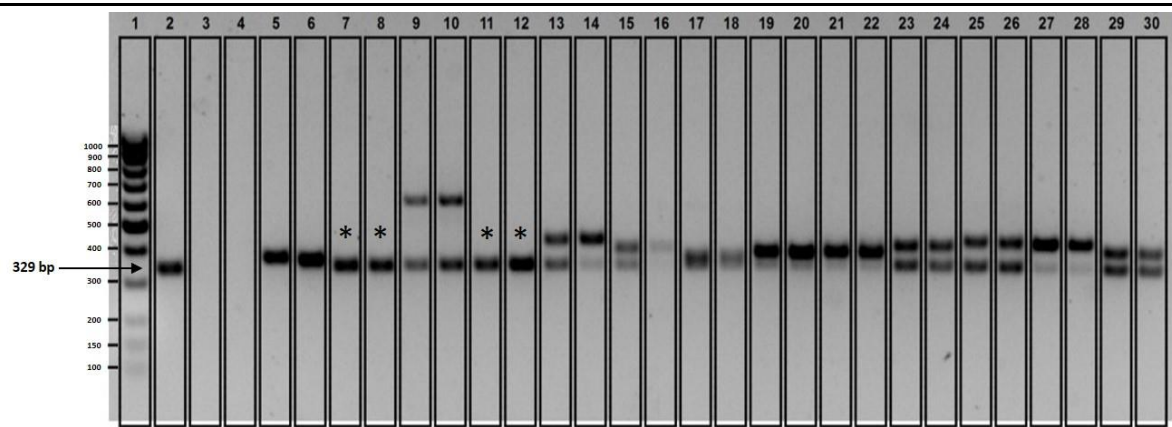


Abbildung 11: Beispiel einer Gelelektrophorese

Bei allen 24 Patientenansätzen (12 Patient\*innen mit je 2 Ansätzen: Bulk und aufgereinigt) stellt sich die Wildtyp- Bande in Höhe von 329 bp dar. Die darüberliegenden Bande repräsentieren die *FLT3*-ITD Mutation, wobei bei den mit \* markierten Proben keine Mutation nachzuweisen war.

1 = 100 bp Längenstandard, 2 = OCI-3 100% (negativ Zellreihe), 3 = Wasser (negativ Kontrolle), 4 = Mix eines PCR-Ansatzes sog. Mastermix ohne Patient\*innen-DNA, 5 = MV4-11 100% (positiv Kontrolle), 6 = Wiederholung einer Probe, 7-30 = Patientenproben

### 3.2.14 Dokumentation, Statistik und Auswertung

Mit Hilfe einer Excel-Tabelle erfolgte die klinische und personenbezogene Datenerfassung zum Zeitpunkt der Asservierung der Probe. Dabei erhielt zur Anonymisierung jede Probe eine Identifikationsnummer.

Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 5 (Version 5.01) durchgeführt. Bei nur annähernd normalverteilten Daten wurde sich für die statistische Analyse nach Spearman entschieden. Dabei wurde ein unpaariger zweiseitiger t-Test für in vitro-Versuche sowie ein Log-Rank-Test für Überlebensanalysen innerhalb der in vivo-Versuche angewendet. p-Werte kleiner als 0,05 (\*) beziehungsweise kleiner als 0,01 (\*\*) und 0,001 (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse sind meist als Median mit Interquartilsabständen (IQR) angegeben. Für eine Outliersanalyse wurde als statistisches Verfahren iterative Grubbs verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gesamtüberblick der Studienkohorte

In den vergangenen 10 Jahren konnte die Forschungsgruppe Kindler 47 Patientenproben mit einer *FLT3*-ITD asservieren, von denen 50% zusätzlich eine *NPM1*- Mutation aufweisen. Bei 29 Proben fand eine erfolgreiche Aufreinigung statt, so dass diese anschließend in der GeneScan Analyse untersucht wurden. Ein CFU-Assay konnte bei 7 Proben ausgewertet werden.

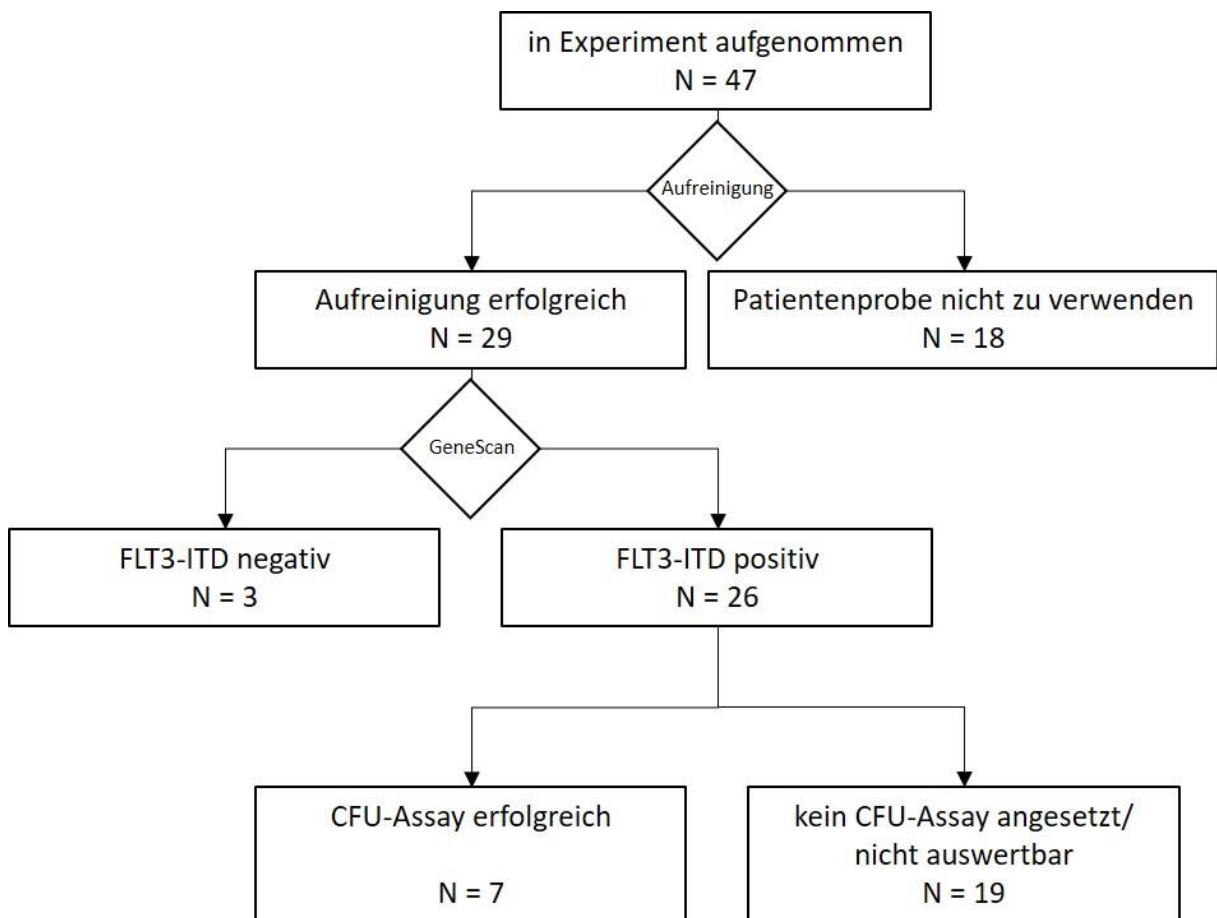


Abbildung 12: Flowchart zum Studienkollektiv

## 4.2 Stammdaten

Von den 47 in die Studie aufgenommenen Patient\*innen sind 21 (44,7%) Männer und 26 (55,3%) Frauen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren [51,5; 73,5] und 51,1% (n=24) der Patient\*innen weisen keine *NPM1*- Mutation auf. Die Patientenproben wurden in 26 Fällen (55,3%) mittels Knochenmarkpunktion gewonnen, wohingegen die Probengewinnung durch Leukozytapherese nur in 6 Fällen (12,8%) stattfand. In 15 weitere Fälle (31,9%) wurden peripheres Blut durch Venenpunktion entnommen.

Stammdaten		n = 47 (%); M [IQR]
Geschlecht	männlich	21 (44,7)
	weiblich	26 (55,3)
Alter		63 [51,5; 73,5]
<i>NPM1</i> Status	positiv	23 (48,9)
	negativ	24 (51,1)
Material	KM	26 (55,3)
	PB	15 (31,9)
	LA	6 (12,8)

Tabelle 17: Charakteristika des Studienkollektivs  
*NPM1*: *Nucleophosmin 1*, KM: Knochenmark, PB: peripheres Blut,  
 LA: Leukozytapherese

## 4.3 CD33/34 Anreicherung

Mittels einer durchflusszytometrischen Analyse wurde überprüft, ob die Aufreinigung der Patientenproben erfolgreich war. Bei 12 der ursprünglich in das Experiment aufgenommenen Proben konnte keine ausreichende Zellzahl für den Prozess der Aufreinigung erreicht werden.

In Abbildung 13 ist in einem alle verbleibenden Patientenproben (n = 35) umfassenden Diagramm zu erkennen, dass der Anteil der CD33/34<sup>+</sup>-Zellen durch die Aufreinigung signifikant gesteigert werden konnte (p<0,0001).

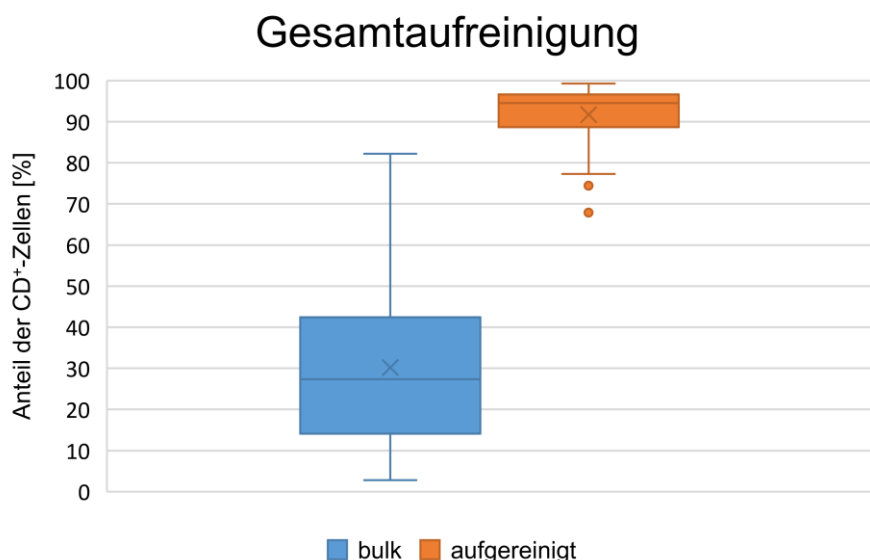


Abbildung 13: Aufreinigung aller Patientenproben je nach Population

Die Immunphänotypisierung zeigt einen medianen Blastengehalt von 80% und den Verlust des CD34-Oberflächenmarkers im Rahmen der FACS-Analyse der Routinediagnostik bei 54,3% (n = 19) der Patientenproben.

Immunphänotypisierung		n= 35 (%); M [IQR]
CD	33	19 (54,3)
	34	16 (45,7)
Blastengehalt [%]		80 [63,8; 87,2]

Tabelle 18: Immunphänotypisierung des Patientenkollektivs

Da die Patientenproben abhängig von der Expression der CD-Moleküle auf der Oberfläche entweder nach CD33<sup>+</sup> oder nach CD34<sup>+</sup> aufgereinigt wurden, lässt sich deren Gegenüberstellung aus Abbildung 14 und Abbildung 15 entnehmen. Dabei fällt auf, dass beide Aufreinigungen einen signifikant erhöhten CD<sup>+</sup>-Zellen-Anteil herbeiführten, jedoch die CD33-Aufreinigung insgesamt zu einem höheren Anreicherungskoeffizienten führte.

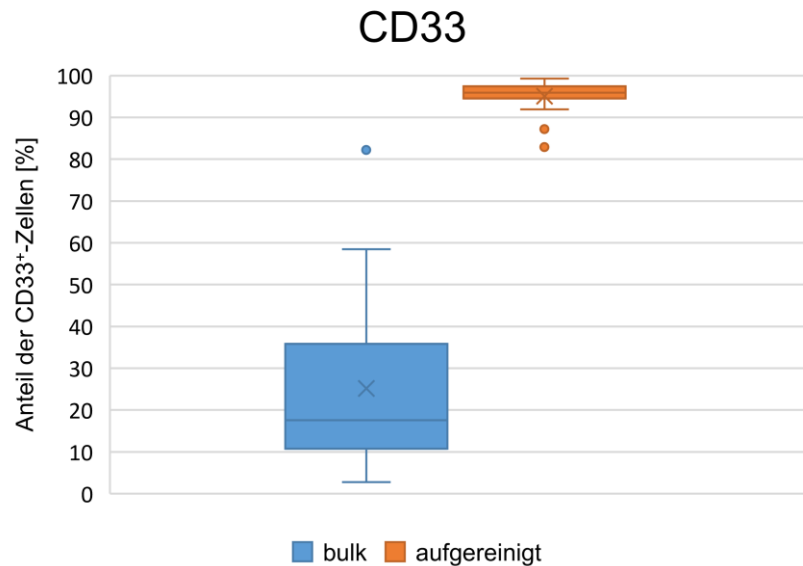


Abbildung 14: Aufreinigungsanteil von CD33+-Zellen je Population

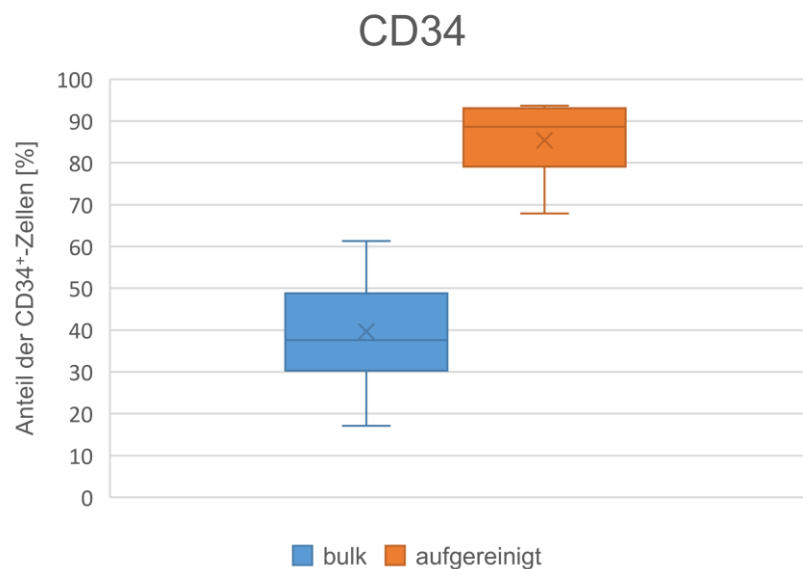


Abbildung 15: Aufreinigungsanteil von CD34+-Zellen je Population

Um dies sowie die genauen Einschlusskriterien für die weitere Analyse besser zu verstehen, sind die 35 Patientenproben und deren Prozentsatz an CD33+- bzw. CD34+-Zellen in Tabelle 19 dargestellt.

Als erfolgreich galt die Aufreinigung bei einer Reinheit von > 80% (enges Einschlusskriterium) in der aufgereinigten Population (grün hinterlegte Patientenproben). Durch die erweiterten Einschlusskriterien (Reinheit bei > 65 % und zusätzlich ein Anreicherungsfaktor von > 1,7) wurden drei weitere Proben



## Ergebnisse

eingeschlossen (orange hinterlegt). Bei drei weiteren Proben (weiß hinterlegt) war die Aufreinigung erfolgreich, jedoch konnte im nachfolgenden Analyseschritt keine FLT3-ITD-Mutation bestätigt werden (siehe Kapitel 4.4). Für die fünf rot hinterlegten Patientenproben treffen keine der beiden Bedingungen zu, weshalb sie nicht in die weitere Auswertung eingeschlossen wurden.

Proben Nr.	bulk [%]	aufgereinigt [%]	Anreicherungsfaktor	CD
1	17,6	96,4	5,48	33
2	10,3	99,2	9,63	33
3	7,1	95,7	13,48	33
4	27,4	98,1	3,58	33
5	17,8	96,8	5,44	33
6	2,76	82,9	30,04	33
7	42,4	87,2	2,06	33
8	58,5	98,2	1,68	33
9	4,0	99,3	24,83	33
10	10,6	96,9	9,14	33
11	12,4	95,2	7,68	33
12	32,1	93,7	2,92	33
13	18,1	94,5	5,22	33
14	15,5	95,9	6,19	33
15	14,1	94,6	6,71	33
16	39,5	91,9	2,33	33
17	29,5	88,4	3,00	34
18	39,5	93,7	2,37	34
19	26,8	91,7	3,42	34
20	60,7	93,5	1,54	34
21	50,9	88,9	1,75	34
22	32,6	84,5	2,59	34
23	61,3	93,6	1,53	34
24	17,1	67,9	3,97	34
25	35,7	77,3	2,17	34
26	42,4	74,4	1,75	34
27	10,9	96,0	8,81	33
28	55,6	97,9	1,76	33
29	82,2	95,5	1,16	33
30	54,6	72,4	1,33	34
31	63,8	78,8	1,24	34
32	0,3	5,3	17,67	34
33	4,53	25,1	5,54	34
34	11,8	30,1	2,55	34
35	73,1	79,3	1,08	34

Tabelle 19: Ergebnisse der Aufreinigung

## Ergebnisse

<b>CD33</b>		<b>n = 19 (%)</b>
Aufreinigung	enges Einschlusskriterium	19 (100,0)
	erweiterte Einschlusskriterien	0 (0,0)
	fehlgeschlagen	0 (0,0)
<b>CD34</b>		<b>n = 16 (%)</b>
Aufreinigung	enges Einschlusskriterium	7 (43,8)
	erweiterte Einschlusskriterien	3 (18,8)
	fehlgeschlagen	6 (37,5)

Tabelle 20: Erfolge der Aufreinigung nach den Einschlusskriterien

Bei den 19 in das Experiment eingeschlossenen Patientenproben, die nach CD33 aufgereinigt wurden, konnte bei allen Proben die Aufreinigung nach dem engen Einschlusskriterium erfolgen, jedoch wurden 3 der Proben im Rahmen der nachfolgenden Untersuchung ausgeschlossen (siehe Kapitel 4.4). Hingegen gelang die CD34-Aufreinigung lediglich bei 7 Proben (43,8%) im Rahmen des engen Einschlusskriteriums. Jedoch konnten durch die erweiterten Einschlusskriterien 3 weitere Proben in die Analyse aufgenommen werden. 6 Patientenproben fielen in keine der Einschlusskriterien und wurden von der Analyse exkludiert.

### 4.4 Nachweis der ITD durch GeneScan-Analyse

Von den 29 analysierten Proben konnte bei 18 Proben (62,1%) ein *FLT3*-ITD-Klon und bei 8 weiteren mehrere Klone detektiert werden. Davon wiesen 7 Proben (24,1%) zwei Klone und 1 Probe (3,4%) drei Klone auf, wobei meistens ein Klon die anderen Klone dominierte. Drei weitere Proben (Nr. 27, 28, 29) stellten sich in der GeneScan-Analyse negativ für eine *FLT3*-ITD dar. Nach weiteren Analysen der Proben konnte bei zweien (Nr. 27, 29) davon statt der vermuteten *FLT3*-ITD eine *FLT3*-TKD-Mutation nachgewiesen werden. Für die dritte negative Probe (Nr. 28) konnte mit Hilfe des klinischen Verlaufs das Ergebnis bestätigt werden, da es sich nicht um eine Probe zum Zeitpunkt der Erstdiagnose handelte, sondern eine im Verlauf entnommene Probe, bei der aufgrund der Therapie die *FLT3*-ITD nicht mehr nachzuweisen war.

## 4.5 Nachweis der ITD durch Agarose-Gelelektrophorese

Parallel zu der GeneScan-Analyse wurden die Patientenproben mit einer herkömmlichen Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Dabei konnte die *FLT3*-ITD ebenfalls in allen 29 Proben detektiert werden. Bei 4 Proben (13,8%) waren zusätzlich zur Wildtyp Bande bei 329 bp zwei weitere Banden zu erkennen, was für zwei unterschiedliche *FLT3*-ITD Klone spricht. Beispielhaft ist dies in Abbildung 16 in den Ansätzen 19 und 20 zu erkennen.

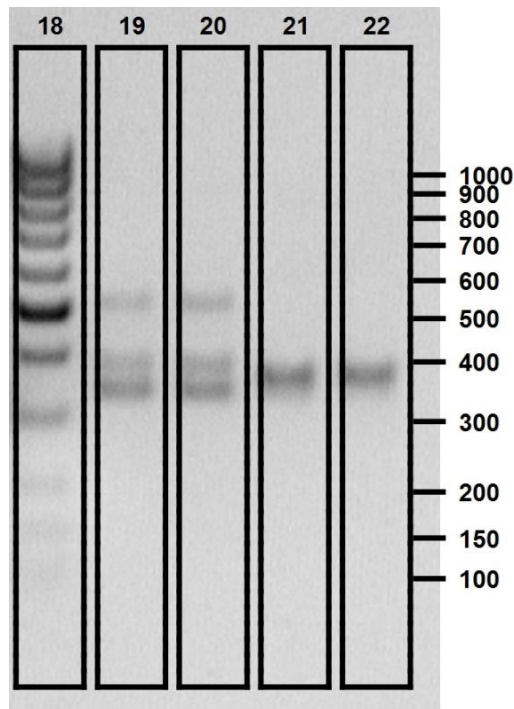


Abbildung 16: Gelelektrophorese bei Patient\*innen mit zwei *FLT3*-ITD Klonen  
18 = 100 bp Längenmarker, 19+20 = bulk und aufgereinigte Population einer Person mit zwei Klonen, 21+22 = bulk und aufgereinigte Probe einer Person mit einem *FLT3*-ITD Klon

## 4.6 Quantifizierung der *FLT3*-ITD Allelic Ratio

Mit Hilfe der Ergebnisse aus der GeneScan-Analyse konnte für die 26 positiv auf *FLT3*-ITD getesteten Proben eine Quantifizierung der Mutation erfolgen. Dafür wurde die Menge der Mutationen einer Probe ins Verhältnis zur Menge des Wildtyp-Allels gesetzt. Für die *FLT3*-ITD/Wildtyp-Ratio oder auch Allelic Ratio (AR) wurde die AUC der ITD-Klone durch die AUC des WT-Peaks dividiert. Lagen bei einer Patientenprobe mehrere *FLT3*-ITD-Klone vor, wurden die AUCs aller Klone addiert.

Allelic Ratio		n= 26 (%); M [IQR]
<b>Bulk</b>		0,46 [0,33; 0,55]
	< 0,5	16 (61,5)
	≥ 0,5	10 (38,5)
<b>CD 33/34</b>		0,51 [0,38; 0,67]
	< 0,5	12 (46,2)
	≥ 0,5	14 (53,8)

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Allel-Ratio

Wie aus Tabelle 21 zu entnehmen ist, beträgt der Median der AR aller bulk Proben 0,46. Die zusammengefasste AR der aufgereinigten Proben, ungeachtet der zwei unterschiedlichen CD33 bzw. CD34 Oberflächenmoleküle, beträgt im Median 0,51. Graphisch ist die Verteilung der berechneten AR in Abbildung 17 in einem Boxplot dargestellt.

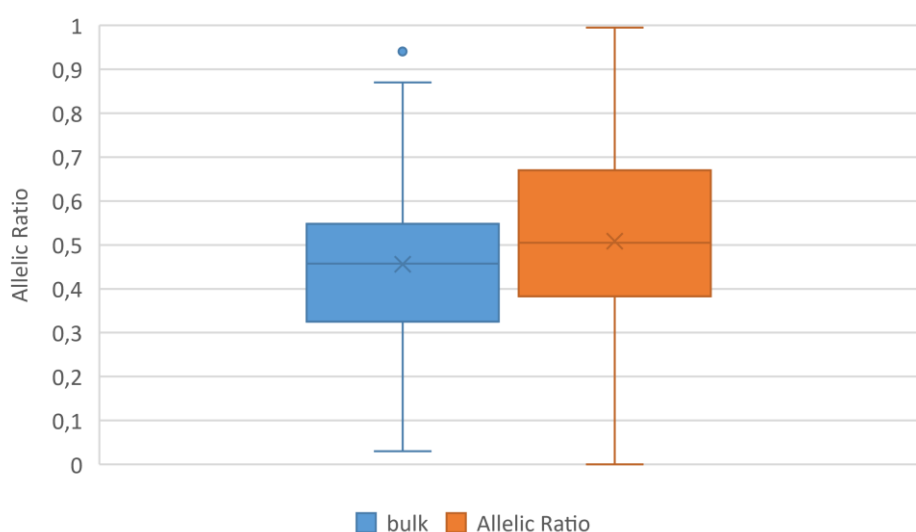


Abbildung 17: Gegenüberstellung des Allel-Ratio je nach Population

## Ergebnisse

---

Als Schwerpunkt dieser Arbeit galt die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Quantifizierungen der *FLT3*-ITD-AR von der bulk-Population sowie der nach CD33/34 aufgereinigten Population einer erkrankten Person und deren Bedeutung für die Therapieentscheidung der AML. Für den „cut off point“ wurde der in den Empfehlungen des ELN (European LeukemiaNet) publizierte Wert von 0,5 verwendet (Döhner et al. 2017). Für die final untersuchte Studienkohorte von 26 Patient\*innen gilt, dass bei den bulk- Populationen 16 Proben (61,5%) eine AR < 0,5 aufweisen, wohingegen bei den aufgereinigten Populationen nur 12 Proben (46,2%) zu zählen sind. Mit 14 aufgereinigten Proben (53,8%) liegt der Anteil an Proben mit einer AR  $\geq$  0,5 höher als bei den bulk- Populationen. Dort sind es lediglich 10 Proben (38,5%).

Im Median betrug die AR der bulk- Populationen 0,46, welche im Anschluss an die Aufreinigung auf einen Median von 0,51 anstieg. Dies entspricht einer durchschnittlichen Differenz von 0,05.

Um die patientenorientierten, individuellen Veränderungen leichter zu erkennen, ist in Abbildung 18 die Differenz der AR je Probe aufgetragen. Dabei zeigt der grüne Pfeil die Veränderung nach der Aufreinigung an und bei 0,5 ist jeweils der „cut- off“- Wert hervorgehoben. Farblich getrennt aufgetragen wurden die beiden unterschiedlichen Aufreinigungen nach CD33 (blau) bzw. CD34 (rot).

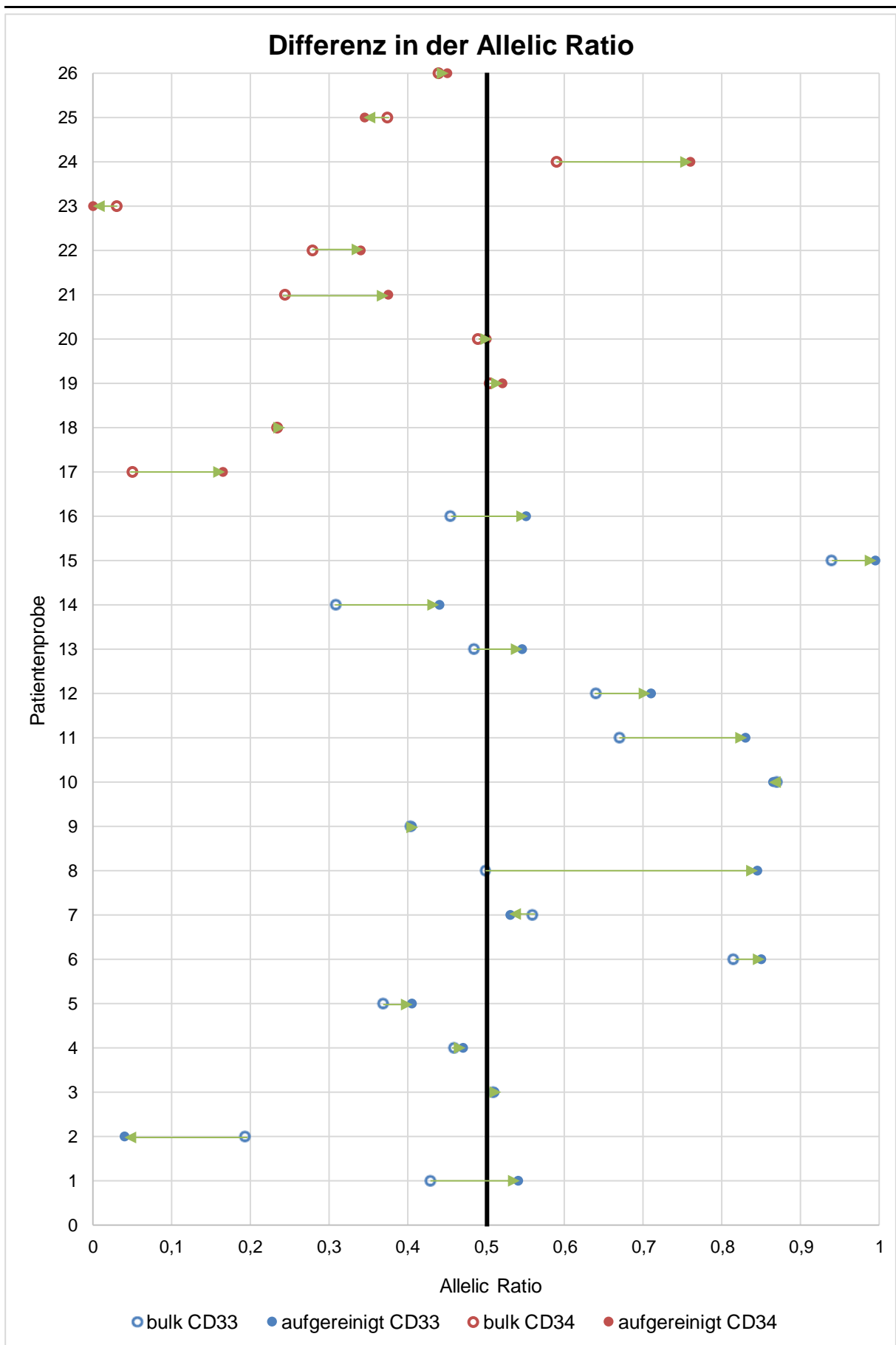


Abbildung 18: Individuelle Allel-Ratio Differenz für die Patientenproben

## Ergebnisse

---

Für die Patient\*innen 1, 13, 16 und 20 ist festzuhalten, dass sie durch die quantifizierte AR der bulk- Population in die Gruppe der günstigeren Prognose eingeteilt worden sind. Dem gegenüber steht die AR in der aufgereinigten Population, bei denen die Proben eine  $AR \geq 0,5$  aufweisen und somit in die Gruppe der ungünstigen Prognose einzuteilen sind.

Bei insgesamt 7 Proben (26,9%) beträgt die Differenz zwischen den ARs nach der Aufreinigung im Vergleich zur bulk- Population mindestens 0,1. Für 9 weitere Proben (34,6%) gilt eine Differenz von weniger als 0,04 zwischen den beiden Populationen vor und nach der Aufreinigung.

In der folgenden Analyse soll eine Korrelation der AR und dem Anreicherungsfaktor untersucht werden.

Dafür ist in einem ersten Schritt die AR der bulk-Population mit dem prozentualen Anteil an CD 33/34-Expression der bulk-Population korreliert worden. Dabei zeigt sich eine negative Korrelation (Spearman  $r$ : - 0,351), die mit einem p-Wert von 0,079 jedoch nicht signifikant ist. Wiederholt man die Analyse mit den aufgereinigten Populationen und korreliert erneut die AR mit der CD 33/34-Expression, erhält man eine leicht positive Korrelation (Spearman  $r$ : 0,062). Auch diese Analyse ist mit einem p-Wert von 0,765 nicht signifikant. In der Tendenz ist jedoch zu sehen, dass durch die Aufreinigung der Zellen eine negative Korrelation der Faktoren AR und CD-Expression aufgehoben werden kann.

## Ergebnisse

In einem zweiten Schritt soll der Anreicherungsfaktor, welcher aus der Aufreinigung der einzelnen Proben berechnet werden kann, mit der AR-Differenz in Korrelation gesetzt werden. Der Anreicherungsfaktor beträgt im Median 3,5 [2,12; 7,44].

Vor der Analyse wurde eine stringente Outlieranalyse durchgeführt. Hierfür wurde das statistische Verfahren iterative Grubbs verwendet. Dies war bei einer annähernd normalverteilten Stichprobengröße mit  $N > 6$  möglich und versucht den limitierenden Faktor der geringen Stichprobengröße mit starker Anfälligkeit für Ausreißer zu minimieren. Dadurch wurden 5 Proben identifiziert, die aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen wurden. Korreliert man anschließend die AR-Differenz mit dem Anreicherungsfaktor ergibt sich eine positive Korrelation ( $r: 0,403$ ) bei einem nicht signifikanten p-Wert von 0,07. Dies ist in Abbildung 19 graphisch verdeutlicht und wird durch die lineare Regression ( $y = 10,58 \cdot X + 3,275$ ) unterstützt.

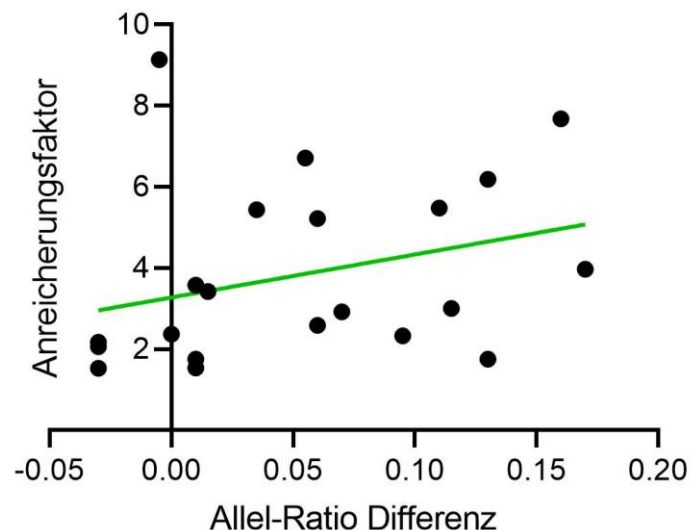


Abbildung 19: Korrelation Allel-Ratio Differenz und Anreicherungsfaktor



## 4.7 Charakteristika und Analyse der verbliebenen Studienkohorte

Im folgenden Abschnitt werden die relevanten klinischen Kriterien der 26 Proben dargestellt, bei denen mittels der GeneScan Analyse eine Quantifizierung der *FLT3*-ITD möglich war. Von den 26 Patient\*innen wiesen 23 eine de novo AML und 3 weitere eine sekundäre AML auf. Zusätzlich zur *FLT3*-ITD wiesen 14 Patient\*innen (53,8%) eine *NPM1*- Mutation auf.

Stammdaten		n = 26 (%)
AML	de novo	23 (88,5)
	sekundär	3 (11,5)
<i>NPM1</i> Status	positiv	14 (53,8)
	negativ	12 (46,2)

Tabelle 22: Stammdaten der verbliebenen Studienkohorte

### 4.7.1 Ansprechrate auf Induktionstherapie

Nach der Induktionstherapie erreichten 20 Patient\*innen (76,9%) eine komplette Remission (CR) und 6 Patient\*innen (23,1%) waren therapierefraktär oder verstarben während der Induktionstherapie bzw. unmittelbar danach (innerhalb der ersten 30 Tage nach Therapiebeginn).

### 4.7.2 Therapiewahl für die Konsolidierung und Überlebensanalyse

Als Konsolidierungstherapie erhielten von den 20 Patient\*innen 10 (50%) eine allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT). Weitere 7 Patient\*innen (35%) erhielten eine Chemokonsolidierung und 3 Patient\*innen (15%) verstarben zwar nicht im Rahmen der Induktion, jedoch bevor eine Konsolidierungstherapie begonnen werden konnte.

Konsolidierungstherapie	n = 20 (%)
alloHSCT	10 (50)
Chemotherapie	7 (35)
Tod vor Therapieweiterführung	3 (15)

Tabelle 23: Entscheidungen zur Konsolidierungstherapie

## Ergebnisse

In Bezug auf das OS existiert für diese Patientenkohorte kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,6$ ) zwischen den zwei gewählten Therapieformen (siehe Abbildung 20).

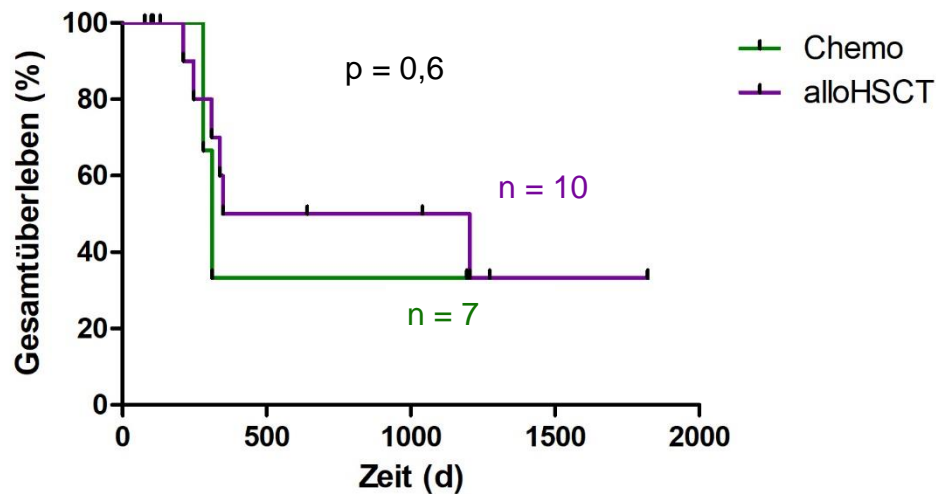


Abbildung 20: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der gewählten Therapie

### 4.7.3 Überlebensanalyse in Abhängigkeit einer *NPM1* Mutation

Unabhängig von der gewählten Therapie und der *FLT3*-ITD AR lässt sich anhand der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 21 erkennen, dass bei gleichzeitigem Vorliegen einer *NPM1*- Mutation das OS signifikant verlängert ist ( $p = 0,01$ ). Das mediane Überleben bei Vorliegen sowohl einer *FLT3*-ITD als auch einer *NPM1*- Mutation beträgt 40,1 Monate. Dem gegenüber steht das mediane Überleben der Patient\*innen mit einer *FLT3*-ITD jedoch ohne *NPM1*- Mutation mit 7 Monaten.

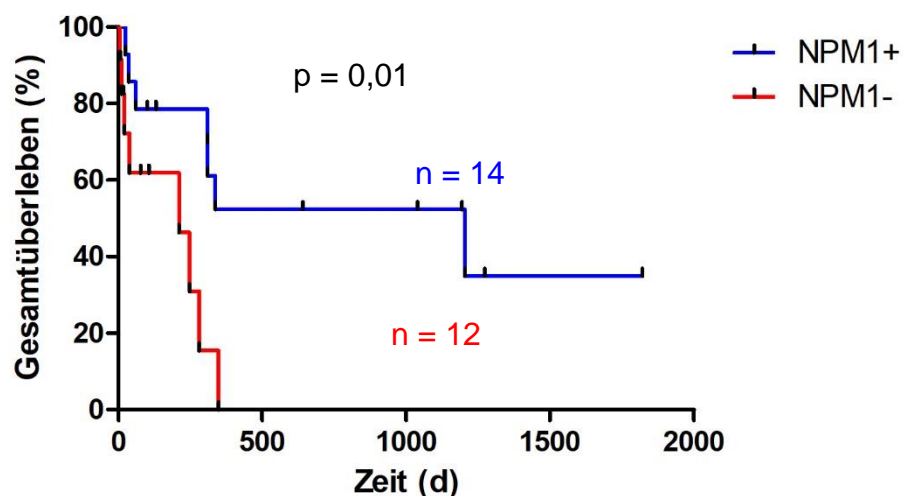


Abbildung 21: Gesamtüberleben in Abhängigkeit einer *NPM1*-Mutation

#### 4.7.4 Überlebensanalyse in Abhängigkeit der Allel-Ratio

Als eine der Kernfragen der vorliegenden Arbeit galt es herauszufinden, ob die Aufreinigung des Untersuchungsmaterials der Patient\*innen zu einer exakteren Einteilung im Rahmen der Therapiestratifizierung in die Hochrisikogruppe ( $AR \geq 0,5$ ) führen würde. Deshalb werden in diesem Kapitel verschiedene Korrelationen und Überlebensanalysen in Abhängigkeit der AR bzw. der Allel-Ratio Differenz dargestellt.

Anhand von Abbildung 22 ist kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,24$ ) im Gesamtüberleben zwischen den Kurven der bulk-Population und denen der aufgereinigten Population zu erkennen. Insgesamt lässt die Graphik jedoch eine Tendenz vermuten, bei der das Gesamtüberleben der bulk- sowie aufgereinigten Populationen mit einer  $AR < 0,5$  nahezu identisch bleibt, wohingegen das Gesamtüberleben der beiden Populationen mit einer  $AR \geq 0,5$  leicht divergent ist mit einem schlechteren Überleben in der aufgereinigten Population.

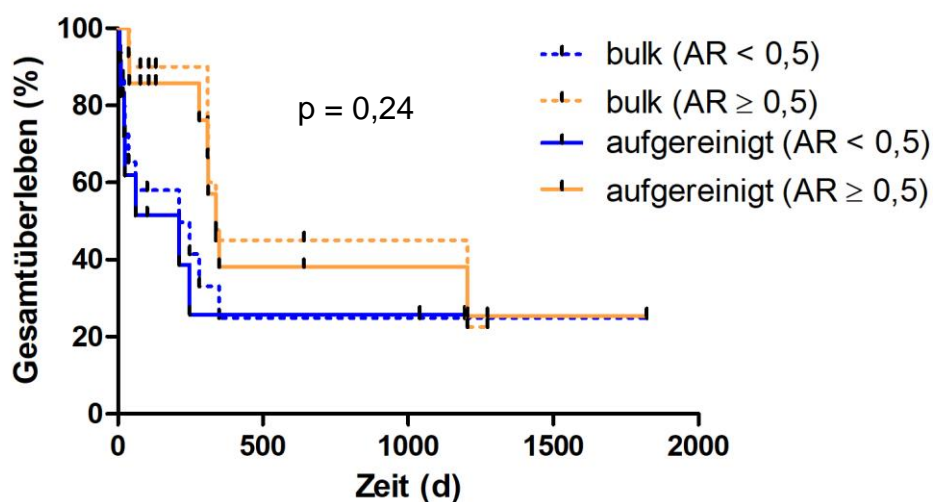


Abbildung 22: Gesamtüberleben im Vergleich der bulk- und aufgereinigten Population in Abhängigkeit der Allel-Ratio

## Ergebnisse

Die Überlebensanalyse in Abbildung 23 stellt die 20% der Patient\*innen mit der größten Allel-Ratio Differenz den restlichen Patient\*innen gegenüber. Dabei ist kein signifikanter Unterschied erkennbar ( $p=0,44$ ).

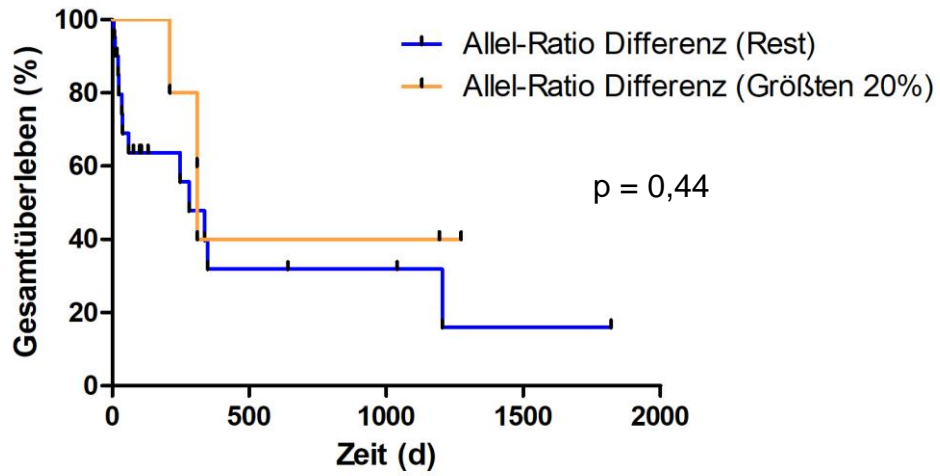


Abbildung 23: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der Allel-Ratio Differenz

## 4.8 Quantifizierung der Kolonien des CFU-Assays

Insgesamt wurden von den 26 auf *FLT3*-ITD positiv getesteten Proben 18 im Rahmen eines CFU-Assays in Methylcellulose kultiviert. Eine qualitative Auswertung gelang allerdings nur bei 7 der angesetzten Proben. Die 11 weiteren Proben der angesetzten CFU-Assays waren aufgrund von nicht Anwachsen der Proben, fehlender Anreicherung im Rahmen der Einschlusskriterien oder Verunreinigungen nicht zu verwerten. Vor allem die nach CD33 aufgereinigten Proben wuchsen seltener an, weshalb im Verlauf der Experimente der Ausschluss dieser Patientenproben erfolgte. Dies trifft auf 8 Proben zu, die zwar auf *FLT3*-ITD positiv getestet wurden, jedoch kein CFU-Assay angesetzt wurde.

Als erfolgreich galten Kolonien, die deutliche Zellzusammenschlüsse darstellten und bei denen sich vermuten ließ, dass sie aus einer ursprünglichen Zelle anwuchsen. Beispiele für solche Kolonien sind in Abbildung 24 gezeigt.

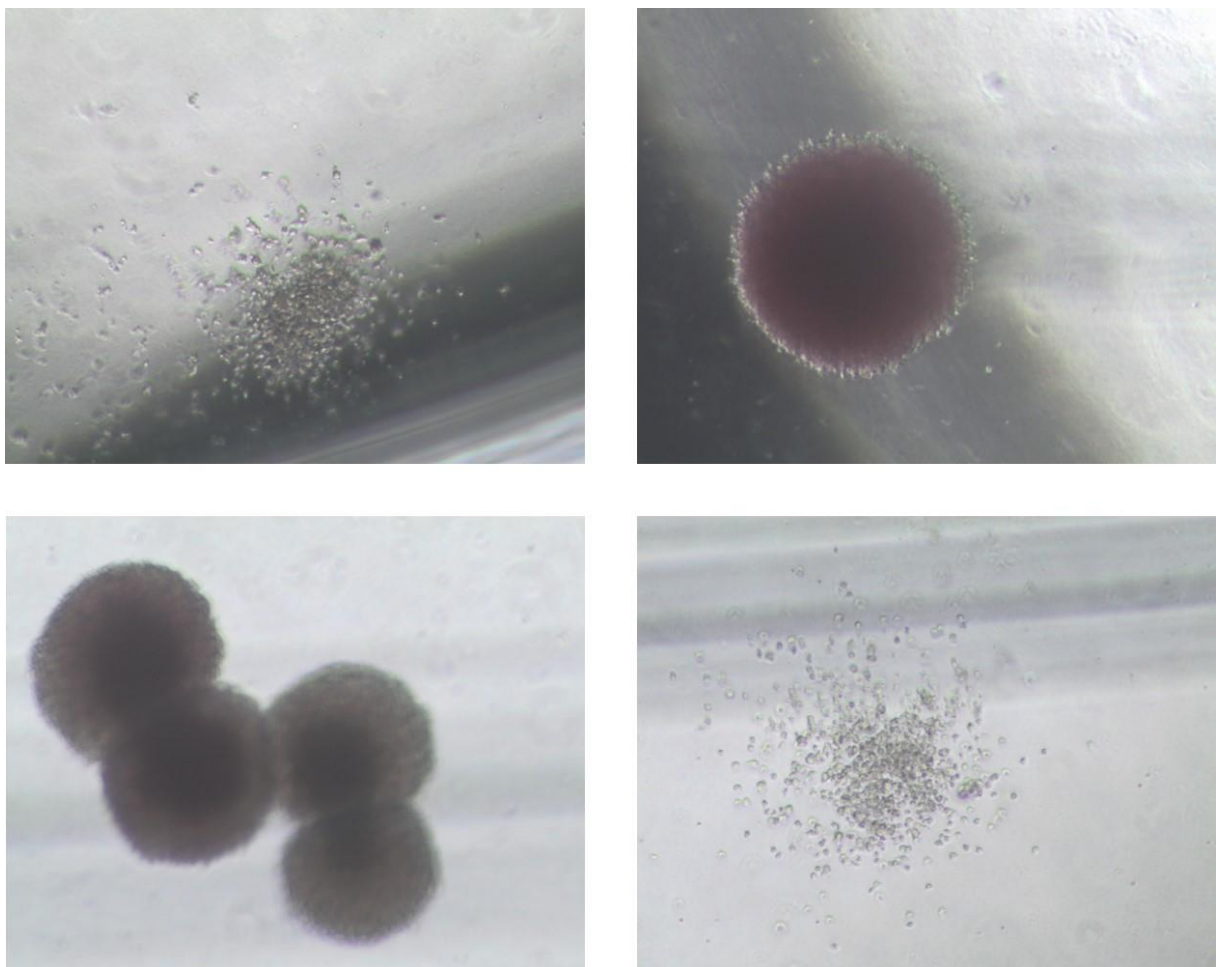


Abbildung 24: Kolonien im CFU-Assay

## Ergebnisse

Die Quantifizierung der Kolonienanzahl der 7 Proben ist aus Tabelle 24 zu entnehmen. Die Auszählung fand nach 14 Tagen Inkubation statt.

<b>Probe</b>		<b>Kontrolle</b>	<b>Crenolanib</b>	<b>PKC412</b>
<b>11</b>	bulk	152	75	∅
	CD33+	2	10	∅
<b>18</b>	bulk	9	4	4
	CD34+	9	3	4
<b>19</b>	bulk	26	5	8
	CD33+	42	5	10
<b>21</b>	bulk	42	14	11
	CD34+	14	1	2
<b>23</b>	bulk	46	17	10
	CD34+	52	14	8
<b>24</b>	bulk	5	10	9
	CD34+	21	10	10
<b>26</b>	bulk	94	24	41
	CD34+	30	2	5

Tabelle 24: Quantifizierung der Kolonien im CFU-Assay

Da bei den Proben 11 und 24 das Wachstum an Kolonien in den Kontrollansätzen ohne Inhibitor geringer ausfiel als in den Ansätzen mit Inhibitor bzw. kein Kolonienwachstum quantifiziert werden konnte, wurden diese beiden Proben aus der Analyse exkludiert.

### 4.8.1 Ansprechrate der Inhibitoren

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit bezieht sich auf die Ansprechrate der Inhibitoren Crenolanib und PKC412 (Midostaurin). Genauer gesagt, gilt es herauszufinden, ob sich das Ansprechen auf den jeweiligen Inhibitor zwischen der bulk- Population und der aufgereinigten Population unterscheidet.

#### 4.8.1.1 Crenolanib

In Tabelle 25 sind die Ansprechraten des Inhibitors Crenolanib der jeweiligen Patientenprobe für die beiden unterschiedlichen Populationen dargestellt.

##### Ansprechrate Crenolanib

Probe	bulk	aufgereinigt
18	55,6	66,7
19	80,8	88,1
21	66,7	92,9
23	63,0	73,1
26	74,5	93,3

Tabelle 25: Ansprechrate Crenolanib

In der graphischen Analyse lassen sich die Ansprechraten der aufgereinigten sowie der bulk- Populationen wie in Abbildung 25 gegenüberstellen. Zur Erleichterung der Betrachtung wurde eine Ursprungsgerade eingezeichnet, um die Punkte zu markieren, an denen die Ansprechrate beider Populationen identisch wäre.

In der Gesamtbetrachtung der eingezeichneten Proben fällt auf, dass die Ansprechraten des Inhibitors in allen aufgereinigten Populationen über denen der zugehörigen bulk- Populationen liegen.

## Crenolanib

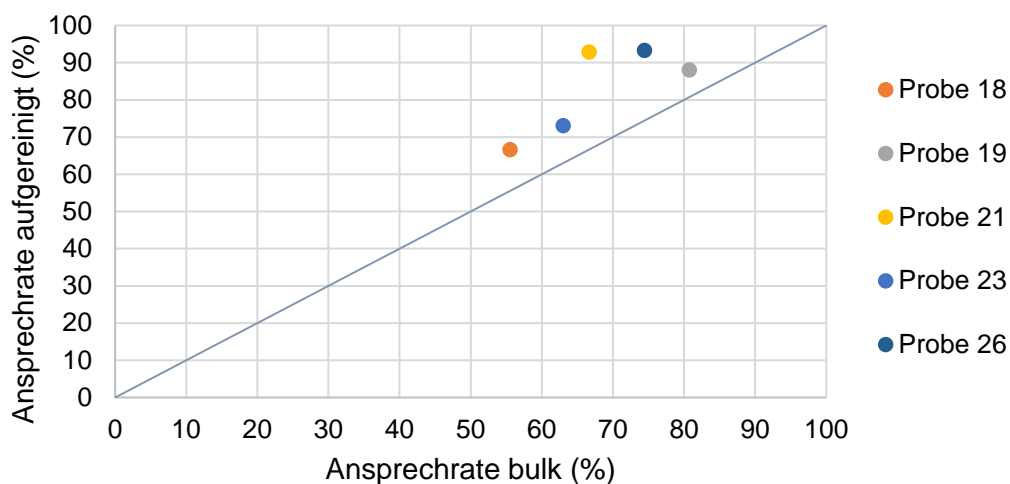


Abbildung 25: Ansprechrate Crenolanib

### 4.8.1.2 PKC412

Analog zu den Ergebnissen der Ansprechraten mit dem Inhibitor Crenolanib lassen sich folgende Ergebnisse für den zweiten getesteten Inhibitor PKC412 (Midostaurin) ableiten (siehe Tabelle 26 und Abbildung 26).

#### Ansprechrate PKC412

Probe	bulk	aufgereinigt
18	55,6	55,6
19	69,2	76,2
21	73,8	85,7
23	78,3	84,6
26	56,4	83,3

Tabelle 26: Ansprechrate PKC412

Die Gesamtbetrachtung der eingezeichneten Proben zeigt auch für PKC412 eine höhere Ansprechrate des Inhibitors auf die aufgereinigten Populationen im Vergleich zu den jeweiligen bulk- Populationen. Allerdings zeigt Probe 18 keinen Unterschied in den Ansprechraten der beiden Populationen.



## PKC412

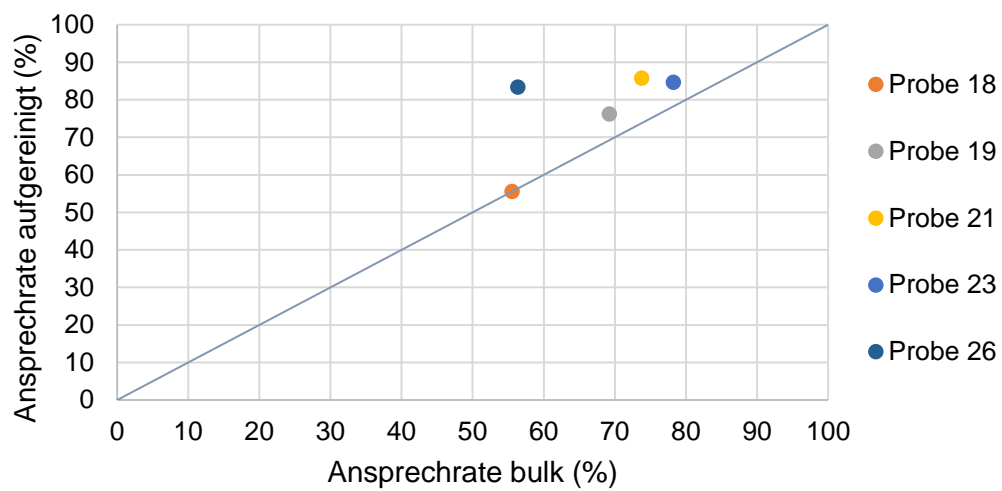


Abbildung 26: Ansprechrte PKC412

## 5 Diskussion

Die Resultate dieser experimentellen Arbeit sollen im Folgenden in Bezug auf die Diagnostik und die damit verbundene Einleitung entsprechender Postremissions-therapien vor dem Hintergrund der Fachliteratur diskutiert werden.

Dabei sieht diese Arbeit die Aufreinigung der Diagnoseproben vor ihrer Analyse als zusätzlichen und spezifizierenden Zwischenschritt in der Diagnostik an, der jedoch von Döhner et al. in den aktuellen ELN-Leitlinien zur AML nicht vorgesehen ist (Döhner et al. 2017).

### 5.1 Inzidenz und Quantität der *FLT3*-ITD

Nakao et al. beschrieben die interne Tandemduplikation des *FLT3*-Gens im Jahre 1996 zum ersten Mal (Nakao et al. 1996). Seither konnten zahlreiche Studien die Bedeutung der *FLT3*-ITD als prognostischen Faktor der AML herausarbeiten und diesen mit einer schlechten Prognose für die Patient\*innen assoziieren. Dabei sind *FLT3*-ITDs heterogen bezogen auf die Allelic Ratio, Anzahl der einzelnen Klone, Länge sowie Insertionsstelle (Stirewalt und Radich 2003; Kayser et al. 2009; Breitenbuecher et al. 2009). Insgesamt finden sich bei 20-30% aller erwachsenen AML- Patient\*innen eine interne Tandemduplikation des *FLT3*-Gens (Thiede et al. 2002; Stirewalt et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden quantitative Mutationsanalysen zweier unterschiedlicher Populationen (bulk und aufgereinigt) je Patientenprobe durchgeführt und deren Einfluss auf die *FLT3*-ITD/Wildtyp-AR untersucht. Da diese AR für die Risikostratifizierung und damit für die Therapieentscheidung herangezogen wird, kann die Genauigkeit der Diagnostik in Bezug auf das Gesamtüberleben untersucht werden (Döhner et al. 2017).

In der vorliegenden Studienkohorte liegt bei 53,8% der Patient\*innen zusätzlich zur *FLT3*-ITD eine *NPM1*- Mutation vor. In der Literatur liegt der Wert mit etwa 40% etwas niedriger für das gleichzeitige Vorliegen einer zusätzlichen *FLT3*- Mutation bei *NPM1*-mutierten Patient\*innen, was für die vorliegende Arbeit jedoch nicht relevant ist (Metzeler et al. 2016; Döhner et al. 2017).

## 5.2 Aufreinigung mittels magnetischer Zellseparation

Einige Studien untersuchten die magnetische Zellseparation von CD34<sup>+</sup>-Zellen bereits in den 90er Jahren. 1998 untersuchten Handgretinger et al. 26 pädiatrische Patient\*innen mit größtenteils der Diagnose eines Neuroblastoms und behandelten diese mit autologen oder allogenen Stammzelltransplantationen. Vor der Transplantation reicherten sie die CD34<sup>+</sup>-Zellen mithilfe dreier unterschiedlicher Kombinationen von Aufreinigungsmethoden an. Als Methoden verwendete die Studie zwei Verfahren von Miltenyi (SuperMACS und VarioMACS) sowie das Verfahren Ceparate SC von CellPro. Dabei kombinierten sie jeweils zwei Methoden (2x SuperMACS, SuperMACS + VarioMACS, CellPro + VarioMACS). Die Patientenzellen wurden mittels Leukozytapherese gewonnen. Der kumulierte Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen in den nativen Proben betrug im Median 1,7% und konnten durch die Aufreinigung auf 98,8% im Median gesteigert werden (Handgretinger et al. 1998). In einer Studie von Lang et al. aus dem Jahre 1999 wurden dieselben Methoden zur Aufreinigung verwendet, jedoch die Menge an eingesetzten MicroBeads in der Kombination Ceparate SC gefolgt von VarioMACS vor der zweiten Aufreinigungsmethode an den Anteil der CD34<sup>+</sup>-Zellen angepasst. Betrug dieser bereits mehr als 10% wurden statt der empfohlenen 100µl/10<sup>8</sup> Zellen MicroBeads 200µl/10<sup>8</sup> Zellen eingesetzt. Wurde durch die CellPro Aufreinigung der Anteil sogar auf >50% CD34<sup>+</sup> gesteigert, verwendeten die Forscher 300µl/10<sup>8</sup> Zellen MicroBeads. Der ursprüngliche Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen betrug 0,4% im Median. Durch die Aufreinigung konnte bei der CellPro- VarioMACS-Kombination der Anteil auf 96,2% im Median und bei der Aufreinigung mit dem „Zwei-Schritte MACS-System“ auf 97,6% im Median erhöht werden (Lang et al. 1999). Vergleichbare Werte konnten Schumm et al. 1999 in ihrer Studie nachweisen, in der sie den Anteil von medianen 2,67% CD34<sup>+</sup>-Zellen vor auf mediane 97% CD34<sup>+</sup>-Zellen nach der Aufreinigung anreichern konnten. Dabei verwendeten sie das CliniMACS-Verfahren von Miltenyi (Schumm et al. 1999).

Eine aktuelle Studie aus dem Jahre 2020 untersucht am Mausmodell die Behandlung des akuten Myokardinfarkts mit CD34<sup>+</sup>-Zellen und stellt dabei die beiden Aufreinigungsmethoden MACS und FACS gegenüber (Tripathi et al. 2020). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Aufreinigungsmethoden festgestellt (Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen: MACS: 0,9±0,2% vor vs. 87,44±2,4% nach und FACS: 1,6±0,23% vor vs. 92,22±1,28% nach).

## Diskussion

---

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigen die durchgeführten Analysen bezüglich der Menge der leukämischen Blasten pro Patient\*in in zwei unterschiedlichen Zellausgangspopulationen hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ). Während der mediane Blastengehalt der bulk- Populationen bei 27,4% [14,1; 42,4] gelegen hat, wurde dieser durch die MACS-Aufreinigung auf 94,5% [88,9; 96,4] gesteigert. Dadurch ergibt sich ein medianer Anreicherungsfaktor von 3,42 [2,06; 6,71]. Dies entspricht in etwa den Daten der zuvor erörterten Studien mit der Ausnahme, dass sich die Ausgangsanteile an CD34<sup>+</sup>-Zellen in den Studien deutlich unter denen der vorliegenden Arbeit befinden. Dies lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die Studienkohorten von Handgretinger et al. sowie Lang et al. hauptsächlich die Diagnose solider Tumore wie Neuroblastome oder Lymphome aufweisen (Handgretinger et al. 1998; Lang et al. 1999). Für die Studie von Schumm et al. gelten für die untersuchten Patient\*innen ( $n = 10$ ) dieselben Diagnosen, allerdings wurden zusätzlich dazu im Rahmen ihrer Studie 26 gesunde Spenderproben untersucht (Schumm et al. 1999). Zu den Stammzellspendenden in der Studie von Tripathi et al. wurden, außer dass die Proben im Rahmen von klinischen Indikationen gewonnen wurden, keine genaueren Angaben getätigt. Die Diagnose einer AML und das damit verbundene Ansteigen der Blastenzahl im KM und PB der Patient\*innen sorgt im Vergleich zu soliden Tumoren oder bei gesunden Patient\*innen für einen gesteigerten Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen in den Proben, was eine Erklärung für die Differenz der Ausgangsanteile an CD34<sup>+</sup>-Zellen darstellen könnte.

Da in der untersuchten Studienkohorte einige der 35 Patient\*innen eine *NPM1*-Mutation aufwiesen, welche die Herunterregulation des CD34- Oberflächenmoleküls begünstigt, wurde sich in diesen Fällen für die Aufreinigungen nach CD33 entschieden (Falini et al. 2005). Die Anwendungsprotokolle des Herstellers Miltenyi unterscheiden sich geringfügig voneinander (siehe Kapitel 3.2.7.3 und Kapitel 3.2.7.4), jedoch wurde ansonsten mit den Proben gleichermaßen verfahren. In der Gegenüberstellung der Analyseergebnisse ist ein kleiner Unterschied zu erkennen (CD33: 95% vs. CD34: 88%). Dies ist darauf zurückzuführen, dass zunächst die CD33-Aufreinigung im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht zufriedenstellend (CD33<sup>+</sup>-Anteile < 60%) abgelaufen ist, so dass eine Rücksprache mit dem Hersteller Miltenyi erfolgte, der darlegte, dass die Kalibrierung der MicroBeads anhand von Proben durchgeführt wurde, deren Blastengehalt ca. 30% betrug. Da der mediane Blastengehalt in der vorliegenden Studienkohorte jedoch bei 80% [12; 95] liegt, musste, wie in Kapitel

3.2.7.3 und Kapitel 3.2.7.4 beschrieben, die Menge an MicroBeads an den Blastengehalt adjustiert werden. Dieses Phänomen gilt auch für die CD34-MicroBeads, so dass die Adjustierung der verwendeten Materialien ebenfalls vollzogen worden ist. Allerdings waren zu diesem Zeitpunkt schon die Hälfte der Proben im Rahmen des Experiments ohne Anpassung der verwendeten Mengen untersucht worden, was die Ungenauigkeit in der Aufreinigung und den damit verbundenen Unterschied in den medianen Aufreinigungen erklärt.

Betrachtet man die sechs Patientenproben, die nach der Aufreinigung exkludiert wurden, zeigen davon 4 Proben (Nr. 30, 31, 34, 35) den zuvor beschriebenen Effekt der fehlenden Adjustierung der MicroBeads. Patient\*in Nr. 32 hingegen hat einen zu geringen nativen Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen (< 0,3%), so dass eine erfolgreiche Aufreinigung nicht erzielt werden konnte. Dies gilt wahrscheinlich auch für Probe 33 (4,53%). Ein ähnliches Phänomen beschreiben auch Lang et al. in ihrer Studie, in der sie bei niedrigen CD34<sup>+</sup>-Ausgangsanteilen lediglich Reinheiten von <60% gemessen haben (Lang et al. 1999).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Aufreinigung der Proben nach CD33 effektiver erfolgen konnte (medianer Anreicherungsfaktor 5,48 [2,62; 8,97]) als die Aufreinigung nach CD34 (medianer Anreicherungsfaktor 2,27 [1,75; 2,9]). Ursächlich dafür könnte neben den erhöhten Ausgangskonzentrationen an bereits positiven CD33 bzw. CD34 Zellen (CD33: 17,6% vs. CD34: 37,6%) in den bulk- Populationen eine generelle methodische Varianz sein. Diese lässt sich im Vergleich von Proben mit gleichen Ausgangskonzentrationen in der jeweiligen bulk- Population und dem, je nach gewählter Aufreinigung ermittelten Anreicherungsfaktor, erkennen.

### **5.3 Sensitivitätsvergleich konventionelle PCR mit Agarose-Gelelektrophorese und GeneScan Analyse**

Da eine *FLT3*-ITD mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, gilt es einen sensitiven und möglichst schnellen Nachweis der Mutation zu erbringen, um eine zielorientierte Therapie aufgrund von molekularen Eigenschaften zu initiieren. Dazu findet schon seit längerer Zeit das Verfahren der Kapillarelektrophorese Anwendung und löst vielerorts den Mutationsnachweis mittels konventioneller PCR ab bzw. ergänzt diesen (Baldus et al. 2006). Bereits 2005 haben Mills et al. die höhere Sensitivität kapillarelektrophoretischer Methoden gegenüber der herkömmlichen PCR

nachgewiesen. Für die Gelelektrophorese liegt die Sensitivität, basierend auf Verdünnungsreihen, bei etwa 2% - 5% und für die GeneScan Analyse liegt sie zwischen 0,28% - 2% (Mills et al. 2005; Lin et al. 2007; Ravandi et al. 2010; Bubán et al. 2011). Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Sensitivitäten liegt darin, dass ein herkömmliches Gel bei Vorliegen mehrerer kleiner *FLT3*-ITD Klone in einem Individuum diese einzelnen Fragmente nicht auftrennen kann. Die unterschiedlichen Sensitivitäten für die kapillarelektrophoretischen Methoden in den verschiedenen Studien hängen zum einen davon ab, dass zur Detektion in der Analyse die relative Fluoreszenzeinheit (RFU, engl. „relative fluorescence unit“) als Maß für eine Mutation analysiert wird und zum anderen die Mindesthöhe der Signalpeaks, welche als Mutation gewertet werden, in den Studien jeweils unterschiedlich hoch angesetzt wurde (Bubán et al. 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind die verbliebenen 26 Patientenproben jeweils sowohl mittels konventioneller PCR als auch kapillarelektrophoretischer Methode untersucht worden. Dabei konnte in allen vorliegenden Proben die *FLT3*-ITD durch beide Methoden festgestellt werden. Somit stellen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit hinsichtlich der Sensitivität bezogen auf das Erkennen der *FLT3*-ITD Mutation keine Unterschiede fest, was vermutlich am geringen Umfang der Studienkohorte liegt. Die Erkenntnis, dass kein signifikanter Sensitivitätsunterschied hinsichtlich des Detektierens einer Mutation vorliegt, wird durch andere Studien bestätigt (Shih et al. 2002; Bubán et al. 2011; Lin et al. 2007).

Im direkten Vergleich lässt sich jedoch folgender Unterschied erkennen: Durch die Agarose-Gelelektrophorese wurde bei lediglich vier Proben mehr als ein *FLT3*-ITD Klon festgestellt. In der GeneScan- Analyse konnten weitere vier Proben identifiziert werden, von denen eine Probe sogar drei verschiedene Klone aufwies. Dies bestätigt die Resultate aus vielen die GeneScan- Analyse untersuchenden Studien, welche eine größere Sensitivität hinsichtlich der Detektion mehrerer, vor allem dicht beieinander liegender *FLT3*-ITD Klone für die GeneScan-Analyse feststellen konnten (Pratcorona et al. 2013; Schlenk et al. 2014).

Weitere Sensitivitätsunterschiede bestehen vor allem in Bezug auf die Quantifizierung der *FLT3*-ITD, welche im folgenden Kapitel thematisiert wird.

## 5.4 Bedeutung der Allel-Ratio in der AML

Da in den aktuellen Leitlinien für die Diagnose die Einteilung in Risikogruppen und vor allem die Therapiewahl der AML die *FLT3*-ITD AR einen hohen Stellenwert einnimmt, hat die GeneScan- Analyse an Bedeutung gewonnen, denn nur sie ermöglicht die genaue Größen- und Mengenbestimmung einzelner *FLT3*-ITD- Klone. Diese Ermittlungen sind Grundvoraussetzungen zur präzisen Quantifizierung der Verhältnisse zwischen Wildtyp und mutiertem *FLT3*-Gen und somit zur Berechnung der AR.

Bezogen auf eine AML mit Vorliegen einer *FLT3*-ITD raten die aktuellen Empfehlungen zu einer Induktionstherapie („7 + 3 – Schema“) in Kombination mit dem *FLT3*-Inhibitor Midostaurin gefolgt von zwei unterschiedlichen Postremissionstherapien (PRT), zwischen denen sich nach einer patientenorientierten Risikostratifizierung entschieden wird. Die Wahl der PRT hängt von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise des *NPM1*-Status, der *FLT3*-ITD AR und des AZ ab (siehe Kapitel 2.9). Anhand dieser Faktoren werden die Patient\*innen bezogen auf die PRT in zwei Risikogruppen eingeteilt: günstig und ungünstig. Den größten Einfluss auf die Einteilung hat dabei die *FLT3*-ITD AR. Beträgt die AR  $\geq 0,5$  zählen die Patient\*innen zur ungünstigen Risikogruppe und es wird eine allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT) angestrebt. Patient\*innen mit einer AR  $< 0,5$  haben ein günstigeres Risikoprofil, weshalb bei ihnen eine Hochdosischemotherapie mit Cytarabin empfohlen wird (Döhner et al. 2017). Dieser „cut-off“-Wert als Kriterium zur Einteilung in die unterschiedlichen Risikogruppen wurden in zahlreichen Studien untersucht, so dass der Wert von 0,5 bestätigt und festgelegt werden konnte (Gale et al. 2008; Pratcorona et al. 2013; Schlenk et al. 2014; Linch et al. 2014).

Zwischen Patient\*innen mit niedriger *FLT3*-ITD AR ( $< 0,5$ ) und Patient\*innen mit *FLT3*-Wildtyp liegt kein signifikanter Unterschied im klinischen Verlauf vor (beide gehören zur günstigen Risikogruppe), was den Aufwand der GeneScan Analyse erfordern würde. Allerdings ist die exakte AR- Quantifizierung nicht nur für die PRT-Entscheidung essentiell, sondern auch für die Verlaufsuntersuchung und vor allem für den Fall eines Rezidivs, da dies meist mit einer Mengenzunahme einzelner *FLT3*-ITD-Klone assoziiert ist (Gale et al. 2008; Pratcorona et al. 2013; Schlenk et al. 2014). Gleiche Ergebnisse konnten Ho et al. in ihrer Studie zeigen, jedoch liegt bei ihnen der „cut- off“- Wert bei 0,8 (Ho et al. 2016). Deshalb empfehlen die aktuellen Leitlinien für die Beurteilung des Verlaufs der Erkrankung sowie die Abschätzung eines Rezidivs

## Diskussion

---

die Kontrolle der minimalen Resterkrankung (MRD, von engl. „minimal residual disease“) (Döhner et al. 2017). Für die Beurteilung der MRD wird die GeneScan Analyse verwendet, da durch die sensitive Beurteilung der *FLT3*-ITD frühzeitig kleine Subklone erkannt werden können, welche erst im Verlauf zunehmen (Buccisano et al. 2010; Ossenkoppele und Schuurhuis 2014; Grimwade und Freeman 2014).

Bei den Analysen der bisherigen Studien sowie der Routinediagnostik stammen die entnommenen Proben meist aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark. Vor der Analyse in der Gelelektrophorese oder der Kapillarelektrophorese findet lediglich die Vervielfältigung des *FLT3*-Gensegments mittels PCR statt.

Die Gegenüberstellung der Quantifizierungen der *FLT3*-ITD-AR von der bulk sowie der aufgereinigten Population einer erkrankten Person und deren Bedeutung für die Therapieentscheidung gilt als ein Kernstück der vorliegenden Arbeit. Wie bereits erwähnt, wurde als „cut off point“ der in den Empfehlungen des ELN (European LeukemiaNet) publizierte Wert von 0,5 verwendet (Döhner et al. 2017).

Für 4 Patient\*innen (1, 13, 16 und 20) verschiebt sich durch die Aufreinigung der Probe die Einteilung der erkrankten Person aus der Gruppe der günstigeren Prognose (AR <0,5) in die Gruppe der ungünstigeren Prognose (AR ≥ 0,5), wodurch sich auch die Therapieentscheidung ändern würde.

Bei fünf andere der 26 Patientenproben (2, 7, 10, 23 und 25) liegen die Werte der AR nach der Aufreinigung jeweils unterhalb der Werte der bulk- Populationen. Dabei weist die Differenz bei den vier Proben 7, 10, 23 und 25 nur ≤0,03 auf, was aufgrund der Sensitivität der GeneScan Analyse von ca. 2-3% als vergleichbares Ergebnis der beiden Populationen angesehen werden kann. Des Weiteren beträgt der Blastenanteil der Proben vor Aufreinigung über 75%, so dass die Sensitivität der AR-Berechnung bereits ausreichend hoch war. Die Differenz von 0,16 bei Probe 2 lässt sich am ehesten durch einen Messfehler oder aber das Vertauschen der beiden Populationen erklären.

Die Vermutung, dass die Sensitivität als Ursache der Differenzen angesehen wird, untermauert der Variationskoeffizient, welcher während der Etablierung der Analyse einer *FLT3*-ITD mittels GeneScan berechnet worden ist. Dabei wird aus Abbildung 27 deutlich, dass je niedriger die Mutationsfrequenz ist, der Variationskoeffizient (VK), von ein und derselben Probe in Serie gemessen, pro Messung höher ist.



## VK (Serie) in Abhängigkeit von der Mutationsfrequenz

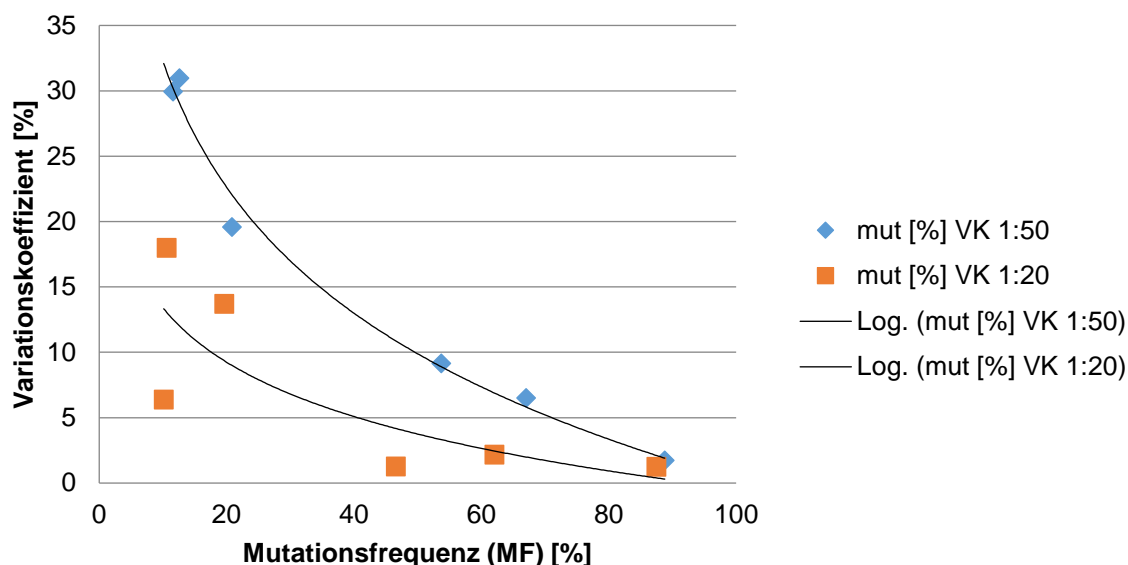


Abbildung 27: Variationskoeffizient in Abhängigkeit der Mutationsfrequenz

Solch ein geringer Unterschied von  $\leq 0,03$  der ARs zwischen den beiden Zellpopulationen vor und nach der Aufreinigung einer Patientenprobe ist bei 7 weiteren Proben zu erkennen. An dieser Stelle ist festzuhalten, dass die ARs der aufgereinigten Proben höher sind als die der bulk- Populationen, jedoch die jeweilige Differenz ebenfalls aufgrund der Sensitivität der Messmethode zu vernachlässigen ist und das Ergebnis als vergleichbar angesehen werden kann. Als weitere Ursache ist der hohe Blastengehalt in den Proben zu nennen, welcher im Median bei 87,5% liegt und somit durch die Aufreinigung kein signifikanter Unterschied in der AR berechnet werden konnte ( $p=0,9$ ).

Die vier Patient\*innen, welche durch die Aufreinigung in die Gruppe der ungünstigen Prognose eingeteilt worden wären, gilt es im Folgenden genauer zu betrachten. Dabei fällt auf, dass Patient\*in 20 lediglich eine Differenz von 0,01 in den ARs aufgewiesen hat und sich somit die AR von 0,49 auf 0,5 nach der Aufreinigung erhöhte. Dies liegt an einem Blastengehalt von 91% und einem Anreicherungsfaktor von 1,54. Der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen betrug zwar nach der Aufreinigung 93,5%, jedoch war vor der Aufreinigung schon ein Anteil von 60,7% nachweisbar, weshalb die Sensitivität der AR-Berechnung schon vor der Aufreinigung ausreichend hoch war und, wie zuvor beschrieben, die Messergebnisse als gleich anzusehen sind. Für die Patient\*innen 1, 13 und 16 gilt eine durchschnittliche Differenz der ARs von 0,09. Diese erhöhten

## Diskussion

---

Differenzunterschiede lassen sich am ehesten durch die niedrigen CD33<sup>+</sup>-Anteile (17,6%, 18,1%, 39,5%) vor der Aufreinigung und einen damit verbundenen erhöhten Anreicherungsfaktor von  $\geq 2,33$  erklären. Dadurch konnte die AR Quantifizierung präziser berechnet werden und eine adäquate, risikoadaptierte Therapieentscheidung hätte erfolgen können.

Bei acht Proben (30,8%) konnte mittels der Aufreinigung eine Differenz zur bulk- AR von  $\geq 0,1$  ermittelt werden. Dabei ist keine Korrelation zu den in der vorliegenden Arbeit gesammelten und berechneten Patientendaten wie Blastengehalt, Anreicherungsfaktor oder CD33/34 Positivität festgestellt worden.

In der Korrelationsanalyse der AR mit CD 33/34-Expression aus den Gesamtdaten zeigte sich in der bulk-Population eine negative Korrelation ( $r: -0,351$ ) im Verhältnis zu einer leicht positiven Korrelation ( $r: 0,062$ ) in der aufgereinigten Population. Aufgrund der geringen Stichprobengröße sind beide Korrelationen jedoch nicht signifikant (bulk: p-Wert 0,079 und aufgereinigt p-Wert 0,765).

Vor der angeschlossenen Korrelation zwischen AR und Anreicherungsfaktor wurde sich für eine stringente Outlieranalyse mit iterative Grubbs entschieden, die weitere 5 Proben identifizierte, welche von der Analyse exkludiert wurden. In Abbildung 19 ist eine positive Korrelation zwischen der AR und dem Anreicherungsfaktor ( $r: 0,403$ ) zu erkennen. Allerdings ist auch hier keine Signifikanz zu erkennen ( $p: 0,07$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tendenz einer positiven Korrelation sowohl zwischen der AR und der CD 33/34-Expression in der aufgereinigten Population im Vergleich zur bulk-Population zu erkennen ist als auch zwischen der AR und dem Anreicherungsfaktor. Die fehlende Signifikanz der Korrelationsanalysen beruht am ehesten auf der geringen Stichprobengröße und müsste im Rahmen einer größer angelegten Studie für eindeutigere Aussagen erneut untersucht werden.

## 5.5 Perspektive für die AML Diagnostik und Therapie

Mit Hilfe der aktuellen WHO-Klassifikation und den Empfehlungen des ELN kann eine AML spezifisch auf Basis ihrer zytogenetischen und molekularbiologischen Veränderungen diagnostiziert und anhand dessen die patientenindividuelle prognostische Einschätzung sowie eine zielgerichtete Therapiewahl entscheidend beeinflusst werden (Arber et al. 2016; Döhner et al. 2017).

In den letzten Jahren wurden hauptsächlich genetische Veränderungen wie beispielsweise die interne Tandem Duplikation des *FLT3*-Gens (*FLT3*-ITD) oder die *NPM1*-Mutation untersucht, wobei die mit einer ungünstigeren klinischen Prognose korrelierte *FLT3*-ITD in durchschnittlich 20-30% der AML-Fälle vorliegt (Thiede et al. 2002; Stirewalt und Radich 2003). Neben diesen beiden molekularen Aberrationen wurden zahlreiche weitere genetische Veränderungen wie deregulierte Genexpressionen oder Genmutationen identifiziert, welche ebenfalls Gegenstand der aktuellen Forschungen und Diagnostik sind.

Zahlreiche Studien zeigen, dass nicht nur das Vorliegen einer Mutation im *FLT3*-Gen für die Prognose eine Rolle spielt, sondern die genaue Menge an mutiertem Allel, welche in der quantifizierten *FLT3*-ITD/Wildtyp Allelic Ratio angegeben wird, einen entscheidenden Einfluss besitzt (Schlenk et al. 2014; Sakaguchi et al. 2018).

Die vorliegende Studie hat sich mit dieser AR beschäftigt und versucht die Unterschiede der bulk- Population im Vergleich zur aufgereinigten Population zu analysieren (siehe Kapitel 5.4). Da die AR maßgeblich für die Entscheidung der Postremissionstherapie (PRT) herangezogen wird, sind in Abbildung 28 all' die Patient\*innen mit ihren klinischen Daten in einer Kaplan-Meier-Darstellung aufgetragen, für die nach der Aufreinigung eine  $AR \geq 0,5$  berechnet wurde, was für 14 der 26 in die Studie eingeschlossenen Patient\*innen zutrifft. 50% von ihnen erhielten als PRT eine Chemokonsolidierung, die anderen 50% eine allogene Stammzelltransplantation (alloHSCT). Für das OS liegt ein hoch signifikanter Unterschied ( $p=0,007$ ) zwischen den beiden Therapieoptionen als PRT vor. Patient\*innen, die mit einer alloHSCT behandelt wurden, lebten im Median 40,1 Monate, wohingegen die chemotherapierten Patient\*innen 9,3 Monate überlebten.

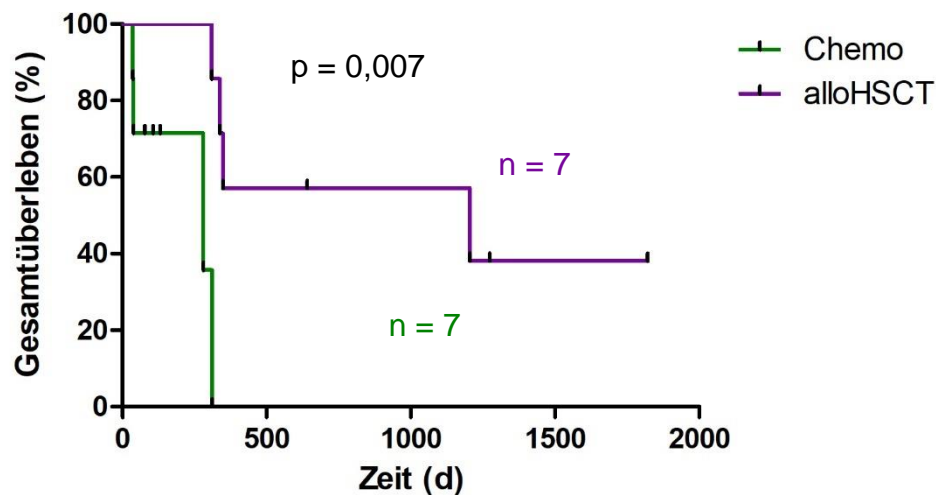


Abbildung 28: Überlebensanalyse von Patient\*innen mit aufgereinigter AR  $\geq 0,5$

Dieser Überlebensanalyse steht Abbildung 29 gegenüber, in der all' die Patient\*innen (n=12) mit ihren Überlebenszeiten abhängig von der gewählten Therapie aufgetragen sind, welche eine aufgereinigte AR  $< 0,5$  aufwiesen. Für diese Patient\*innen konnte kein signifikanter Unterschied in der Wahl der PRT festgestellt werden (p=0,306).

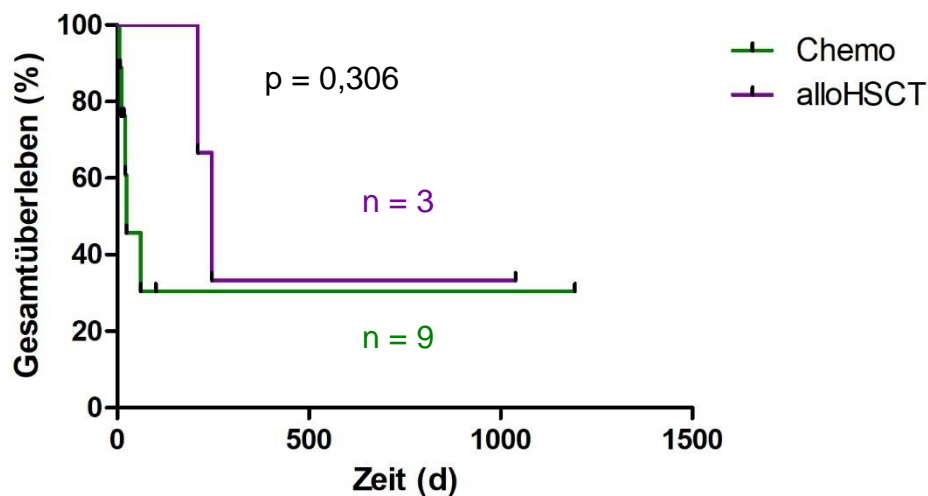


Abbildung 29: Überlebensanalyse von Patient\*innen mit aufgereinigter AR  $< 0,5$

Wie aus Kapitel 4.6 hervorgeht, verschiebt sich bei 4 Patient\*innen der vorliegenden Arbeit durch die Aufreinigung der Probe die Einteilung der erkrankten Person aus der Gruppe der günstigeren Prognose (AR  $< 0,5$ ) in die Gruppe der ungünstigeren Prognose (AR  $\geq 0,5$ ). Da Entscheidungen in der Krebstherapie stets individuell getroffen werden, erhielten bereits zwei der 4 Patient\*innen eine alloHSCt. Dies ist

## Diskussion

---

am ehesten durch die hohen AR-Werte vor der Aufreinigung von 0,46 und 0,49 zu erklären, so dass sich in Zusammenschau der klinischen und laborchemischen Situation für die intensivierete PRT entschieden wurde. Im Falle der zwei anderen Patient\*innen hätte sich die Therapieentscheidung geändert und ein längeres OS wäre zu erwarten gewesen.

Die in Kapitel 4.7.4 dargestellte Überlebensanalyse des Vergleichs der bulk- und aufgereinigten Population in Abhängigkeit der AR (Abbildung 22) zeigt zwar keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,24$ ), jedoch ist eine Tendenz zu erkennen, die ein kürzeres Gesamtüberleben in der aufgereinigten Population vermuten lässt. Dies könnte ggf. durch eine Verschiebung von Patient\*innen aus der bulk-Population mit konventioneller Therapie trotz tatsächlich vorliegender ungünstiger Prognose erklärt sein. Das überraschenderweise längere Gesamtüberleben der Patient\*innen mit einer ungünstigeren Prognose ( $AR \geq 0,5$ ) ist erklärbar durch einen höheren Anteil an durchgeführten alloHSCT, wie es auch in den gängigen Leitlinien empfohlen ist. Für eine statistisch aussagekräftige Konklusion wäre jedoch eine Studie mit größerer Fallzahl notwendig.

Da im Rahmen dieser Arbeit nur wenige Patient\*innen ( $n=14$ ) mit einer aufgereinigten  $AR \geq 0,5$  inklusive klinischer Daten untersucht werden konnten, lässt sich keine statistisch aussagekräftige Schlussfolgerung für die klinische Relevanz bezogen auf die AR Diagnostik tätigen. Allerdings zeigen die bisherigen Messergebnisse eine Tendenz, die für eine präzisere Analyse durch die Aufreinigung im Rahmen der klinischen Diagnostik spricht, da das OS hoch signifikant von der risikoadaptierten PRT abhängt und somit der Mehraufwand der Aufreinigung der Patientenproben vor Ermittlung der AR gerechtfertigt scheint. Dies gilt es, wie bereits oben erwähnt, in weiteren Studien mit größer angelegten Patientenkohorten genauer zu untersuchen.

### 5.6 Inhibitoren

Ein großes Ziel der AML-Therapie ist das zielgerichtete Stoppen der Vermehrung der leukämischen Blasten. Dabei gilt es präzise die Rezeptoren zu hemmen, welche bei den molekularbiologischen und zytogenetischen Untersuchungen identifiziert wurden. Für die *FLT3*-Mutationen existieren verschiedene Multikinaseinhibitoren, welche konstant weiterentwickelt und neu entdeckt werden (siehe Kapitel 2.9).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Fähigkeit der *in vitro* Koloniebildung der Patientenproben sowohl ausgehend von der bulk-Population als auch von der aufgereinigten Population beobachtet und das Ansprechen auf die Inhibitoren Midostaurin sowie Crenolanib untersucht.

#### 5.6.1 Midostaurin

Die aktuellen ELN-Leitlinien empfehlen zur Therapie der *FLT3*-mutierten AML die zusätzliche Gabe des Multikinaseinhibitors Midostaurin (Döhner et al. 2017). Dabei werden Dosen von 50mg zweimal täglich verabreicht, wodurch CR Raten von 80% erreicht werden (Stone et al. 2012). Dies entspricht den Raten aus der Studie von Gale et al. aus dem Jahre 2008, die keine signifikanten Unterschiede für die CR abhängig von einer *FLT3*-ITD festgestellt haben (*FLT3*-wt: 84% vs. *FLT3*-ITD niedrig-hoch: 82-85%). Allerdings stellten sich signifikante Verschlechterungen bei einer *FLT3*-ITD bezogen auf das OS und Rezidivrisiko nach fünf Jahren heraus ( $p < 0,001$ ) (Gale et al. 2008). In einer randomisiert kontrollierten Studie stellten Stone et al. ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der CR zwischen der mit Midostaurin therapierten Gruppe und der Placebo Gruppe fest ( $p = 0,15$ ). Sie wiesen jedoch ein signifikant verlängertes Event-freies Überleben in der Midostaurin Gruppe im Vergleich zur Placebo Gruppe nach ( $p = 0,002$ ) (Stone et al. 2017).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind für 7 Patientenproben ein auszählbares Ergebnis der CFU-Assays erhoben worden. Davon sind zwei Proben auffällig, bei denen die Beobachtungen kritisch hinterfragt werden müssen. Für Probe 4 wurde ein negatives Ansprechen ermittelt, was ein vermehrtes Kolonienwachstum des mit Midostaurin gehemmten Ansatzes im Vergleich zum Kontrollansatz bedeutet. Da dies ebenfalls für den Ansatz mit dem Inhibitor Crenolanib bei dieser Probe zutrifft, ist am ehesten zu vermuten, dass die Zellzahl und bzw. oder die Vitalität der eingesetzten Zellen in der Kontrolle nicht ausreichend hoch war, weshalb das Anwachsen der Kolonien in diesem bulk- Kontrollansatz deutlich geringer ausgefallen ist. Die

100%- ige Ansprechrate bei Probe 7 lässt auf einen Fehler im Ansatz der CFU-Assays schließen, denn von allen 6 für diese Probe (3 x bulk plus 3 x CD33<sup>+</sup>) angesetzten Assays, erfolgt lediglich bei zwei Ansätzen eine Auszählung.

Werden diese beiden Proben für die Auswertung exkludiert, wird anhand von Abbildung 26 (siehe Seite - 64 -) ein effektiveres Ansprechen der aufgereinigten Populationen auf den Inhibitor Midostaurin im Vergleich zur bulk- Population deutlich. Dabei steht ein durchschnittliches Ansprechen von 66,6% für die bulk- Proben einem Ansprechen der aufgereinigten Proben von 77,1% gegenüber. Diese Ergebnisse bestätigen die Wirksamkeit des Multikinaseinhibitors und lassen vermuten, dass das Ansprechen auf die leukämischen Blasten, welche in den aufgereinigten Populationen in höherer Reinheit vorliegen, auf Midostaurin größer ist als auf nicht-leukämische Blasten, welche vor allem in den bulk- Populationen enthalten sind. Allerdings kann für präzise Aussagen bezüglich der Ansprechrate von Midostaurin keine Prognose getätigt werden, da die Probenanzahl mit  $n = 5$  zu gering ist. Die Tendenz der vorliegenden Experimente bestätigt jedoch die Wirkung von Midostaurin als *FLT3*-ITD Inhibitor und verifiziert ihn als potenzielles Therapeutikum in der *FLT3*-ITD mutierten AML. Weiterführende Studien mit einer höheren Probenanzahl könnten diese Tendenz verifizieren.

### 5.6.2 Crenolanib

Obwohl Crenolanib noch in klinischen Studien erprobt und der Einsatz für die *FLT3*-mutierte AML diskutiert wird, lassen erste Ergebnisse auf einen Vorteil vor allem in Bezug auf die gleichzeitig geringere Hemmung des *c-KIT* Rezeptor im Vergleich zu anderen Inhibitoren wie Quizartinib schließen. Des Weiteren gilt Crenolanib als potenter Inhibitor sowohl für eine *FLT3*-ITD als auch die resistente *FLT3*-D835 Mutation (Galanis et al. 2014; Smith et al. 2014; Zimmerman et al. 2013). Nach aktuellem Stand der Forschung existieren noch keine randomisierten, placebo-kontrollierten Studien mit Crenolanib als Therapeutikum in der Primärbehandlung einer *FLT3* mutierten AML.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte, wie bereits für den zuvor beschriebenen Inhibitor Midostaurin, für 7 Patientenproben ein auszählbares Ergebnis der CFU-Assays erhoben werden. Für Probe 4 ist, ebenso wie bei dem mit Midostaurin gehemmten Ansatz, ein negatives Ansprechen ermittelt worden, was ein vermehrtes

## Diskussion

---

Koloniewachstum des mit Crenolanib gehemmten Ansatzes im Vergleich zum Kontrollansatz bedeutet. Analog zur zuvor beschriebenen Erklärung ist dies am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Zellzahl und bzw. oder die Vitalität der eingesetzten Zellen in der Kontrolle nicht ausreichend hoch war. Die zweite stark negative Ansprechrate (-400) bei Probe 7 lässt ebenfalls entsprechend der Midostaurin Erklärung für selbige Probe auf einen Fehler im Ansatz schließen, da von insgesamt sechs Ansätzen lediglich zwei ausgezählt werden konnten.

Demnach wurden auch für die Auswertung des Inhibitors Crenolanib die zwei beschriebenen Proben exkludiert, so dass, wie in Abbildung 25 (siehe Seite - 63 -) zu erkennen ist, ein effektiveres Ansprechen der aufgereinigten Populationen vergleichbar zu Midostaurin deutlich wird. Für Crenolanib steht das durchschnittliche Ansprechen von 68,1% (bulk) dem von 82,8% (aufgereinigt) gegenüber. Auch wenn im direkten Vergleich zwischen Midostaurin und Crenolanib keine signifikanten Aussagen aufgrund der geringen Studienkohorte möglich sind, lässt sich eine leicht erhöhte Ansprechrate des Crenolanibs aus den vorliegenden Messergebnissen vermuten. Zu betonen gilt jedoch, dass in der Crenolanib-Behandlung der vorliegenden Experimente geringere Dosen des Inhibitors verabreicht wurden (Crenolanib 10nM vs. Midostaurin 200nM), um vergleichbare Werte zu erhalten. Bevor jedoch Crenolanib als Therapeutikum zur *FLT3*-mutierten AML in Betracht gezogen werden kann, sollten weitere Studien vor allem auch in einem randomisierten und placebokontrollierten Design erfolgen.



## 6 Zusammenfassung

In der Pathogenese einer akuten myeloischen Leukämie nehmen zytogenetische und molekularbiologische Veränderungen eine zentrale Rolle ein. Diese Veränderungen haben Auswirkungen auf den klinischen Verlauf und ermöglichen somit Aussagen über die patientenindividuelle Prognose, weshalb sie zentraler Bestandteil in der Therapieentscheidung sind. Vor allem Patient\*innen, welche einen normalen Karyotyp aufweisen, werden über molekularbiologische Veränderungen wie die interne Tandemduplikation des *FLT3*-Gens (fms-related tyrosine kinase 3) oder die Mutation des *NPM1*-Gens (*Nucleophosmin 1*) subklassifiziert, so dass eine adaptierte Risikostratifizierung erfolgen kann.

Für Patient\*innen mit einer *FLT3*-ITD existieren abhängig vom individuellen Risikoprofil zwei unterschiedliche Postremissionstherapien, welche nach Erreichen einer kompletten Remission initiiert werden. Für die Patient\*innen der Gruppe des niedrigen Risikoprofils wird eine Hochdosischemotherapie mit konsekutiver Midostaurin Gabe empfohlen. Hingegen wird für die Patient\*innen mit einem hohen Risikoprofil eine allogene Stammzelltransplantation empfohlen. Hauptausschlaggebend für die Einteilung der *FLT3*-ITD-mutierten Patient\*innen in die Risikogruppen ist die *FLT3*-ITD Allelic Ratio, welche das Verhältnis des mutierten Allels zum wildtypischen Allel widerspiegelt. Zahlreiche Studien konnten nachweisen, dass Patient\*innen mit einer erhöhten *FLT3*-ITD AR ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben sowie Event-freies Überleben aufwiesen (Gale et al. 2008; Pratcorona et al. 2013; Linch et al. 2014; Schlenk et al. 2014). Die Erkenntnisse aus diesen Studien führten dazu, dass in den ELN- Empfehlungen aus dem Jahre 2017 die *FLT3*-ITD AR mit einem „cut off“ Wert von 0,5 als Bestandteil der PRT Entscheidung aufgenommen wurde.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die Gegenüberstellung der berechneten AR zweier verschiedener Ausgangspopulationen einer erkrankten Person und den damit einhergehenden Einfluss auf die Entscheidung der PRT.

Dieser Fragestellung wurde anhand von 26 Patientenproben nachgegangen, bei denen zur *FLT3* Diagnostik und anschließender AR-Berechnung neben der nativen bulk- Population zusätzlich, abhängig von ihrem Immunphänotyp, eine nach CD33 bzw. CD34 aufgereinigte Population verwendet wurde. Durch die Aufreinigung konnte eine mediane Anreicherung von 3,42 erreicht werden, so dass der Anteil an

## Zusammenfassung

---

leukämischen Blasten signifikant gesteigert wurde. Für die anschließende Berechnung der *FLT3*-ITD AR wurde die Menge des mutierten sowie wildtypischen Allels mit Hilfe der GeneScan Analyse, bei der es sich um eine kapillarelektrophoretische Methode handelt, gemessen. Dabei konnte eine mediane Differenz der berechneten ARs von 0,05 ermittelt werden. Dies stellt zwar keinen signifikanten Unterschied dar, jedoch hätte diese Verschiebung der AR für vier Patient\*innen der vorliegenden Arbeit eine Zuteilung in die ungünstige Risikoprofilgruppe zur Folge gehabt. Nachfolgend wäre aufgrund dieser Verschiebung eine Änderung in der Entscheidung für die PRT erfolgt, wodurch für die Patient\*innen eine alloHSCT angestrebt worden wäre. Die Ergebnisse konnten je Risikogruppe mit den tatsächlich erfolgten Therapien der Patient\*innen aus der Klinik korreliert werden, wobei in der ungünstigen Risikogruppe bezogen auf das Gesamtüberleben ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Hochdosischemotherapie und der alloHSCT zugunsten der alloHSCT vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl statistisch für die vorliegende limitierte Patientenkohorte kein signifikanter Unterschied der ARs aus den verschiedenen Populationen gezeigt wurde, individuelle Therapieentscheidungen drastisch beeinflusst werden könnte. Deshalb lässt sich keine allgemeine Empfehlung zur Spezifizierung der Routinediagnostik durch diese Ergebnisse ableiten, allerdings sollte die Therapiewahl in der Onkologie stets immanent und patientenzentriert erfolgen, weshalb eine Umstellung im Ablauf der Diagnosestellung trotz des geringen Mehraufwands wünschenswert wäre.

Als weiterer Aspekt dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von Patientenproben zur Koloniebildung in einem CFU-Assay und die Effektivität der Hemmung durch die *FLT3*-Inhibitoren Crenolanib und Midostaurin untersucht.

Für beide Inhibitoren ist ein effektiveres Wirken in den aufgereinigten Populationen nachgewiesen worden, was die Spezifität der Wirkung auf die *FLT3*-mutierten leukämischen Blasten vermuten lässt. Allerdings war der Umfang an Patientenproben so gering, dass keine statistische Aussage getroffen werden konnte. Ein Vergleich der beiden Inhibitoren ist dadurch auch nur geringfügig möglich. Die klinisch wichtige Fragestellung, ob Patient\*innen von der spezifischen Tyrosinkinaseinhibition profitieren und ob Crenolanib mit seiner geringeren Effektivität auf *c-KIT* klinische Vorteile mit sich bringt, sollten anhand größerer Kohorten und mit klinischen Studiendesigns erprobt werden.

## Literaturverzeichnis

### 7 Literaturverzeichnis

Abu-Duhier, F. M.; Goodeve, A. C.; Wilson, G. A.; Care, R. S.; Peake, I. R.; Reilly, J. T. (2001): Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. In: *Br J Haematol* 113 (4), S. 1076–1077. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02821.x.

Abu-Duhier, F. M.; Goodeve, A. C.; Wilson, G. A.; Gari, M. A.; Peake, I. R.; Rees, D. C. et al. (2000): FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. In: *Br J Haematol* 111 (1), S. 190–195.

Adolfsson, Jörgen; Borge, Ole Johan; Bryder, David; Theilgaard-Mönch, Kim; Åstrand-Grundström, Ingrid; Sitnicka, Ewa et al. (2001): Upregulation of Flt3 Expression within the Bone Marrow Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> Stem Cell Compartment Is Accompanied by Loss of Self-Renewal Capacity. In: *Immunity* 15 (4), S. 659–669. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00220-5.

Agnès, F.; Shamon, B.; Dina, C.; Rosnet, O.; Birnbaum, D.; Galibert, F. (1994): Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. In: *Gene* 145 (2), S. 283–288.

Arber, Daniel A.; Orazi, Attilio; Hasserjian, Robert; Thiele, Jürgen; Borowitz, Michael J.; Le Beau, Michelle M. et al. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. In: *Blood* 127 (20), S. 2391–2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.

Baldus, Claudia D.; Thiede, Christian; Soucek, Silke; Bloomfield, Clara D.; Thiel, Eckhard; Ehninger, Gerhard (2006): BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (5), S. 790–797. DOI: 10.1200/JCO.2005.01.6253.

Bennett, J. M.; Catovsky, D.; Daniel, M. T.; Flandrin, G.; Galton, D. A.; Gralnick, H. R.; Sultan, C. (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. In: *Annals of internal medicine* 103 (4), S. 620–625. DOI: 10.7326/0003-4819-103-4-620.

Berenson, R. J.; Andrews, R. G.; Bensinger, W. I.; Kalamasz, D.; Knitter, G.; Buckner, C. D.; Bernstein, I. D. (1988): Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. In: *The Journal of clinical investigation* 81 (3), S. 951–955. DOI: 10.1172/JCI113409.

Berenson, R. J.; Bensinger, W. I.; Hill, R. S.; Andrews, R. G.; Garcia-Lopez, J.; Kalamasz, D. F. et al. (1991): Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. In: *Blood* 77 (8), S. 1717–1722.

Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.

Breitenbuecher, Frank; Schnittger, Susanne; Grundler, Rebekka; Markova, Boyka; Carius, Birgit; Brecht, Alexandra et al. (2009): Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. In: *Blood* 113 (17), S. 4074–4077. DOI: 10.1182/blood-2007-11-125476.

Bubán, Tamás; Koczok, Katalin; Földesi, Róza; Szabó, Gabriella; Sümegi, Andrea; Tanyi, Miklós et al. (2011): Detection of internal tandem duplications in the FLT3 gene by different electrophoretic methods. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 50 (2), S. 301–310. DOI: 10.1515/CCLM.2011.762.

Buccisano, Francesco; Maurillo, Luca; Spagnoli, Alessandra; Del Principe, Maria Ilaria; Fraboni, Daniela; Panetta, Paola et al. (2010): Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. In: *Blood* 116 (13), S. 2295–2303. DOI: 10.1182/blood-2009-12-258178.

Burchert, Andreas; Bug, Gesine; Finke, Jürgen; Stelljes, Matthias; Rollig, Christoph; Wäsch, Ralph et al. (2018): Sorafenib As Maintenance Therapy Post Allogeneic Stem Cell Transplantation for FLT3-ITD Positive AML: Results from the Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicentre Sormain Trial. In: *Blood* 132 (Supplement 1), S. 661. DOI: 10.1182/blood-2018-99-112614.

Burnett, Alan K.; Russell, Nigel H.; Hills, Robert K.; Kell, Jonathan; Cavenagh, Jamie; Kjeldsen, Lars et al. (2015): A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m<sup>2</sup> vs 60 mg/m<sup>2</sup> in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. In: *Blood* 125 (25), S. 3878–3885. DOI: 10.1182/blood-2015-01-623447.

Carow, C. E.; Kim, E.; Hawkins, A. L.; Webb, H. D.; Griffin, C. A.; Jabs, E. W. et al. (1995): Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q12--q13. In: *Cytogenetics and cell genetics* 70 (3-4), S. 255–257. DOI: 10.1159/000134046.

Carow, C. E.; Levenstein, M.; Kaufmann, S. H.; Chen, J.; Amin, S.; Rockwell, P. et al. (1996): Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. In: *Blood* 87 (3), S. 1089–1096.

Chan, Perry M.; Ilangumaran, Subburaj; La Rose, Jose; Chakrabarty, Avijit; Rottapel, Robert (2003): Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. In: *Molecular and cellular biology* 23 (9), S. 3067–3078. DOI: 10.1128/mcb.23.9.3067-3078.2003.

Chen, Fang; Sun, Junya; Yin, Changxin; Cheng, Jiaying; Ni, Jinle; Jiang, Ling et al. (2020): Impact of FLT3-ITD allele ratio and ITD length on therapeutic outcome in cytogenetically normal AML patients without NPM1 mutation. In: *Bone marrow transplantation* 55 (4), S. 740–748. DOI: 10.1038/s41409-019-0721-z.

Cheng, Jie; Qu, Lijun; Wang, Jian; Cheng, Lemei; Wang, Yi (2018): High expression of FLT3 is a risk factor in leukemia. In: *Molecular medicine reports* 17 (2), S. 2885–2892. DOI: 10.3892/mmr.2017.8232.

Cheson, Bruce D.; Bennett, John M.; Kopecky, Kenneth J.; Büchner, Thomas; Willman, Cheryl L.; Estey, Elihu H. et al. (2003): Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (24), S. 4642–4649. DOI: 10.1200/JCO.2003.04.036.

Choudhary, Chunaram; Brandts, Christian; Schwable, Joachim; Tickenbrock, Lara; Sargin, Bülent; Ueker, Andrea et al. (2007): Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. In: *Blood* 110 (1), S. 370–374. DOI: 10.1182/blood-2006-05-024018.

Civin, C. I.; Strauss, L. C.; Brovall, C.; Fackler, M. J.; Schwartz, J. F.; Shaper, J. H. (1984): Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (1), S. 157–165.

Cornelissen, Jan J.; Gratwohl, Alois; Schlenk, Richard F.; Sierra, Jorge; Bornhäuser, Martin; Juliusson, Gunnar et al. (2012): The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 9 (10), S. 579–590. DOI: 10.1038/nrclinonc.2012.150.

Daver, Naval; Schlenk, Richard F.; Russell, Nigel H.; Levis, Mark J. (2019): Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. In: *Leukemia* 33 (2), S. 299–312. DOI: 10.1038/s41375-018-0357-9.

Döhner, Hartmut; Estey, Elihu; Grimwade, David; Amadori, Sergio; Appelbaum, Frederick R.; Büchner, Thomas et al. (2017): Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. In: *Blood* 129 (4), S. 424–447. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.

Döhner, Hartmut; Estey, Elihu H.; Amadori, Sergio; Appelbaum, Frederick R.; Büchner, Thomas; Burnett, Alan K. et al. (2010): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. In: *Blood* 115 (3), S. 453–474. DOI: 10.1182/blood-2009-07-235358.

Döhner, Konstanze; Döhner, Hartmut (2008): Molecular characterization of acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 93 (7), S. 976–982. DOI: 10.3324/haematol.13345.

Dombret, Hervé; Gardin, Claude (2016): An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. In: *Blood* 127 (1), S. 53–61. DOI: 10.1182/blood-2015-08-604520.

Estey, Elihu; Döhner, Hartmut (2006): Acute myeloid leukaemia. In: *Lancet (London, England)* 368 (9550), S. 1894–1907. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69780-8.

Falini, Brunangelo; Mecucci, Cristina; Tiacci, Enrico; Alcalay, Myriam; Rosati, Roberto; Pasqualucci, Laura et al. (2005): Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. In: *The New England journal of medicine* 352 (3), S. 254–266. DOI: 10.1056/NEJMoa041974.

Fenske, Timothy S.; Pengue, Gina; Mathews, Vikram; Hanson, Piia T.; Hamm, Sarah E.; Riaz, Noor; Graubert, Timothy A. (2004): Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice. In: *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (42), S. 15184–15189. DOI: 10.1073/pnas.0400751101.

Ferrara, Felicetto; Pinto, Antonio (2007): Acute myeloid leukemia in the elderly: current therapeutic results and perspectives for clinical research. In: *Reviews on recent clinical trials* 2 (1), S. 33–41.

Fircanis, Sophia; Merriam, Priscilla; Khan, Naushaba; Castillo, Jorge J. (2014): The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies. In: *American journal of hematology* 89 (8), E125-32. DOI: 10.1002/ajh.23744.

Fröhling, Stefan; Schlenk, Richard F.; Breitruck, Jochen; Benner, Axel; Kreitmeier, Sylvia; Tobis, Karen et al. (2002): 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. In: *Blood* 100 (13), S. 4372–4380. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1440.

Fröhling, Stefan; Scholl, Claudia; Gilliland, D. Gary; Levine, Ross L. (2005): Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (26), S. 6285–6295. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.010.

Galanis, Allison; Ma, Hayley; Rajkhowa, Trivikram; Ramachandran, Abhijit; Small, Donald; Cortes, Jorge; Levis, Mark (2014): Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. In: *Blood* 123 (1), S. 94–100. DOI: 10.1182/blood-2013-10-529313.

Gale, Rosemary E.; Green, Claire; Allen, Christopher; Mead, Adam J.; Burnett, Alan K.; Hills, Robert K.; Linch, David C. (2008): The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. In: *Blood* 111 (5), S. 2776–2784. DOI: 10.1182/blood-2007-08-109090.

Gilliland, D. Gary; Griffin, James D. (2002a): Role of FLT3 in leukemia. In: *Current opinion in hematology* 9 (4), S. 274–281.

Gilliland, D. Gary; Griffin, James D. (2002b): The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. In: *Blood* 100 (5), S. 1532–1542. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0492.

Gilliland, D. Gary; Jordan, Craig T.; Felix, Carolyn A. (2004): The molecular basis of leukemia. In: *Hematology*, S. 80–97. DOI: 10.1182/asheducation-2004.1.80.

Griffith, James; Black, James; Faerman, Carlos; Swenson, Lora; Wynn, Michael; Lu, Fan et al. (2004): The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. In: *Molecular cell* 13 (2), S. 169–178.

Griffith, Malachi; Griffith, Obi L.; Krysiak, Kilannin; Skidmore, Zachary L.; Christopher, Matthew J.; Klco, Jeffery M. et al. (2016): Comprehensive genomic analysis reveals FLT3 activation and a therapeutic strategy for a patient with relapsed adult B lymphoblastic leukemia. In: *Experimental hematology* 44 (7), S. 603–613. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.04.011.

Grimwade, D.; Walker, H.; Oliver, F.; Wheatley, K.; Harrison, C.; Harrison, G. et al. (1998): 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. In: *Blood* 92 (7), S. 2322–2333.

Grimwade, David; Freeman, Sylvie D. (2014): Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? In: *Blood* 124 (23), S. 3345–3355. DOI: 10.1182/blood-2014-05-577593.

Grunwald, Michael R.; Levis, Mark J. (2015): FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition as a Paradigm for Targeted Drug Development in Acute Myeloid Leukemia. In: *Seminars in hematology* 52 (3), S. 193–199. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2015.03.004.

Guerenne, Laura; Beurlet, Stéphanie; Said, Mohamed; Gorombeï, Petra; Le Pogam, Carole; Guidez, Fabien et al. (2016): GEP analysis validates high risk MDS and acute myeloid leukemia post MDS mice models and highlights novel dysregulated pathways. In: *Journal of hematology & oncology* 9, S. 5. DOI: 10.1186/s13045-016-0235-8.

Handgretinger, R.; Lang, P.; Schumm, M.; Taylor, G.; Neu, S.; Koscielnak, E. et al. (1998): Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting. In: *Bone marrow transplantation* 21 (10), S. 987–993. DOI: 10.1038/sj.bmt.1701228.

Hao, Q. L.; Shah, A. J.; Thiemann, F. T.; Smogorzewska, E. M.; Crooks, G. M. (1995): A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. In: *Blood* 86 (10), S. 3745–3753. DOI: 10.1182/blood.V86.10.3745.bloodjournal86103745.



Harada, Sachio; Kimura, Takafumi; Fujiki, Hiroshi; Nakagawa, Hitoshi; Ueda, Yuji; Itoh, Tsuyoshi et al. (2007): Flt3 ligand promotes myeloid dendritic cell differentiation of human hematopoietic progenitor cells: Possible application for cancer immunotherapy. In: *Int J Oncol*. DOI: 10.3892/ijo.30.6.1461.

Hehlmann, Rüdiger; Hochhaus, Andreas; Baccarani, Michele (2007): Chronic myeloid leukaemia. In: *The Lancet* 370 (9584), S. 342–350. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61165-9.

Ho, Anthony D.; Schetelig, Johannes; Bochtler, Tilmann; Schaich, Markus; Schäfer-Eckart, Kerstin; Hänel, Mathias et al. (2016): Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant FLT3-ITD. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 22 (3), S. 462–469. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.10.023.

Iyer, Swaminathan P.; Jethava, Yogesh; Karanes, Chatchada; Eckardt, John R.; Collins, Robert (2016): Safety Study of Salvage Chemotherapy High-Dose Ara-C/Mitoxantrone (HAM) and Type I FLT3-TKI Crenolanib in First Relapsed/Primary Refractory AML. In: *Blood* 128 (22), S. 3983. DOI: 10.1182/blood.V128.22.3983.3983.

Jetani, Hardikkumar; Garcia-Cadenas, Irene; Nerreter, Thomas; Thomas, Simone; Ryzdek, Julian; Meijide, Javier Briones et al. (2018): CAR T-cells targeting FLT3 have potent activity against FLT3-ITD+ AML and act synergistically with the FLT3-inhibitor crenolanib. In: *Leukemia* 32 (5), S. 1168–1179. DOI: 10.1038/s41375-018-0009-0.

Kansal, Rina (2019): Classification of acute myeloid leukemia by the revised 4th edition World Health Organization criteria: a retrospective single institution study with appraisal of the new entities of acute myeloid leukemia with gene mutations in NPM1 and Biallelic CEBPA. In: *Human pathology*. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.04.020.

Katz, Fay E.; Tindle, Robert; Sutherland, D.Robert; Greaves, Melvyn F. (1985): Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. In: *Leukemia Research* 9 (2), S. 191–198. DOI: 10.1016/0145-2126(85)90082-7.

Kayser, Sabine; Schlenk, Richard F.; Londono, Martina Correa; Breitenbuecher, Frank; Wittke, Kerstin; Du, Juan et al. (2009): Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to

chemotherapy and inferior outcome. In: *Blood* 114 (12), S. 2386–2392. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209999.

Ke, Yi-Yu; Singh, Vivek Kumar; Coumar, Mohane Selvaraj; Hsu, Yung Chang; Wang, Wen-Chieh; Song, Jen-Shin et al. (2015): Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification. In: *Scientific reports* 5, S. 11702. DOI: 10.1038/srep11702.

Kim, Miryoung; Williams, Sherry (2018): Midostaurin in Combination With Standard Chemotherapy for Treatment of Newly Diagnosed FMS-Like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) Mutation-Positive Acute Myeloid Leukemia. In: *The Annals of pharmacotherapy* 52 (4), S. 364–369. DOI: 10.1177/1060028017747900.

Kim, Y.; Lee, G. D.; Park, J.; Yoon, J-H; Kim, H-J; Min, W-S; Kim, M. (2015): Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. In: *Blood Cancer Journal* 5, e336. DOI: 10.1038/bcj.2015.61.

Kindler, Thomas; Lipka, Daniel B.; Fischer, Thomas (2010): FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. In: *Blood* 116 (24), S. 5089–5102. DOI: 10.1182/blood-2010-04-261867.

Kiyoi, Hitoshi; Ohno, Ryuzo; Ueda, Ryuzo; Saito, Hidehiko; Naoe, Tomoki (2002): Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. In: *Oncogene* 21 (16), S. 2555–2563. DOI: 10.1038/sj.onc.1205332.

Konig, Heiko; Santos, Cedric (2015): Signal transduction in Acute Myeloid Leukemia – Implications for Novel Therapeutic Concepts. In: *CCDT* 15 (9), S. 803–821. DOI: 10.2174/1568009615666150817104916.

Kottaridis, P. D.; Gale, R. E.; Frew, M. E.; Harrison, G.; Langabeer, S. E.; Belton, A. A. et al. (2001): 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. In: *Blood* 98 (6), S. 1752–1759. DOI: 10.1182/blood.v98.6.1752.

Kouchkovsky, I. De; Abdul-Hay, M. (2016): 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. In: *Blood Cancer Journal* 6 (7), e441. DOI: 10.1038/bcj.2016.50.

Kuchenbauer, Florian; Kern, Wolfgang; Schoch, Claudia; Kohlmann, Alexander; Hiddemann, Wolfgang; Haferlach, Torsten; Schnittger, Susanne (2005): Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 90 (12), S. 1617–1625.

Lagunas-Rangel, Francisco Alejandro; Chávez-Valencia, Venice (2017): FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 34 (6), S. 114. DOI: 10.1007/s12032-017-0970-x.

Lancet, Jeffrey E.; Cortes, Jorge E.; Hogge, Donna E.; Tallman, Martin S.; Kovacsovics, Tibor J.; Damon, Lloyd E. et al. (2014): Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. In: *Blood* 123 (21), S. 3239–3246. DOI: 10.1182/blood-2013-12-540971.

Lancet, Jeffrey E.; Uy, Geoffrey L.; Cortes, Jorge E.; Newell, Laura F.; Lin, Tara L.; Ritchie, Ellen K. et al. (2018): CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (26), S. 2684–2692. DOI: 10.1200/JCO.2017.77.6112.

Lang, P.; Schumm, M.; Taylor, G.; Klingebiel, T.; Neu, S.; Geiselhart, A. et al. (1999): Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. In: *Bone marrow transplantation* 24 (6), S. 583–589. DOI: 10.1038/sj.bmt.1701961.

Larrosa-Garcia, Maria; Baer, Maria R. (2017): FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions. In: *Molecular cancer therapeutics* 16 (6), S. 991–1001. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0876.

Lee, Benjamin H.; Tothova, Zuzana; Levine, Ross L.; Anderson, Kristina; Buza-Vidas, Natalija; Cullen, Dana E. et al. (2007): FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. In: *Cancer cell* 12 (4), S. 367–380. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.08.031.

Lewis, Nancy L.; Lewis, Lionel D.; Eder, Joseph P.; Reddy, Nandi J.; Guo, Feng; Pierce, Kristen J. et al. (2009): Phase I study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of oral CP-868,596, a highly specific platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced cancers. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (31), S. 5262–5269. DOI: 10.1200/JCO.2009.21.8487.

Ley, Timothy J.; Miller, Christopher; Ding, Li; Raphael, Benjamin J.; Mungall, Andrew J.; Robertson, A. Gordon et al. (2013): Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 368 (22), S. 2059–2074. DOI: 10.1056/NEJMoa1301689.

Lilakos, K.; Viniou, N. A.; Mavrogianni, D.; Vassilakopoulos, T. P.; Dimopoulou, M. N.; Plata, E. et al. (2006): FLT3 overexpression in acute promyelocytic leukemia patients without detectable FLT3-ITD or codon 835-836 mutations: a pilot study. In: *Anticancer research* 26 (2A), S. 1201–1207.

Lin, Ming-Tseh; Rich, Roy G.; Shipley, Royce F.; Hafez, Michael J.; Tseng, Li-Hui; Murphy, Kathleen M. et al. (2007): A molecular fraction collecting tool for the ABI 310 automated sequencer. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 9 (5), S. 598–603. DOI: 10.2353/jmoldx.2007.070022.

Linch, David C.; Hills, Robert K.; Burnett, Alan K.; Khwaja, Asim; Gale, Rosemary E. (2014): Impact of FLT3(ITD) mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia. In: *Blood* 124 (2), S. 273–276. DOI: 10.1182/blood-2014-02-554667.

Little, Mark P.; Wakeford, Richard; Tawn, E. Janet; Bouffler, Simon D.; Berrington de Gonzalez, Amy (2009): Risks associated with low doses and low dose rates of ionizing radiation: why linearity may be (almost) the best we can do. In: *Radiology* 251 (1), S. 6–12. DOI: 10.1148/radiol.2511081686.

Liu, Song-Bai; Dong, Hao-Jie; Bao, Xie-Bing; Qiu, Qiao-Cheng; Li, Hong-Zhi; Shen, Hong-Jie et al. (2019): Impact of FLT3-ITD length on prognosis of acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 104 (1), e9-e12. DOI: 10.3324/haematol.2018.191809.

Liu, Yi; Gray, Nathanael S. (2006): Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. In: *Nature chemical biology* 2 (7), S. 358–364. DOI: 10.1038/nchembio799.

Löwenberg, B.; Downing, J. R.; Burnett, A. (1999): Acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 341 (14), S. 1051–1062. DOI: 10.1056/NEJM199909303411407.

Löwenberg, Bob; Pabst, Thomas; Vellenga, Edo; van Putten, Wim; Schouten, Harry C.; Graux, Carlos et al. (2011): Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 364 (11), S. 1027–1036. DOI: 10.1056/NEJMoa1010222.

Maroc, N.; Rottapel, R.; Rosnet, O.; Marchetto, S.; Lavezzi, C.; Mannoni, P. et al. (1993): Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. In: *Oncogene* 8 (4), S. 909–918.

Matthews, William; Jordan, Craig T.; Wiegand, Gordon W.; Pardoll, Drew; Lemischka, Ihor R. (1991): A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. In: *Cell* 65 (7), S. 1143–1152. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90010-V.

McKenna, H. J.; Stocking, K. L.; Miller, R. E.; Brasel, K.; Smedt, T. de; Maraskovsky, E. et al. (2000): Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. In: *Blood* 95 (11), S. 3489–3497.

Medinger, Michael; Lengerke, Claudia; Passweg, Jakob (2016): Novel Prognostic and Therapeutic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. In: *Cancer Genomics & Proteomics* 13 (5), S. 317–330.

Metzeler, Klaus H.; Herold, Tobias; Rothenberg-Thurley, Maja; Amler, Susanne; Sauerland, Maria C.; Görlich, Dennis et al. (2016): Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. In: *Blood* 128 (5), S. 686–698. DOI: 10.1182/blood-2016-01-693879.

Mills, Ken I.; Gilkes, Amanda F.; Walsh, Val; Sweeney, Marion; Gale, Rosemary (2005): Rapid and sensitive detection of internal tandem duplication and activating loop mutations of FLT3. In: *Br J Haematol* 130 (2), S. 203–208. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05589.x.

Mrózek, Krzysztof; Marcucci, Guido; Nicolet, Deedra; Maharry, Kati S.; Becker, Heiko; Whitman, Susan P. et al. (2012): Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with

acute myeloid leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (36), S. 4515–4523. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.4738.

Nagel, Gabriele; Weber, D.; Fromm, E.; Erhardt, S.; Lübbert, M.; Fiedler, W. et al. (2017): Epidemiological, genetic, and clinical characterization by age of newly diagnosed acute myeloid leukemia based on an academic population-based registry study (AMLSG BiO). In: *Annals of hematology* 96 (12), S. 1993–2003. DOI: 10.1007/s00277-017-3150-3.

Nakao, M.; Yokota, S.; Iwai, T.; Kaneko, H.; Horiike, S.; Kashima, K. et al. (1996): Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 10 (12), S. 1911–1918.

Ohanian, Maro; Kantarjian, Hagop M.; Borthakur, Gautam; Kadia, Tapan M.; Konopleva, Marina; Garcia-Manero, Guillermo et al. (2016): Efficacy of a Type I FLT3 Inhibitor, Crenolanib, with Idarubicin and High-Dose Ara-C in Multiply Relapsed/Refractory FLT3+ AML. In: *Blood* 128 (22), S. 2744. DOI: 10.1182/blood.V128.22.2744.2744.

Okamoto, M.; Hayakawa, F.; Miyata, Y.; Watamoto, K.; Emi, N.; Abe, A. et al. (2007): Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. In: *Leukemia* 21 (3), S. 403–410. DOI: 10.1038/sj.leu.2404547.

Ossenkoppele, Gert J.; Schuurhuis, Gerrit Jan (2014): MRD in AML: it is time to change the definition of remission. In: *Best practice & research. Clinical haematology* 27 (3-4), S. 265–271. DOI: 10.1016/j.beha.2014.10.008.

Papaemmanuil, Elli; Gerstung, Moritz; Bullinger, Lars; Gaidzik, Verena I.; Paschka, Peter; Roberts, Nicola D. et al. (2016): Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. In: *The New England journal of medicine* 374 (23), S. 2209–2221. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192.

Paschka, Peter; Schlenk, Richard F.; Gaidzik, Verena I.; Habdank, Marianne; Krönke, Jan; Bullinger, Lars et al. (2010): IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (22), S. 3636–3643. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.3762.

Patel, Jay P.; Gönen, Mithat; Figueroa, Maria E.; Fernandez, Hugo; Sun, Zhuoxin; Racevskis, Janis et al. (2012): Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 366 (12), S. 1079–1089. DOI: 10.1056/NEJMoa1112304.

Pautas, Cecile; Merabet, Fatiha; Thomas, Xavier; Raffoux, Emmanuel; Gardin, Claude; Corm, Selim et al. (2010): Randomized study of intensified anthracycline doses for induction and recombinant interleukin-2 for maintenance in patients with acute myeloid leukemia age 50 to 70 years: results of the ALFA-9801 study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (5), S. 808–814. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.2652.

Pratcorona, Marta; Brunet, Salut; Nomdedéu, Josep; Ribera, Josep Maria; Tormo, Mar; Duarte, Rafael et al. (2013): Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. In: *Blood* 121 (14), S. 2734–2738. DOI: 10.1182/blood-2012-06-431122.

Ravandi, Farhad; Kantarjian, Hagop; Faderl, Stefan; Garcia-Manero, Guillermo; O'Brien, Susan; Koller, Charles et al. (2010): Outcome of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia in first relapse. In: *Leukemia Research* 34 (6), S. 752–756. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.10.001.

Reindl, Carola; Bagrintseva, Ksenia; Vempati, Sridhar; Schnittger, Susanne; Ellwart, Joachim W.; Wenig, Katja et al. (2006): Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. In: *Blood* 107 (9), S. 3700–3707. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2596.

Rombouts, W. J.; Blokland, I.; Löwenberg, B.; Ploemacher, R. E. (2000): Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. In: *Leukemia* 14 (4), S. 675–683.

Rosnet, O.; Marchetto, S.; deLapeyriere, O.; Birnbaum, D. (1991): Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. In: *Oncogene* 6 (9), S. 1641–1650.

Rozman, C.; Montserrat, E. (1995): Chronic lymphocytic leukemia. In: *The New England journal of medicine* 333 (16), S. 1052–1057. DOI: 10.1056/NEJM199510193331606.

Sakaguchi, Masahiro; Yamaguchi, Hiroki; Najima, Yuho; Usuki, Kensuke; Ueki, Toshimitsu; Oh, Iekuni et al. (2018): Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. In: *Blood advances* 2 (20), S. 2744–2754. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018020305.

Schessl, Christina; Rawat, Vijay P. S.; Cusan, Monica; Deshpande, Aniruddha; Kohl, Tobias M.; Rosten, Patricia M. et al. (2005): The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (8), S. 2159–2168. DOI: 10.1172/JCI24225.

Schlenk, Richard F.; Döhner, Konstanze; Krauter, Jürgen; Fröhling, Stefan; Corbacioglu, Andrea; Bullinger, Lars et al. (2008): Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 358 (18), S. 1909–1918. DOI: 10.1056/NEJMoa074306.

Schlenk, Richard F.; Kayser, Sabine; Bullinger, Lars; Kobbe, Guido; Casper, Jochen; Ringhoffer, Mark et al. (2014): Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. In: *Blood* 124 (23), S. 3441–3449. DOI: 10.1182/blood-2014-05-578070.

Schlenk, Richard F.; Weber, Daniela; Fiedler, Walter; Salih, Helmut R.; Wulf, Gerald; Salwender, Hans et al. (2019): Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. In: *Blood* 133 (8), S. 840–851. DOI: 10.1182/blood-2018-08-869453.

Schnittger, Susanne; Schoch, Claudia; Dugas, Martin; Kern, Wolfgang; Staib, Peter; Wuchter, Christian et al. (2002): 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. In: *Blood* 100 (1), S. 59–66. DOI: 10.1182/blood.v100.1.59.

Schumm, M.; Lang, P.; Taylor, G.; Kuçi, S.; Klingebiel, T.; Bühring, H. J. et al. (1999): Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. In: *Journal of hematotherapy* 8 (2), S. 209–218. DOI: 10.1089/106161299320488.

Shih, Lee-Yung; Huang, Chein-Fuang; Wu, Jin-Hou; Lin, Tung-Liang; Dunn, Po; Wang, Po-Nan et al. (2002): Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at



diagnosis and relapse. In: *Blood* 100 (7), S. 2387–2392. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0195.

Sitnicka, Ewa; Buza-Vidas, Natalija; Larsson, Staffan; Nygren, Jens M.; Liuba, Karina; Jacobsen, Sten Erik W. (2003): Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. In: *Blood* 102 (3), S. 881–886. DOI: 10.1182/blood-2002-06-1694.

Slovak, M. L.; Kopecky, K. J.; Cassileth, P. A.; Harrington, D. H.; Theil, K. S.; Mohamed, A. et al. (2000): Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. In: *Blood* 96 (13), S. 4075–4083.

Smith, Catherine Choy; Lasater, Elisabeth A.; Lin, Kimberly C.; Wang, Qi; McCreery, Melissa Quino; Stewart, Whitney K. et al. (2014): Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (14), S. 5319–5324. DOI: 10.1073/pnas.1320661111.

Southam, Chester M.; Craver, Lloyd F.; Dargeon, Harold W.; Burchenal, Joseph H. (1951): A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. In: *Cancer* 4 (1), S. 39–59. DOI: 10.1002/1097-0142(195101)4:1<39::AID-CNCR2820040105>3.0.CO;2-G.

Stirewalt, Derek L.; Kopecky, Kenneth J.; Meshinchi, Soheil; Engel, Julia H.; Pogossova-Agadjanyan, Era L.; Linsley, Jeremy et al. (2006): Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. In: *Blood* 107 (9), S. 3724–3726. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3453.

Stirewalt, Derek L.; Radich, Jerald P. (2003): The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. In: *Nature Reviews Cancer* 3 (9), S. 650–665. DOI: 10.1038/nrc1169.

Stone, R. M.; Fischer, T.; Paquette, R.; Schiller, G.; Schiffer, C. A.; Ehninger, G. et al. (2012): Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 26 (9), S. 2061–2068. DOI: 10.1038/leu.2012.115.

Stone, Richard M.; Mandrekar, Sumithra J.; Sanford, Ben L.; Laumann, Kristina; Geyer, Susan; Bloomfield, Clara D. et al. (2017): Midostaurin plus Chemotherapy for

Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. In: *The New England journal of medicine* 377 (5), S. 454–464. DOI: 10.1056/NEJMoa1614359.

Sureda, A.; Bader, P.; Cesaro, S.; Dreger, P.; Duarte, R. F.; Dufour, C. et al. (2015): Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. In: *Bone marrow transplantation* 50 (8), S. 1037–1056. DOI: 10.1038/bmt.2015.6.

Thiede, Christian; Steudel, Christine; Mohr, Brigitte; Schaich, Markus; Schäkel, Ulrike; Platzbecker, Uwe et al. (2002): Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. In: *Blood* 99 (12), S. 4326–4335. DOI: 10.1182/blood.v99.12.4326.

Tripathi, Himi; Peng, Hsuan; Donahue, Renee; Chelvarajan, Lakshman; Gottipati, Anuhy; Levitan, Bryana et al. (2020): Isolation Methods for Human CD34 Subsets Using Fluorescent and Magnetic Activated Cell Sorting: an In Vivo Comparative Study. In: *Stem cell reviews and reports*. DOI: 10.1007/s12015-019-09939-7.

Turner, A. M.; Lin, N. L.; Issarachai, S.; Lyman, S. D.; Broudy, V. C. (1996): FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. In: *Blood* 88 (9), S. 3383–3390.

Vardiman, James W.; Harris, Nancy Lee; Brunning, Richard D. (2002): The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. In: *Blood* 100 (7), S. 2292–2302. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1199.

Versluis, J.; Hout, F. E. M. in 't; Devillier, R.; van Putten, W. L. J.; Manz, M. G.; Vekemans, M-C et al. (2017): Comparative value of post-remission treatment in cytogenetically normal AML subclassified by NPM1 and FLT3-ITD allelic ratio. In: *Leukemia* 31 (1), S. 26–33. DOI: 10.1038/leu.2016.183.

Visser, O.; Trama, A.; Maynadié, M.; Stiller, C.; Marcos-Gragera, R.; Angelis, R. de et al. (2012): Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 48 (17), S. 3257–3266. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.05.024.

Weinberg, Olga K.; Seetharam, Mahesh; Ren, Li; Seo, Katie; Ma, Lisa; Merker, Jason D. et al. (2009): Clinical characterization of acute myeloid leukemia with

myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. In: *Blood* 113 (9), S. 1906–1908. DOI: 10.1182/blood-2008-10-182782.

Yates, J. W.; Wallace, H. J.; Ellison, R. R.; Holland, J. F. (1973): Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. In: *Cancer chemotherapy reports* 57 (4), S. 485–488.

Yuan, Y.; Zhou, L.; Miyamoto, T.; Iwasaki, H.; Harakawa, N.; Hetherington, C. J. et al. (2001): AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18), S. 10398–10403. DOI: 10.1073/pnas.171321298.

Zhang, S.; Fukuda, S.; Lee, Y.; Hangoc, G.; Cooper, S.; Spolski, R. et al. (2000): Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (5), S. 719–728. DOI: 10.1084/jem.192.5.719.

Zimmerman, Eric I.; Turner, David C.; Buaboonnarn, Jassada; Hu, Shuiying; Orwick, Shelley; Roberts, Michael S. et al. (2013): Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. In: *Blood* 122 (22), S. 3607–3615. DOI: 10.1182/blood-2013-07-513044.

Zuckerman, Tsila; Beyar-Katz, Ofrat; Rowe, Jacob M. (2016): Should autotransplantation in acute myeloid leukemia in first complete remission be revisited? In: *Current opinion in hematology* 23 (2), S. 88–94. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000212.

## Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater, der diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte und mir stets mit nützlichen Ratschlägen zur Seite stand.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinen beiden Betreuerinnen aus meiner Forschungsgruppe, die mich bestens in die Labortätigkeiten eingearbeitet und während der langen Versuchszeiten bis hin zur Fertigstellung der Dissertation unterstützt haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Bezugspersonen aus dem hämatologischen Laboer für ihren geduldigen, hilfsbereiten Umgang mit mir sowie das Durchführen der GeneScan Analyse im hämatologischen Labor der Universitätsmedizin Mainz.

Für ihre unermüdliche Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen sowie für ihre aufmunternden und motivierenden Worte während des gesamten Entstehungsprozesses meiner Dissertation möchte ich meiner Familie herzlich danken.