

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
Medizinische Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Internen
Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei akuter myeloischer
Leukämie**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Anne Ballaschk

aus Berlin

Magdeburg, 2013

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Ballaschk, Anne

Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei akuter myeloischer Leukämie.- 2013

Kurzreferat

Eine häufige maligne hämatologische Erkrankung im Erwachsenenalter ist die akute myeloische Leukämie (AML), wobei die Mutation der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 eine der häufigsten genetischen Veränderungen ist. Besonders interne Tandemduplikationen (ITDs) des FLT3-Rezeptors, welche eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors und Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation vermitteln, gelten als negativer prognostischer Faktor hinsichtlich verschiedener klinischer Endpunkte (Thiede et al., 2002; Kayser et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus Patientenmaterial eine bisher nicht bekannte ITD im FLT3-Gen (FLT3-ITDF612LGS (17)) identifiziert und isoliert. Weiterhin wurden im 32D-Zellkulturmodell die FLT3-Mutationen FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDE611V (32) (non-JM-ITDs) sowie FLT3-ITDK620R (7) und FLT3-ITD598/599 (12) (JM-ITDs) untersucht. Es konnte mittels siRNA- „knockdown“ deren transformierendes Potential nachgewiesen und die konstitutive Aktivierung des mutierten FLT3-Rezeptors sowie dessen downstream-Signalmolekülen STAT5 und Erk gezeigt werden. Weiterhin wurden für alle untersuchten FLT3-ITD Mutationen ein Kolonien-bildendes Potential und die Induktion einer Apoptoseresistenz nachgewiesen. Bei der Untersuchung von aktivierten Signalmolekülen und ihrer Hemmung durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) ergaben sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den untersuchten ITDs der juxtamembränen Domäne und der nicht-juxtamembränen Domäne des FLT3-Rezeptors.

Schlüsselwörter: AML, interne Tandemduplikationen, FLT3

I	Einleitung	7
1.	Akute myeloische Leukämie (AML)	7
2.	Aufbau und Struktur des FLT3-Rezeptors	7
3.	FLT3 in der Hämatopoese	8
4.	Mutationen im FLT3-Gen	9
6.	Die „two-hit“-Hypothese zur Entstehung der AML	11
7.	Signaltransduktion	13
8.	FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs)	14
9.	Zielstellung	16
II	Material und Methoden	17
1.	Organismen	17
1.1	Bakterienstämme	17
1.2	Zelllinien	17
2.	Plasmide	17
3.	Oligonukleotide	18
3.1	PCR-Primer	18
3.2	Sequenzierungsprimer	19
4.	Antikörper	19
5.	Chemikalien, Kits und Enzyme	20
6.	Standard-Lösungen, –Puffer und –Medien	21
7.	Standardgeräte	24
8.	Molekularbiologische Arbeitstechniken	24
8.1	Extraktion mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Dichtegradienten- zentrifugation	24
8.2	Präparation von mRNA	25
8.3	cDNA-Synthese	25
8.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
8.5	Sequenzierung	26
8.6	Ortsgerichtete Mutagenese	26
8.7	Agarosegel-Elektrophorese	26
8.8	Gelextraktion	27
8.9	Restriktionsverdau	27
8.10	Ligation von DNA-Fragmenten	27
9.	Bakterienkultur	28
9.1	Kulturbedingungen und Aufbewahrung	28
9.2	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	28
9.3	Plasmidpräparation mittels Plasmid-Miniprep	28
10.	Zellkultur	28
10.1	Kultivierung und Kryokonservierung	28
10.2	Retrovirale Transfektion	29
10.3	Wachstumsfaktor-Entzug	30
10.4	Propidiumiodid-Messung im Durchflusszytometer	30
10.5	Messung der GFP-Expression am Durchflusszytometer	31
10.6	„Colony Count Assay“	31
10.7	Behandlung der Zellen mit Inhibitoren	32
10.8	„siRNA-knockdown“	32
11.	Proteinbiochemische Methoden	33
11.1	Herstellung von Proteinlysaten	33
11.2	Messung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode	33
11.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
11.4	Western Blot und Immunodetektion	34

12. Statistik.....	34
III Ergebnisse	35
1. Identifikation von internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei Patienten mit AML.....	35
2. Stabile Expression von FLT3-ITDs in 32D-Zellen.....	37
2.1 Klonierungsstrategie FLT3-ITDF612LGS.....	37
2.2 Retrovirale Transduktion von 32D-Zellen.....	39
2.3 Selektion positiv transfizierter Zellen	40
2.4 Verifizierung der Sequenzen der FLT3-ITDs in 32D-Zellen	41
3. Untersuchung des transformierenden Potentials der FLT3-ITDs	41
3.1 Die Expression von FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDK602R (7), FLT3-ITD598/599 (12) und FLT3-ITDE611V (32) vermittelt wachstumsfaktorunabhängige Kolonienbildung und Apoptoseresistenz in 32D-Zellen	41
3.2 Einfluss von internen Tandemduplikationen auf die Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors	44
3.3 „Knockdown“ des mutierten FLT3-Rezeptors führt zum Verlust der Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation in 32D-Zellen	45
4. Untersuchung von aktivierten Signalmolekülen nach Inkubation mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs).....	47
4.1. Inhibition der Signaltransduktion durch PKC412 (Midostaurin).....	48
4.2 Inhibition der Signaltransduktion durch Bay 43-9006 (Sorafenib).....	49
4.3 Inhibition der Signaltransduktion durch AC220 (Quizartinib)	51
IV. Diskussion	53
1. Transformierendes Potential von Längenmutationen des FLT3-Rezeptors	54
2. Onkogene Signaltransduktion von FLT3-ITDs	56
3. Einfluss der Größe und Position von Internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors.....	59
4. Sensitivität gegenüber TKIs.....	61
V. Zusammenfassung	67
VI. Literaturverzeichnis.....	68
Danksagung.....	78
Curriculum vitae.....	79
Eidesstattliche Erklärung	80

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
µg	10 ⁻⁶ Gramm
µl	10 ⁻⁶ Liter
µmol	10 ⁻⁶ Mol
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b	Base
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Celsius
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
GTE	Glukose-Tris-EDTA
Erk	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell scan)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FL	FLT3-Ligand
FLT	fms-like tyrosine kinase
h	Stunde (hour)
IL	Interleukin
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (internal ribosomal entry site)

ITD	interne Tandemduplikation (internal tandem duplication)
JM	juxtamembranäre Domäne
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
LTR	long terminal repeat mA Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (mitogen activated protein kinase)
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
nM (nmol/l)	10 ⁻⁹ Mol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	„Tris buffered saline“
TKD	Tyrosinkinasedomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ü.N.	über Nacht

I Einleitung

1. Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie ist mit einer Inzidenz von 2,5/100.000/Jahr die häufigste Form der akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Sie wird charakterisiert durch eine Ansammlung von myeloblastischen Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut, wobei der Anteil der Blasten im Knochenmark laut WHO-Klassifikation mehr als 20 % betragen muss.

Durch diese Akkumulation von Blasten kommt es zur Verdrängung der Zellen der normalen Hämatopoese, sodass die Patienten unter den Symptomen einer Thrombozytopenie (Blutungen), Anämie (Müdigkeit, Schwäche, Dyspnoe) und Granulozytopenie (rezidivierende bakterielle Infekte) leiden.

Eine Einteilung der akuten myeloischen Leukämie in drei Gruppen erfolgt anhand zytogenetischer Kriterien, welche zu den wichtigsten prognostischen Faktoren der AML zählen. Die Prognose wird hierbei durch folgende Marker bestimmt: das Rezidiv-Risiko („relapse rate“), das Gesamtüberleben („overall survival“) und das Ansprechen auf die Induktionstherapie („response rate“). Eine gute Prognose hat die Gruppe mit balancierten Chromosomentranslokationen [t(8;21), t(15;17) und inv(16)], eine schlechte Prognose die zweite Gruppe mit unbalancierten Chromosomentranslokationen [-5/del(5q), 3q-Anomalien, oder -7] und komplexeren zytogenetische Aberrationen. Die dritte Gruppe, welche etwa 45 % der AML Patienten umfasst, hat eine intermediäre Prognose und weist keine zytogenetischen Veränderungen oder Veränderungen wie del(7q), 11q23-Anomalien, +21, +8, +22 und del(9q) oder selten auftretende zytogenetische Veränderungen, welche nicht zu den anderen Gruppen zugeordnet werden können, auf (Grimwade et al., 1998). Besonders innerhalb der letzten Gruppe ohne zytogenetische Veränderungen wurde nach molekulargenetischen Markern gesucht, welche hier spezifische Therapieziele definieren könnten. Eine der häufigsten Mutationen, die man bei zytogenetisch normaler akuter myeloischer Leukämie findet, ist die Mutation des *FLT3*-Gens („*fibroblast-makrophage stimulating factor (FMS)-like tyrosine kinase 3*“) (Schnittger et al., 2002).

2. Aufbau und Struktur des FLT3-Rezeptors

Das Gen, welches den humanen FLT3-Rezeptor kodiert, ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert. Es kodiert für die 993 Aminosäuren-lange Sequenz einer Rezeptor-Tyrosinkinase

(RTK), welche zur Klasse III der RTKs gehört. Diese sind membrangebundene Rezeptoren, aufgebaut aus fünf Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen, einer transmembranären Domäne, einer juxtamembranären Domäne und einer hochkonservierten intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne, welche von einem Kinase-Insert unterbrochen wird (Agnès et al., 1994).

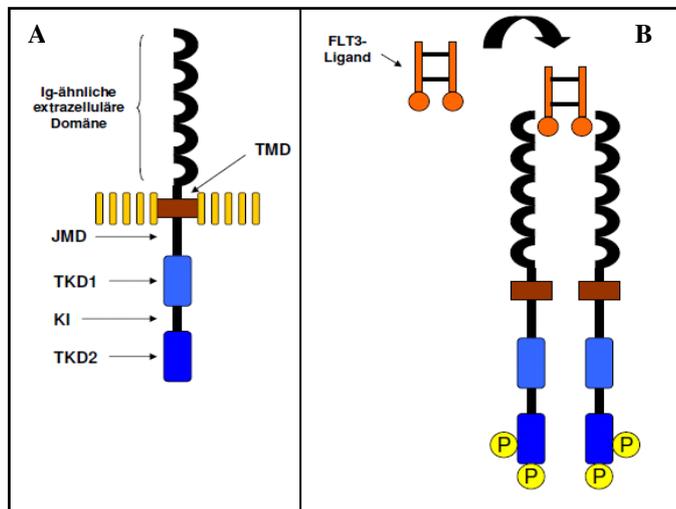


Abbildung 1: Modell des FLT3-Rezeptors

A: schematischer Aufbau des FLT3-Rezeptors: TMD: transmembranäre Domäne; JMD: juxta-membranäre Domäne; TKD1/TKD2: Tyrosinkinase-Domäne 1/2; KI: Kinase-Insert
B: Durch Bindung des FLT3-Liganden kommt es zur Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors und konsekutiver Phosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Domäne.

Der FLT3-Rezeptor liegt in seiner unstimulierten, inaktiven Form als Monomer vor. Durch Bindung des FLT3-Liganden (FL) kommt es zur Dimerisierung von zwei Rezeptor-Monomeren und zur Aktivierung des Rezeptors verbunden mit einer Konformationsänderung. Die Dimerisierung ermöglicht die Transphosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne über die rezeptoreigene Tyrosinkinase, sodass Bindungsstellen für verschiedene Adaptermoleküle (u.a. Grb2) entstehen, über welche eine Aktivierung von intrazellulären Molekülen, wie zum Beispiel der MAP-Kinase, STAT-Proteinen und dem PI3/Akt-Kinase-Signalweg erfolgt (Dosil et al., 1993; Lavagna-Sevenier et al., 1998; Marchetto et al., 1999; Zhang und Broxmeyer, 2000).

3. FLT3 in der Hämatopoese

Für die Differenzierung und Proliferation von Zellen der normalen Hämatopoese spielt FLT3 eine wichtige Rolle, welche schon durch die Expression des FLT3-Rezeptors hauptsächlich auf myeloischen und lymphoiden Vorläuferzellen deutlich wird (Rosnet et al., 1996).

Die humane Hämatopoese ist durch ein komplexes Zusammenwirken von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen gekennzeichnet. Im Zusammenspiel von FLT3-Ligand mit Interleukin 3 (IL-3), stem cell factor (SCF) und anderen Wachstumsfaktoren wie dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Erythropoietin (EPO) kommt es zu einer starken Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen, weiter differenzierten

lymphatischen und myeloischen Vorläufern und einer Entwicklung in Richtung der granulozytären-monozytären Zelllinien (Namikawa et al., 1996; Rusten et al., 1996; Shah et al., 1996; Marchetto et al., 1999). Die alleinige Stimulation mit dem FLT3-Liganden führt zur Differenzierung von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen in Richtung monozytärer Zelllinien, wobei eine nennenswerte Proliferation nicht zu finden ist (Gabbianelli et al., 1995). Durch eine Kombination von FL mit IL-3 und c-Kit-Ligand erreicht man eine starke Proliferation hauptsächlich von myeloischen Vorläuferzellen (Rusten et al., 1996).

Anhand der aufgeführten Beispiele erhält man einen Einblick in die Komplexität der Signalgebung der Hämatopoese und die Bedeutung, welche FLT3 dabei spielt. Eine Differenzierung in unterschiedliche hämatologische Zelllinien wird durch FLT3 wesentlich mitbestimmt, sodass es nicht verwundert, dass eine Expression des FLT3-Rezeptors bei vielen hämatologischen Krankheitsbildern zu finden ist.

So exprimieren mehr als 90% der Blasten bei akuter myeloischer Leukämie FLT3 in unterschiedlich starker Ausprägung auf ihrer Oberfläche. Auch das myelodysplastische Syndrom (MDS), chronisch myeloische Leukämie (CML) und B-Zell akute lymphatische Leukämie (B-Zell ALL) zeigen in geringerem Ausmaß eine Expression des FLT3-Rezeptors (Carow et al., 1996; Rusten et al., 1996).

4. Mutationen im *FLT3*-Gen

Maligne Erkrankungen beruhen häufig auf Mutationen in Genen, welche Wachstum und Apoptose sowie die Differenzierung von Zellen regulieren, sodass der natürliche Ablauf dieser Vorgänge gestört wird. Da FLT3 an der Regulation dieser Prozesse beteiligt und bei diversen hämatologischen Erkrankungen zu finden ist, wurde nach Veränderung im *FLT3*-Gen gesucht. Mutationen des *FLT3*-Gens bei AML wurden erstmals 1996 von Nakao et al. als sogenannte interne Tandemduplikationen (ITDs) in der juxtamembranären (JM) Domäne des FLT3-Rezeptors entdeckt. Interne Tandemduplikationen entstehen durch die Verdoppelung eines Abschnitts innerhalb der die JM-Domäne verschlüsselnden Gensequenz und man findet sie bei etwa 20-30% der AML-Patienten. Die Länge der ITD variiert von drei bis zu über 400 Basenpaaren, wobei alle Mutationen „in frame“ liegen, sodass der Leserahmen bei der Transkription nicht verändert wird (Agnès et al., 1994; Nakao et al., 1996; Yokota et al., 1997; Kottardis et al., 2001).

Bei der Charakterisierung der biologischen Eigenschaften der FLT3-ITDs, durchgeführt in verschiedenen Zellkulturmodellen, stellte sich heraus, dass es sich bei diesen Mutationen um aktivierende Mutationen handelt. Sie führen zu einer konstitutiven, ligandenunabhängigen Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors (Kiyoi et al., 1998) und verursachen im Mausmodell eine myeloproliferative Erkrankung (Kelly et al., 2002). Außerdem führen interne

Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors zu einem Wachstumsfaktor-unabhängigen Zellwachstum in IL-3 abhängigen Zelllinien sowie zu einer Aktivierung von „downstream“ Signalwegen wie STAT5 („signal transducer and activator of transcription 5“) und MAP-Kinase („mitogen-activated protein-kinase“) (Hayakawa et al., 2000).

Der genaue Mechanismus, welcher zur konstitutiven Aktivierung des FLT3-Rezeptors durch die JM-ITD führt, ist noch nicht bekannt, jedoch gibt es Hypothesen, die diesen Mechanismus betreffen. Man vermutet, dass FLT3-ITD Mutationen durch Liganden-unabhängige Dimerisierung des FLT3-Rezeptors zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors mit Autophosphorylierung, Aktivierung intrazellulärer Signalwege und Zytokin-unabhängiger Zellproliferation führen (Mizuki et al., 2000; Kelly et al., 2002; Kiyoi et al., 2002).

Griffith et al. (2004) bestimmten die kristalline Struktur der autoinhibierten Form von FLT3, welche in Abbildung 2 dargestellt ist. Sie fanden auf diesem Weg heraus, dass die gesamte juxtamembranäre Domäne im unstimulierten Zustand inhibitorisch auf die Aktivierungsschleife des FLT3-Rezeptors wirkt, indem sie selbige durch sterische Interaktion in einer inaktiven Form hält. Durch Phosphorylierung der Tyrosinreste 589 und 591 wird dieser autoinhibitorische Komplex aufgelöst, sodass der Rezeptor in seine aktive Form übergehen kann.

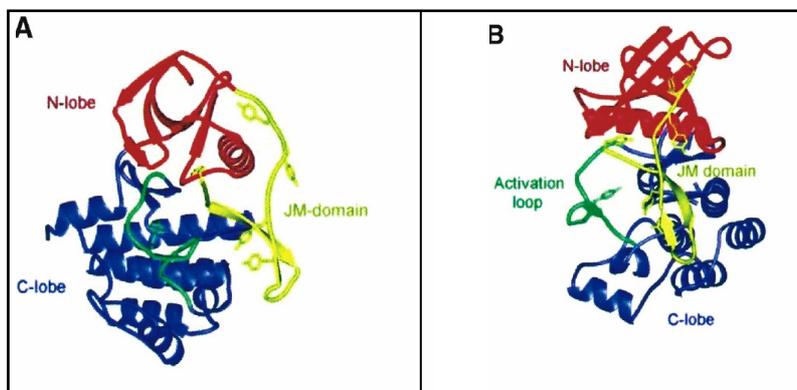


Abbildung 2: Struktur des autoinhibierten FLT3-Rezeptors

(aus Griffith J. et al., 2004; Molecular Cell)

rot: N-terminale Kinase-Domäne; grün: activation loop; blau: C-terminale Kinase-Domäne; gelb: juxtamembranäre Domäne

Die JM-ITDs befinden sich meist im „zipper-“ oder „linker-peptide“, in der Nähe der „hinge-region“ der JM-Domäne. Diese Region ist wichtig, um die Position der „JM-switch-region“, je nach aktivem oder inaktivem Zustand zu determinieren, sodass sich die „JM-binding-region“ optimal in ihrer Bindungsstelle orientieren kann (Griffith et al., 2004).

Man vermutet eine Veränderung der Konformation der JM-Domäne durch die eingeschobene ITD und daraus resultierend einen Verlust der Fähigkeit die Kinaseaktivität

des FLT3-Rezeptors zu inhibieren. Dadurch kommt es zur ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors und seiner intrazellulären Signalwege.

Gestützt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen anderer Klasse III Tyrosinkinase-Rezeptoren wie zum Beispiel PDGFR β , PDGFR α und c-kit. Auch hier konnte gezeigt werden, dass es durch Mutationen in der hochkonservierten JM-Domäne zu einem Verlust der autoinhibitorischen Funktion selbiger kommt (Hirota et al., 1998; Irusta und DiMaio, 1998).

Die zweithäufigste Mutation im *FLT3*-Gen ist eine Punktmutation in der Tyrosinkinase-Domäne (TKD). Hier befindet sich auch die sogenannte Aktivierungsschleife des Rezeptors. Mutationen in der Aktivierungsschleife des FLT3-Rezeptors kommen zu etwa 5-10 % bei AML, 2-5 % bei MDS und 1-3 % bei ALL vor. Auch diese führen, ähnlich wie die FLT3-ITDs, zum Verlust der autoinhibitorischen Funktion dieser Domäne und resultierten in einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (Yamamoto et al., 2001; Thiede et al., 2002).

Allerdings scheinen biologische Unterschiede, im Sinne einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, zwischen den FLT3-ITDs und den Mutationen in der Aktivierungsschleife zu bestehen (Choudhary et al., 2005).

Lange Zeit glaubte man, dass interne Tandemduplikationen sich nur in der juxtamembranären Domäne von FLT3 befinden. Breitenbücher et al. entdeckten 2008 bei 28,7 % der von ihnen untersuchten ITD-positiven AML-Patienten ITD-Mutationen, die in der non-juxtamembranären (non-JM) Domäne von FLT3 lokalisiert sind. Alle gefundenen non-JM-ITDs befinden sich in der Tyrosinkinase-Domäne I (TKD1) von FLT3, wobei 24,6 % im β 1-Faltblatt, 2 % in der Nukleotid-Bindungsschleife, 1,3 % im β 2-Faltblatt und 0,8 % 3' vom β 2-Faltblatt integriert sind. Anhand der Untersuchung einer ausgewählten non-JM-ITD (ITD627E) wurde gezeigt, dass diese Mutationen im 32D-Zellmodell zur konstitutiven Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors und von STAT5 führen sowie ein Wachstumsfaktor-unabhängiges Zellwachstum vermitteln (Breitenbuecher et al., 2009).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Prognose für Patienten mit einer FLT3-ITD-Mutation in der Tyrosinkinase-Domäne hinsichtlich des Gesamtüberlebens schlechter ist als für Patienten mit einer JM-ITD (Kayser et al., 2009). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, die biologischen Charakteristika der non-JM FLT3-ITDs näher zu untersuchen, um neue Ansatzpunkte für eine gezielte Therapie zu finden.

6. Die „*two-hit*“-Hypothese zur Entstehung der AML

Für die Entstehung der AML existiert eine „*two-hit*“ Hypothese, nach welcher eine Mutation allein nicht ausreicht, um das Vollbild einer AML zu erzeugen, sondern mindestens zwei verschiedene Mutationen nötig sind.

Als Klasse I Mutationen werden dabei Mutationen bezeichnet, die Signalwege aktivieren, welche zu verminderter Apoptose und erhöhter Zellproliferation führen. Hierunter fallen Mutationen im *c-Kit*-Gen und im *FLT3*-Gen. Klasse II Mutationen sind solche, die zu einem Stopp der Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen führen (z.B. AML1-ETO, PML-RAR).

Diese Hypothese wird unter anderem durch die Ergebnisse von Kelly et al. belegt, die im Mausmodell zeigen konnten, dass die FLT3-ITD einen myeloproliferativen Phänotyp induziert, welcher durch Leukozytose und hauptsächlich reife neutrophile Granulozyten charakterisiert ist (Kelly et al., 2002). Die FLT3-ITD-Mutation reicht somit allein nicht aus, um den Phänotyp der AML zu erzeugen.

FLT3-ITDs werden am häufigsten bei Patienten mit normalem Karyotyp oder unspezifischen zytogenetischen Veränderungen gefunden (Schnittger et al., 2002). Man weiß noch nicht genau, welche Mutationen den zweiten „hit“ bei Patienten mit FLT3-ITDs darstellen, da die üblichen, oben genannten Fusionsgene meist nicht mit den Längenmutationen des *FLT3*-Gens in Verbindung gebracht werden (Agnès et al., 1994).

Verschiedene Studien, in welchen Patienten mit AML untersucht wurden, konnten zeigen, dass das Vorhandensein einer FLT3-Längenmutation mit einer ungünstigen Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens assoziiert ist (Kiyoi et al., 1999; Abu-Duhier et al., 2000). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass FLT3-ITD positive Patienten bei Diagnosestellung einen höheren Anteil an Leukozyten und leukämischen Blasten aufwiesen als andere Patienten. Das Erreichen der kompletten Remission (CR) wurde durch das Vorliegen einer FLT3-ITD nicht negativ beeinflusst, jedoch kam es bei FLT3-ITD positiven Patienten verglichen mit Patienten ohne Mutation schneller zum Auftreten eines Rezidivs nach CR (Kottardis et al., 2001). Man vermutet, dass Rezidive dadurch zustande kommen, dass während der Therapie nicht alle leukämischen Stammzellen vernichtet werden können und diese als Ausgangspunkt für einen erneuten Schub fungieren (Heidel et al., 2011; Parmar et al., 2011). Längenmutationen des *FLT3*-Gens konnten bei AML in leukämischen Stammzellen nachgewiesen werden (Levis et al., 2005). Geht man von der Tatsache aus, dass FLT3-ITD positive Zellen durch die Mutation einen Proliferationsvorteil gegenüber nicht mutierten Zellen haben, könnte dies eine Erklärung für die kürzere Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidives bei betroffenen Patienten sein.

Da FLT3-Mutationen hauptsächlich bei AML mit normalem Karyotyp gefunden werden, kann eine FLT3-ITD als molekularer Marker für prognostische Aussagen in dieser Gruppe genutzt werden.

7. Signaltransduktion

Interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors führen zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation von Zellen im Zellkulturmodell. Um zu verstehen, wie diese Prozesse ablaufen, untersuchte man die Signaltransduktion von FLT3-Wildtyp- und FLT3-ITD-Rezeptoren.

Durch die Aktivierung des FLT3-Rezeptors nach Ligandenbindung und Dimerisierung kommt es zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste, die als „Andockstellen“ für Proteine dienen, welche eine „Src-homology 2“ (SH2)-Domäne enthalten. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem Grb2 („*growth factor receptor binding protein*“), welches bei Phosphorylierung der Tyrosinreste 768, 955 und 969 an den FLT3-Rezeptor binden kann, was wiederum zur Rekrutierung von Gab2 („*Grb2-associated binding protein*“) an den Rezeptor führt (Masson et al., 2009). Über diese Adaptermoleküle erfolgt auch die Aktivierung des RAS/RAF/MEK/MAP-Kinase-Signalweges. Masson et al. konnten auch zeigen, dass eine Mutation der Grb2-Bindungsstelle im FLT3-WT- und FLT3-ITD-Rezeptor zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK (*extracellular-signal regulated kinase*), einem „downstream“-Molekül dieses Signalweges, führt, da Gab2 nicht mehr an den Rezeptor binden kann. Die Hemmung des MAP-Kinase Signalweges über einen spezifischen MEK-Inhibitor führte zum Stillstand der Zellproliferation, sodass geschlussfolgert werden konnte, dass der MAP-Kinase-Signalweg wichtig für die mitogene Signalgebung des FLT3-Rezeptors ist (Zhang, Mantel und Broxmeyer, 1999). Im Unterschied zum wildtypischen FLT3-Rezeptor, kommt es bei FLT3-ITD-Mutationen durch die konstitutive Aktivierung des Rezeptors zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges und infolgedessen zu einer ligandenunabhängigen Zellproliferation.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die FLT3-ITD-Mutation eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierung des STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*)-Signalweges erfolgte, wohingegen durch den FLT3-WT-Rezeptor nach Stimulation mit dem FLT3-Liganden (FL) keine Aktivierung von STAT5 nachgewiesen werden konnte (Hayakawa et al., 2000). Als Bindungsstellen für STAT5 wurden die Tyrosinreste 589 und 591 in der juxtamembranären Domäne des FLT3-Rezeptors identifiziert (Rocnik et al., 2006). Diese könnten durch die Insertion einer FLT3-ITD und der daraus folgenden Strukturveränderung der JM-Domäne freigelegt werden, wodurch die Bindung und Aktivierung von STAT5 ermöglicht würde. Diese Bindungsstellen wurden in Experimenten bestätigt, die zeigten, dass Mutationen der Tyrosinreste 589 und 591 zu einer unverändert konstitutiven Aktivierung des FLT3-ITD-Rezeptors bei einer deutlich verminderten Aktivierung von STAT5 und seiner „downstream“ Signalwege führten.

Während die Wachstumsfaktorunabhängige Proliferation solcher Zellen erhalten blieb, verloren sie die Fähigkeit im Mausmodell einen myeloproliferativen Phänotyp zu erzeugen (Abu-Duhier et al., 2000). Dies verdeutlicht die Bedeutung des STAT5-Signalweges für das transformierende Potential von internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors.

Ein weiterer wichtiger Signalweg, welcher am FLT3-WT-Rezeptor über eine Stimulation mit IL-3 reguliert wird, ist der Phospho-Inositol-3-Kinase-(PI3K)-Signalweg. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung dieses Signalweges für das Überleben und die Proliferation von AML-Zellen wichtig ist (Xu et al., 2002).

In FLT3-ITD positiven Zellen kommt es zu einer konstitutiven, Wachstumsfaktorunabhängigen Aktivierung von Akt, einer Serin-Threonin-Kinase, über den PI-3Kinase-Signalweg. Dies führt zur Inaktivierung eines pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors (Foxo3a) und begünstigt somit Überleben und Proliferation der Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die konstitutive Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase Akt eine Leukämie-ähnliche Erkrankung bei Mäusen ausgelöst werden kann (Brandts et al., 2005).

8. FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs)

Alle zuvor genannten Signalwege spielen eine wesentliche Rolle in der durch FLT3 vermittelten Zellproliferation, wobei gerade die Unterschiede in der Signalgebung zwischen mutiertem und Wildtyp-FLT3 einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung gezielter Therapiemöglichkeiten bieten. Neue Therapiestrategien bei der Behandlung der AML beinhalten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs), welche gezielt die Aktivität des FLT3-Rezeptors hemmen (Kindler et al., 2010). Besonders für die etwa 30% der Patienten mit AML, bei denen eine interne Tandemduplikation des FLT3-Rezeptors vorliegt, welche zu einem deutlich schlechteren Gesamtüberleben sowie schlechterem Ansprechen auf eine konventionelle Chemotherapie führt, sind diese von Interesse (Thiede et al., 2002; Kayser et al., 2009). Es wurden bereits mehrere direkte FLT3-Inhibitoren entwickelt und zum Teil auch in klinischen Studien getestet.

Midostaurin (PKC412), ursprünglich als Inhibitor der Proteinkinase C entwickelt, ist auch ein potenter FLT3-Inhibitor. So konnte gezeigt werden, dass PKC412 im Zellkulturmodell bei Ba/F3-Zellen mit einer FLT3-ITD-Mutation Apoptose und Zellzyklus-Arrest initiiert (Weisberg et al., 2002). In klinischen Studien zeigte sich die Wirksamkeit von PKC412 bei AML, wobei die alleinige Gabe nicht zu einer kompletten Remission führte, aber der Anteil der peripher zirkulierenden Blasten reduziert wurde (Stone et al., 2005; Fischer et al., 2010). Ein weiterer Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher derzeit in klinischen Studien bei AML untersucht wird, ist Sorafenib. Dieser Inhibitor wurde ursprünglich als Hemmstoff der

Serin/Threonin-Kinase Raf1 entwickelt, zeigte sich aber auch wirksam gegen verschiedene andere Kinasen, unter anderem auch FLT3. Das Besondere an Sorafenib ist, dass dieser TKI besonders an FLT3-ITD-Rezeptoren angreift. So konnte gezeigt werden, dass Sorafenib einen Wachstumsstopp und Apoptose in Ba/F3 FLT3-ITD-Zellen verursacht und bei Patienten mit FLT3-ITD positiver AML die Anzahl der peripher zirkulierenden leukämischen Blasten reduziert (Zhang et al., 2008). Weitere klinische Studien konnten zeigen, dass sich Sorafenib besonders in AML-Rezidiven, therpierefraktärer AML sowie in Kombination mit allogener Stammzell-Transplantation als besonders wirksam erwies (Metzelder et al., 2009; 2010).

Die bisher genannten TKIs bezeichnet man als FLT3-Inhibitoren der „ersten Generation“, da sie nicht spezifisch als Hemmstoffe für FLT3 entwickelt wurden. Zur Verbesserung von klinischer Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil, werden Inhibitoren der „zweiten Generation“ entwickelt, welche sich spezifisch gegen die FLT3-Rezeptortyrosinkinase richten. Ein solcher FLT3-Inhibitor ist AC220 (Quizartinib) (Chao et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass AC220 den meisten Inhibitoren der ersten Generation hinsichtlich Wirkpotenz und Selektivität überlegen ist. Eine effektive Hemmung des FLT3-Rezeptors konnte im Zellkulturmodell, im Mausmodell und auch in primären Blasten von einem Patienten mit FLT3-ITD positiver AML nachgewiesen werden (Zarrinkar et al., 2009). Die Wirksamkeit und Verträglichkeit von AC220 bei Patienten, die an AML leiden, wird derzeit in verschiedenen klinischen Studien untersucht.

Trotz verbessertem initialen Ansprechen von FLT3-ITD positiven Patienten mit AML auf neue Medikamente, ist das schnelle Auftreten von Rezidiven ein weiterhin bestehendes Problem. Bezüglich der ungenügenden langfristigen Wirksamkeit der Therapie existieren verschiedene Hypothesen. So wurde bereits beschrieben, dass FLT3-ITD-Mutationen verschiedene Resistenzmechanismen vermitteln, die Zellen unempfindlich gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren machen. Man unterscheidet zwischen primärer Resistenz, also von Therapiebeginn an fehlendem Ansprechen auf TKIs und sekundärer Resistenz, das heißt der Entwicklung einer Resistenz im Verlauf der Therapie. Ein primärer Resistenzmechanismus könnte die Aktivierung von alternativen Signalwegen sein, welche Proliferation und Überleben der Zelle fördern und unabhängig von FLT3 fungieren (Kindler et al., 2010). Als sekundäre Resistenzmechanismen sind Mutationen in der ATP-Bindungstasche des FLT3-Rezeptors, also dem Angriffspunkt der TKIs (Cools et al., 2004; Heidel et al., 2006; Breitenbuecher et al., 2009), autokrine FL-Stimulation (Zhou et al., 2009) und FLT3-Überexpression (Weisberg et al., 2002) beschrieben worden.

Dies macht die Relevanz deutlich, weitere langfristig wirksame Therapieoptionen für Patienten mit FLT3-ITD-Mutation zu finden. Am besten kann dies erreicht werden, wenn möglichst viel über die biologischen Eigenschaften dieser Mutationen herausgefunden werden kann.

9. Zielstellung

Interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors sind unter den häufigsten Mutationen bei Patienten mit zytogenetisch normaler AML (Schnittger et al., 2002). Das Auftreten einer solchen Mutation geht mit einer schlechten Prognose und einem schlechten Ansprechen auf konventionelle Chemotherapeutika einher (Thiede et al., 2002). Neben Mutationen in der juxtamembranären Domäne (Nakao et al., 1996) kommen auch interne Tandemduplikationen in der Tyrosinkinase-Domäne des FLT3-Rezeptors vor, welche als non-JM-ITDs bezeichnet werden (Breitenbücher et al., 2009). Durch interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptor wird eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase (Kiyoi et al., 1996) und die Aktivierung von rezeptorspezifischen „*downstream*“-Signalwegen vermittelt (Hayakawa et al., 2000). Die Expression einer FLT3-ITD führte im Zellkulturmodell zur wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation und im Mausmodell zur Entwicklung einer myeloproliferativen Erkrankung (Kelly et al., 2002).

Zwischen FLT3-ITDs in der juxtamembranären Domäne und FLT3-ITDs in der non-juxtamembranären Domäne scheinen biologische Unterschiede zu bestehen, da Patienten mit einer non-JM-ITD hinsichtlich des Gesamtüberlebens eine deutlich schlechtere Prognose zeigen als Patienten mit einer JM-ITD des FLT3-Rezeptors (Kayser et al., 2009).

Ziel dieser Arbeit war es zunächst neue non-JM- FLT3-ITDs in Patientenmaterial zu identifizieren, was mit der Mutation FLT3-ITD F612LGS (17) gelang.

Des Weiteren sollten im 32D-Zellkulturmodell nach stabiler Transfektion der FLT3-ITDs deren transformierendes Potential überprüft werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Signaltransduktion von mutierten FLT3-Rezeptoren sowie der Sensitivität der FLT3-ITD aktivierten Signalmoleküle gegenüber den Tyrosinkinaseinhibitoren Midostaurin, Sorafenib und Quizartinib. Im Mittelpunkt stand hierbei die Untersuchung der JM-ITDs (FLT3-ITDK602R (7) und FLT3-ITD598/599 (12)) und den non-JM-ITDs des FLT3-Rezeptors (FLT3-ITDF612LGS (17), FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDE611V (32)).

II Material und Methoden

1. Organismen

1.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: verwendete *E.coli* Stämme, Genotyp und Herkunft

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG λ-</i>	Invitrogen (New York, USA)
One Shot TOP10F ['] Chemically Competent <i>E.coli</i>	F ['] { <i>lacIq Tn10</i> (TetR)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen (New York, USA)

1.2 Zelllinien

Tabelle 2: verwendete Zelllinien, Eigenschaften und Herkunft

Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft
32D	murine, IL-3-abhängige myeloische Zelllinie	DSMZ
WEHI-3B	makrophagen-ähnliche, murine, myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie, die konstitutiv IL-3 produziert; Überstand dient als IL-3-Quelle für 32D-Zellen	DSMZ
Phoenix	Verpackungszelllinie zur Produktion retroviraler Partikel für die Infektion von 32D-Zellen	DSMZ

2. Plasmide

Tabelle 3: verwendete Plasmid, Eigenschaften und Herkunft

Plasmid	Eigenschaften/Marker	Herkunft
pcDNA 3.1	Vektor zur transienten und stabilen Expression in Säugetierzellen; CMV-Promotor	Invitrogen (New York, USA)
pCR4 [®] TOPO	„TOPO TA Cloning“ Vektor zur Insertion von PCR-Produkten mit 3'-A-Überhängen; Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen	Invitrogen (New York, USA)
pMSCV PIG (Puro IRES GFP) empty vector	muriner, retroviraler Expressionsvektor mit Ampicillin- und Puromycinresistenzgen, sowie einer internen ribosomalen „entry-site“ (IRES) nachgeschalteter GFP („green fluorescent protein“-) Sequenz	Heidel, F., et al.; Addgene, Cambridge, USA

pCDNA 3.1 FLT3-ITD F612LGS (17)	pCDNA 3.1 Vektor mit einklonierter FLT3-ITDF612LGS (17); die Länge der ITD beträgt 51 bp, einkloniert über die Schnittstellen <i>HpaI</i> for/rev	diese Arbeit
pMSCV PIG FLT3-WT	MSCV-Vektor mit einkloniertem FLT3-WT, einkloniert über die Schnittstellen <i>BglII</i> for/ <i>XhoI</i> rev	Hämatologie/ Onkologie, AG Fischer
pMSCV PIG FLT3-ITD 598/599 (12)	MSCV-Vektor mit einklonierter FLT3-ITD 598/599 (12); die Länge der ITD beträgt 36 bp, einkloniert über die Schnittstellen <i>BglII</i> for/ <i>XhoI</i> rev	Hämatologie/ Onkologie, AG Fischer
pMSCV PIG FLT3-ITDF612LGS (17)	MSCV-Vektor mit einklonierter FLT3-ITDF612LGS (17); die Länge der ITD beträgt 51 bp, einkloniert über die Schnittstellen <i>BglII</i> for/ <i>XhoI</i> rev	Hämatologie/ Onkologie, AG Fischer
pMSCV PIG FLT3-ITDK602R (7)	MSCV-Vektor mit einklonierter FLT3-ITDK602R (7); die Länge der ITD beträgt 22 bp, einkloniert über die Schnittstellen <i>BglII</i> for/ <i>XhoI</i> rev	Hämatologie/ Onkologie, AG Fischer
pMSCV PIG FLT3-ITDE611V (32)	MSCV-Vektor mit einklonierter FLT3-ITDE611V (32); die Länge der ITD beträgt 97 bp, einkloniert über die Schnittstellen <i>BglII</i> for/ <i>XhoI</i> rev	Hämatologie/ Onkologie, AG Fischer

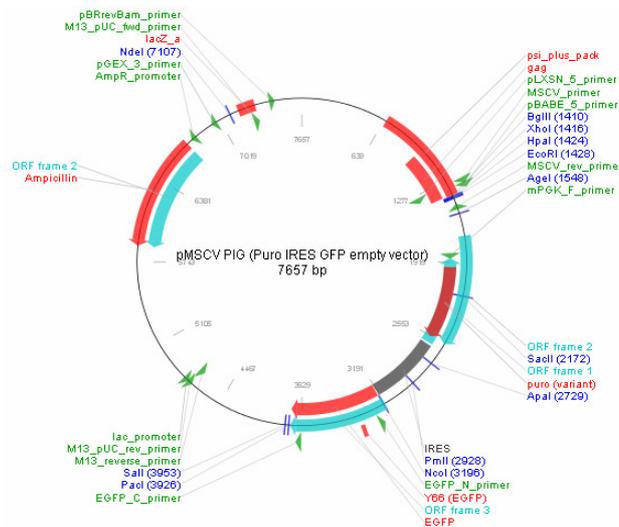


Abbildung 3:
Vektorkarte pMSCV PIG (Puro IRES GFP, empty vector), 7657 bp; alle FLT3-Konstrukte wurden über die Restriktionsschnittstellen *BglII* for / *XhoI* rev einkloniert

3. Oligonukleotide

3.1 PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt. Die Sequenzangabe erfolgt immer in 5'-3'-Orientierung. Start- bzw. Stop-Kodons sind hervorgehoben, die Schnittstellen sind in Kleinbuchstaben, die eigentliche Sequenz in Großbuchstaben dargestellt.

Tabelle 4: verwendete PCR-Primer, Sequenz und Schmelztemperatur (Tm)

Primer	Sequenz
FLT3 mRNA For1	CAG GAT CCC ATG CCG GCG TTG GC
FLT3 mRNA Rev2	CAG CGG CCG CGC TGT GAC AAC CAT AGC
FLT3 <i>NotI</i> for	CAG Cgg ccG CCC ATG CCG GCG TTG GCG CGC GAC
FLT3 <i>NotI</i> rev	CAG Cgg ccG CCT ACG AAT CTT CGA CCT GAG CC
FLT3 <i>BamHI</i> F	Gga tcC ATG CCG GCG TTG GCG CG
FLT3 cDNA <i>HpaI</i> R	CAT gtt aac CTA CGA ATC TTC GAC CTG AGC C
FLT3 cDNA <i>HpaI</i> F	gtt aac ATG CCG GCG TTG GCG CG
FLT3 cDNA <i>HindIII</i> R	Aag ctT CTA CGA ATC TTC GAC CTG
FLT3 <i>XhoI</i> for	GGA ATT AGA AAA CAA AGC ACt cga GGA GG
FLT <i>XhoI</i> rev	GGA ATC ACT CAT GAT ATC tcg aGC CAA TCC
FLT3 <i>EcoRI</i> for	CAT Gaa ttC ATG CCG GCG TTG GC
FLT3 <i>EcoRI</i> rev	CAT Gaa ttC CTA CGA ATC TTC GAC CTG AGC C
FLT3 <i>BglII</i> For1	CAT Aga tcT ATG CCG GCG TTG GC
FLT3 <i>BamHI</i> new rev	CGG gat cCG GCT CGA ATC TTC GAC CTG AGC CT
3' SOE <i>HpaI</i>	CAC CTT ATG TCC GTC CCA AAT AAT T
5' SOE <i>HpaI</i>	AAT TAT TTG GGA CGG ACA TAA GGT G
PIG <i>BglII</i> for	CGC CGG AAT TAg atc TCA TGC CGG CGT TGG CGC GCG AC
PIG <i>XhoI</i> rev	ATT CGT TAA CCT CGA GCT ACG AAT CTT CGA CCT GAG C

3.2 Sequenzierungsprimer

Tabelle 5: verwendete Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz	Größe
Seq FLT3 Rev1	AAA TTA GGG AAG GAT GGC CG	20-mer
Seq FLT3 Rev2	CTG AGA TTT GAT CCG AGT CC	20-mer
Seq FLT3 Rev3	TCT CTT TCA GAG CTG TCT GC	20-mer
Seq FLT3 Rev4	GTG CCA AGG GAA TTG TAT GC	20-mer
Seq FLT3 Rev5	TGA ACA CTT CTT CCA GGT CC	20-mer
Seq FLT3 For1	ATC TGC TTC CAT CAC ACT GC	20-mer
Seq FLT3 For2	AAC TCC TCA GAC CAC ATT GC	20-mer
Seq FLT3 For3	GTG CTG TGC ATA CAA TTC CC	20-mer
Seq FLT3 For4	ACT CAA GAT GAT GAC CCA GC	20-mer
Seq FLT3 For5	ATA ATG CAA TCC TGT TGG GC	20-mer
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	20-mer
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20-mer

4. Antikörper

Tabelle 6: verwendete Antikörper und Herkunft

Antikörper	Epitop	Herkunft	Verdünnung
Anti-phospho-FLT3	Tyr 591	Cell Signaling	1:1000
Anti FLT3/FLK2	C-Terminus	Santa-Cruz	1:200
Anti-phospho STAT5A/B	Tyr 694/699	Millipore	1:1000
Anti-STAT5a	C-Terminus	Cell Signaling	1:100
Anti-phospho AKT	Ser 473	Cell Signaling	1:1000
Anti-AKT	C-Terminus	Cell Signaling	1:1000
Anti-phospho-ERK1/2	Thr 202/Tyr 204	Cell Signaling	1:2000
Anti-ERK1/2	C-Terminus	Cell Signaling	1:1000

anti Rabbit sekundär AK		Cell Signaling	1:2000
anti Mouse sekundär AK		Santa Cruz	1:2000

5. Chemikalien, Kits und Enzyme

Tabelle 7: verwendete Chemikalien, Kits und Enzyme sowie deren Herkunft

Firma	Chemikalien, Kits, Enzyme
Bio-Rad (München)	Protein Assay
Clontech (Mountain View, Canada)	In-Fusion HD Cloning Kit
Dharmacon	FLT3-siRNA
Fermentas (St. Leon-Rot)	dNTP-Mix (10mM), Gene Ruler 1 kb DNA Leiter, High Fidelity PCR Enzyme Mix, PageRuler Prestained Proteinladder“, Protein-Größenmarker, Pfu DNA Polymerase, Taq DNA Polymerase, T4-DNA-Ligase, Rnase A
Invitrogen (New York, USA)	Blasticidin, DMEM, Natriumpyruvat, Opti-MEM, PBS, Streptomycin-Penicillin
Millipore (Schwalbach)	Chemilumineszenz-Kit
New England Biolabs Fra(nkfurt am Main)	BSA, <i>BglII</i> -Restriktions-Endonuklease, <i>EcoRI</i> - <i>HF</i> -Restriktions-Endonuklease, <i>HpaI</i> -Restriktions-Endonuklease, <i>NotI</i> - <i>HF</i> -Restriktions-Endonuklease, <i>XhoI</i> -Restriktions-Endonuklease
PAA (Cölbe)	FCS, RPMI 1640
PeqLab (Erlangen)	HiFi DNA-Polymerase
Promega (Mannheim)	Go Taq DNA-Polymerase
Qiagen (Hilden)	Kontroll-siRNA (Alexa 488) QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN Plasmid Maxi Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Qiaquick PCR Purification Kit, RNeasy Mini Kit, Omniscript RT
Roche Applied Science (Mannheim)	Alkalische Phosphatase, BamHI-Restriktions-Endonuklease, Complete, EDTA freie Tabletten, FuGene, PhosStop Tabletten, Western Blocking Reagenz
Roth (Karlsruhe)	2-Propanol, Agar-Agar, Agarose, Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl), APS, Borsäure, DTT, Ethanol, Ethidiumbromid, Glycerin Isopropanol, Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃), Methanol, Milchpulver, Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid (NaOH), NEEO Ultra Agarose, Trypton/Pepton, SDS-Pellets
Serva Electrophoresis (Heidelberg)	Natriumdodecylsulfat (SDS), TRIS, Tween 20
Sigma-Aldrich (Steinheim)	β -Mercaptoethanol, Calciumchlorid (CaCl ₂), Propidiumiodid, Trypanblau
Stratagene (Waldbronn)	QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis
Thermo Scientific (Rockford, USA)	Restore Western Blot Stripping Puffer

6. Standard-Lösungen, –Puffer und -Medien

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
vollentsalztes Wasser	ad 1000 ml

Um LB-Agar herzustellen wurde dem Medium 1,5% Agar hinzugefügt. Um Plasmide mit Ampicillin-Expressionskassetten zur selektionieren, wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50,0 mg/ml
------------	------------

Zum Ansetzen der Lösung wurde 50% Ethanol verwendet und die Lösung bei -20°C gelagert.

Puromycin-Stammlösung

Puromycin	10,0 mg/ml
-----------	------------

Zum Ansetzten der Lösung wurde Aqua dest. verwendet und die Lösung bei -20°C gelagert.

GTE-Lösung

Glucose	50 mM
Tris/HCl	25 mM
EDTA	10 mM

5M-Kaliumacetat-Lösung

Um die Lösung herzustellen, wurden 29,5 ml Essigsäure mittels KOH-Plätzchen auf einen pH-Wert von 4,8 eingestellt. Mit Aqua dest. wurde anschließend auf ein Endvolumen von 100 ml eingestellt.

NaOH SDS-Lösung

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

20x TBE-Puffer

Tris	107 g
Borsäure	55,0 g
Na ₂ EDTA	7,4 g
vollentsalztes Wasser	ad 500 ml

“Gel-loading”-Puffer

Glycerin (96%)	50 %
SDS	1 %
EDTA	125 mM
Bromphenolblau	0,05 %
Xylencyanol	0,05 %

Zellkulturmedium für 32D-Zellen

RPMI-1640	500 ml
FCS (inaktiviert)	50 ml
IL-3	10 %
Additiva	29 ml
Plasmocin	100 µl

Hungermedium

RPMI 1640	500ml
FCS	2,5 ml
Additiva	29 ml

Additiva

- 100 ml PBS
- 100 ml PBS + 175 µl Mercaptoethanol
- 100 ml HEPES-Puffer 1M, pH 7,2
- 100 ml Natriumpyruvat 100 mM
- 100 ml L-Glutamin 200 mM
- 60 ml nicht-essentielle Aminosäuren 10x
- 20 ml Asparagin (10 mg/ml)

Die Inhaltsstoffe wurden zusammen gegeben, sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert.

Zellkulturmedium für Phoenix-Zellen

DMEM + GlutaMAX	500 ml
FCS (inaktiviert)	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Plasmocin	100 µl
NaOH (1 M)	500 µl

HEPES-Puffer, pH 7,4 5 ml

Das Medium wurde sterilfiltriert und bei +4°C gelagert.

10x TBST

Tris/HCl (1M)	100 ml
NaCl (5M)	300 ml
Tween 20	5 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Lysepuffer Western Blot

Zu 1 ml Japan-Puffer wurden 10 µl Natriumfluorid (1M), 80 µl Complete und 40 % PhosphoStop frisch zugegeben.

Blockingpuffer

10x TBST	200 ml
Magermilchpulver	5 %

10 x Western Blot Puffer

Tris	30,29 g
Glycin	144,1 g
SDS	10 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Trenngel, 8 %

Aqua dest.	4,6 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
Acrylamid	2,7 ml
SDS 10 %	100 µl
APS 10 %	100 µl
TEMED	10 µl

Sammelgel, 5 %

Aqua dest.	3,4 ml
Acrylamid	830 µl
Tris 1 M, pH 6,8	630 µl
SDS 10 %	50 µl
APS 10 %	50 µl

Transferpuffer Western Blot

10x Western Blot Puffer	100 ml
Aqua dest.	700 ml
Methanol	200 ml
TEMED	5 µl

7. Standardgeräte

Tabelle 7: Standardgeräte und Hersteller

Firma	Geräte
Binder GmbH (Tuttlingen)	CO2-Inkubator
BD (Heidelberg)	Durchflusszytometer „Calibur“
Bio-Rad (München)	MicroPorator; „Mini-PROTEAN Tetra Cell“-Systeme für Western Blot; “PowerPack” Power Supply
CAT-Ing (Staufen)	Rollmischer
LAUDA (Lauda-Königshofen)	Wasserbad
Thermo-Scientific (Rockford, USA)	Zentrifuge „Multifuge 3SR+; „HERASAFE KS“ Zellkulturbank; „Heraeus Multifuge X3“ Zentrifuge
PeqLab (Erlangen)	Thermo-Inkubationsmischer; PCR-Cycler; „Fusion“ Chemilumineszenz-Detektionsgerät “PeqStar”; Environmental Shaker-Incubator
Eppendorf (Hamburg)	Mikrozentrifuge 5415R
Heidolph (Schwabach)	“MR-HEi-Tec” Sicherheitsmagnetrührer mit Heizung
neolab (Berlin)	Reagenzglasmixer Vortex
Tecan (Männedorf)	Tecan Sunrise Adsorptions Detektor
VWR (Darmstadt)	Thermocycler
Zeiss (Göttingen)	Mikroskop „Primo Vert“

8. Molekularbiologische Arbeitstechniken

8.1 Extraktion mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Dichtegradienten-zentrifugation

Bei der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nutzt man die Tatsache, dass die verschiedenen Bestandteile des Blutes unterschiedliche Dichtewerte haben, um diese voneinander zu trennen. Die Ficoll-Lösung liegt mit ihrer Dichte zwischen Erythrozyten einerseits und Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten andererseits.

Heparinisiertes Vollblut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und drei Teile Ficoll-Lösung mit vier Teilen verdünntem Blut überschichtet. Es folgte die Zentrifugation bei 1400 rpm für 20 min bei ausgeschalteter Bremse. Nach der Zentrifugation hatten sich Erythrozyten unterhalb der Ficollschicht angesammelt, während die mononukleären Zellen eine Interphase zwischen Ficoll und Zellsuspensionsmedium bildeten. Diese Interphase

konnte anschließend abpipettiert werden. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend bei -80°C gelagert.

8.2 Präparation von mRNA

Die Präparation von mRNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die erhaltene RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

8.3 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von mRNA in cDNA erfolgte mit dem Omniscript RT Kit von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils $2\ \mu\text{g}$ RNA eingesetzt, oder bei sehr niedrigen RNA-Konzentrationen mit einem maximalen Volumen von $8\ \mu\text{l}$ RNA gearbeitet. Die RNA wurde vor der Verwendung zunächst bei 65°C für 5 Minuten denaturiert. Der Ansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

10x Buffer RT	2 μl
dNTP Mix	2 μl
Oligo-dT primer (10 μM)	1,25 μl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 μl
Template RNA	2 μg
RNase-free water	ad 20 μl

8.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“) ist ein Verfahren, zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte *in vitro*. Hierbei macht man sich die Fähigkeit thermostabiler DNA-Polymerasen zunutze, welche von DNA-Strängen mittels semi-konservativer Replikation eine Kopie herstellen können.

Zu Beginn eines Reaktionszyklus muss die doppelsträngig vorliegende DNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert werden. Anschließend wird der Reaktionsansatz wieder abgekühlt, sodass sich spezifische DNA-Oligonukleotide (Primer) an die nun einzelsträngig vorliegende DNA anlagern können. Die Primer dienen als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerase, welche komplementär zur Matrize Oligonukleotide einbaut und so den DNA-Strang vom 3'-Ende des Primers ausgehend verlängert (Annealing), sodass am Ende eines Reaktionszyklus wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Dieser Zyklus wird einige Male wiederholt, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung der ursprünglichen DNA-Menge erreicht wird.

Alle Reaktionsschritte laufen in einem Thermocycler ab. Hier kann man verschiedene Zyklen mit Temperatur und Dauer des jeweiligen Reaktionsschrittes programmieren, sodass ideale Bedingungen für die genutzte Polymerase und die Primer vorliegen.

„Cycling“-Programm:

Denaturierung :	95,0°C, 2 min	
Denaturierung:	95,0°C, 30 sec	} 30 Zyklen
Annealing:	62,2°C, 30 sec	
Elongation:	72,0°C, 4 min	
terminale Elongation:	72,0°C, 5 min	

Die Annealing-Temperaturen wurden je nach Schmelztemperatur der Primer angepasst.

8.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

8.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die FLT3-ITDF612LGS (17)-Sequenz, welche in Patientenmaterial gefunden wurde, enthielt ursprünglich eine Punktmutation an der Stelle 679-681, welche in einem Aminosäureaustausch von Threonin nach Methionin resultierte. Um einen Einfluss dieser Mutation auf die Ergebnisse dieser Arbeit auszuschließen, wurde mit Hilfe des „QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene diese Punktmutation rückgängig gemacht.

Das Design der Primer (3'SOE *HpaI*, 5'SOE *HpaI*) richtete sich nach den Vorgaben des Herstellers. Beide Primer enthalten die gewünschte „Rückmutation“, welche in die neu entstehenden Tochterstränge eingebaut wird. Anschließend wird mittels eines Enzyms, DnpI, der parentale Strang, welcher methyliert ist, abgebaut, sodass nur die neu erzeugten DNA-Stränge, welche die Mutation enthalten übrig bleiben.

Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Herstellerangaben und wurde anschließend durch Sequenzierung verifiziert.

8.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Ergebnisse der PCR wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1 %-igen Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V. Zur Detektion der DNA wurde das Gel anschließend für 15 Minuten in einer Ethidiumbromid-haltigen Lösung gefärbt.

Abschließend konnten die angefärbten DNA-Banden auf dem Agarosegel im ultravioletten Licht sichtbar gemacht werden.

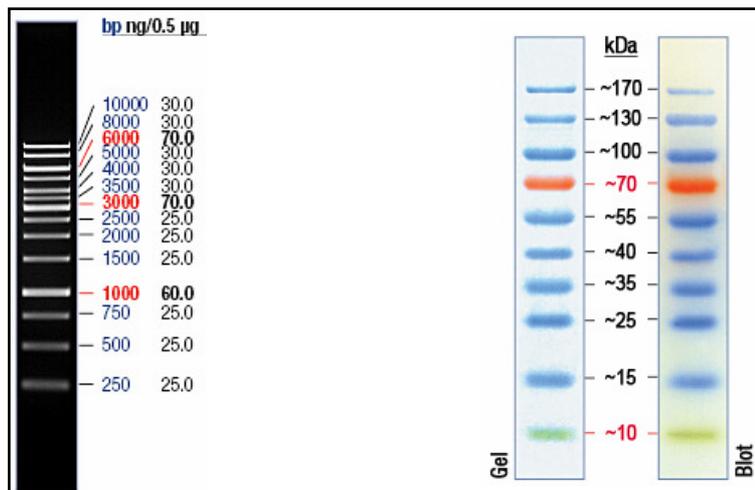


Abb.4: DNA- und Protein-

Größenmarker

links: GeneRuler™

1kB DNA Ladder

(Fermentas) rechts:

PageRuler™

Prestained Protein

Ladder

(Fermentas)

8.8 Gelextraktion

Die Extraktion und Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (Quiagen) nach Vorgaben des Herstellers.

8.9 Restriktionsverdau

Bestimmte Enzyme, sogenannte Restriktionsendonukleasen, ermöglichen das Zerschneiden von DNA-Strängen im Bereich spezifischer Sequenzen, sodass DNA-Bruchstücke definierter Länge entstehen.

Für jedes Restriktionsenzym existieren bestimmte Reaktionsbedingungen, um die höchstmögliche Aktivität zu erreichen. Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben zusammengestellt, die DNA hinzugegeben und für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Überprüfung des Restriktionsverdaus erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

8.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine DNA-Ligase ist ein Enzym, welches die Verknüpfung von DNA-Segmenten mit komplementären Enden ermöglicht.

Hierfür wurden ein zunächst mittels Restriktionsenzymen linealisierter Vektor, sowie ein mit den gleichen Restriktionsenzymen verdautes DNA-Fragment eingesetzt. In dieser Arbeit wurde stets ein Verhältnis Vektor:DNA von 1:5 gewählt. Es wurde die T4-DNA-Ligase von Fermentas verwendet und der Reaktionsansatz nach Herstellerangaben zusammen pipettiert. Die Ligation wurde für 2 Stunden bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend bei 65°C für 10 min inaktiviert.

9. Bakterienkultur

9.1 Kulturbedingungen und Aufbewahrung

Die verwendeten *E.coli*-Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten oder in flüssigem LB-Medium mit jeweils 50 µg/ml Ampicillin entweder im Brutschrank oder im Thermoschüttler bei 37°C kultiviert. Zur Aufbewahrung der Bakterien wurden aus Schüttelkulturen von Einzelkolonien Glycerolstocks angelegt. Hierfür wurden 850 µl einer *E.-coli*-Schüttelkultur mit 150 µl Glycerin (87%) versetzt und anschließend bei -80°C eingefroren.

9.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Transformation bezeichnet man die Übertragung von freier, aufgereinigter DNA in Wirtsorganismen, in diesem Fall *Escherichia coli*.

Die chemisch kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit jeweils 1 µl des Plasmides versetzt. Es folgten eine Inkubation auf Eis für 20 Minuten und anschließend ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden, um das Plasmid in die Zellen zu bringen. Danach wurden 500 µl SOC-Medium (vorgewärmt auf 37°C) zugesetzt und die Zellen bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. In dieser Zeit erfolgte die Expression der auf dem Plasmid codierten Antibiotika-Resistenz. Die Zellen wurden nun auf LB-Platten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Am nächsten Morgen wurden Einzelkolonien gepickt und in 5 ml flüssiges LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) überführt. Diese Schüttelkulturen wurden bei 37°C im Thermoschüttler über Nacht angezüchtet.

9.3 Plasmidpräparation mittels Plasmid-Miniprep

Für die Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Quiagen) verwendet und die Präparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

10. Zellkultur

10.1 Kultivierung und Kryokonservierung

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Gegenwart von 5% CO₂.

Um Zellen langfristig aufzubewahren, kann eine Lagerung -80°C erfolgen. Hierzu wurden 1x10⁶ Zellen in 800 µl Medium mit 100 µl FBS und 100 µl DMSO versetzt und bei -80°C eingefroren.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37°C Wasserbad gesetzt. Die Zellsuspension wurde in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellen wurden bei 1400 rpm für 5 min

zentrifugiert um das enthaltene DMSO zu entfernen. Das entstandene Pellet wurde in 25 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen wurden in eine Zellkulturflasche überführt.

Für Wachstumsfaktor-abhängige Zelllinien wurde murines IL-3 verwendet, welches aus dem Überstand von WEHI-3B Zellen gewonnen wurde.

10.2 Retrovirale Transfektion

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen, wie zum Beispiel die liposomale Transfektion, die Elektroporation oder die retrovirale Transfektion. Die jeweils verwendete Transfektionsmethode ist sowohl von der zu transfizierenden Zelllinie, als auch von deren weiterer Verwendung abhängig.

Für die retrovirale Infektion von Zielzellen werden infektiöse Viruspartikel benötigt. Das retrovirale Gentransfersystem umfasst zwei Komponenten, den retroviralen Vektor und die Verpackungszelllinie. Der retrovirale Vektor verfügt über die retroviralen 5'- und 3'-LTR („long terminal repeats“), die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen sowie gegebenenfalls einen Selektionsmarker flankiert. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind (Williams et al., 1984)

Um mit einem viralen Vektor genetisches Material in Zielzellen mittels Transfektion einzubringen, muss zunächst die gewünschte cDNA-Sequenz in den retroviralen Vektor subkloniert werden. Diese retroviralen Vektoren sind nicht mehr replikationskompetent, da ihnen regulatorische Sequenzen oder die Gene für Enzyme, Kapsid- oder Hüllmembranproteine fehlen. Werden nun Vektoren, die das Verpackungssignal ψ besitzen zusammen mit retroviralen Vektoren mit der gewünschten DNA-Sequenz in eine Verpackungszelllinie eingebracht, erfolgt die Bildung von Virionen, die zur Infektion von Zielzellen genutzt werden können (Miller et al., 1990). Replikations-inkompetente Vektoren, wie z. B. der in dieser Arbeit verwendete retrovirale pMSCV („murine stem cell virus“-Vektor, haben den Vorteil, dass sie sich in der Zielzelle, die keine viralen Geninformationen enthält, nicht unkontrolliert vermehren können und werden daher gegenüber replikationskompetenten Vektoren bevorzugt.

Zunächst wurde die Verpackungszelllinie Phoenix E in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, wobei die Zelldichte etwa $1,5-2,0 \times 10^6$ Zellen/Schale betragen sollte. Am zweiten Tag lag die Konfluenz der Zellen idealerweise bei etwa 70%. Nun erfolgte die Transfektion der Zellen mit den Plasmiden gag/pol und eco/env, welche für das virale Hüllprotein sowie die virale Polymerase codieren, und mit den gewünschten FLT3-Plasmiden. In dieser Arbeit wurden für die retrovirale Transfektion folgende Plasmide eingesetzt: PIG FLT3-WT, PIG FLT3-ITD589/599 (12), PIG FLT3-ITDF612LGS (17), PIG FLT3-ITDG613E (33) PIG FLT3-ITDE611V (32) und PIG FLT3-ITDK620R (7). Hierfür werden 3 μ g des eco/env-Plasmids, 10 μ g des gag/pol-Plasmids und 10 μ g des FLT3-Plasmids gemischt. In einem

anderen Reaktionsgefäß wurden 1,8 ml Optimem[®] mit 80 µl FuGene[®] (Roche) zusammenpipettiert und anschließend beide Ansätze vermischt und bei RT für 15 min inkubiert.

Von den Phoenix E-Zellen wurde zunächst das verbrauchte Medium abnommen, verworfen und 4 ml frisches Virusmedium hinzugefügt. Anschließend wurde der Plasmid-Mix tropfenweise zu den Zellen gegeben. Es erfolgte die Inkubation ü. N. bei 37°C im Zellkulturschrank. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert. Am dritten Tag wurde der Überstand der Phoenix-Zellen, welcher die Viruspartikel enthält, von den Zellen abgenommen und auf Eis gelagert. Die 32D-Zellen wurden für die Infektion vorbereitet, geerntet und in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und jeweils 1×10^6 Zellen pro Ansatz verwendet. Diese wurden im Virusüberstand resuspendiert und bei 2000 rpm für 1,5 Stunden im 50 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Die Suspension wurde auf 2 Wells einer 6-Loch-Platte verteilt und ü. N. bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen auf 10 cm Kulturschalen umgesetzt und in IL-3-haltiges Medium überführt. Zur Selektion wurde 48 Stunden nach der Transfektion Puromycin (Endkonzentration 1 µg/ml) hinzugefügt.

Die Effizienz der Transfektion konnte abschließend über eine Messung der GFP-Expression der Zellen am Durchflusszytometer festgestellt werden.

10.3 Wachstumsfaktor-Entzug

Interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors führen in IL-3 abhängigen Zelllinien wie 32D zu einer Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation (Hayakawa et al., 2000). Zellen, welche erfolgreich transfiziert wurden und eine aktivierende FLT3-Mutation exprimieren, sollten nach Wachstumsfaktor-Entzug überleben. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 48 bzw. 72 Stunden in Medium mit Wachstumsfaktor (IL-3) kultiviert und daraufhin zunächst eine Selektion mittels Puromycin durchgeführt. Anschließend erfolgte die Messung des Anteils der GFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer. Die Zellen wurden zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und anschließend in Medium ohne IL-3 kultiviert. Abschließend konnte die Apoptoserate mittels Durchflusszytometer bestimmt werden, wobei nur Zellen, die keine Expression des FLT3-ITD-Rezeptors zeigen, nicht überleben sollten.

10.4 Propidiumiodid-Messung im Durchflusszytometer

Der Anteil der apoptotischen Zellen nach IL-3-Entzug wurde mittels Propidiumiodid-Färbung im Durchflusszytometer nach 24h, 48h und 72h bestimmt.

Mit dem Durchflusszytometer lassen sich quantitative Aussagen über die Expression von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen und dem DNA-Gehalt von Zellen treffen. Zur Detektion von Oberflächenmolekülen werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, während die DNA-Messung über interkalierende Farbstoffe funktioniert. Das

Prinzip einer Messung am Durchflusszytometer beruht darauf, dass Zellen aus einer Suspension in eine Kapillare gesaugt werden und einzeln einen Laserstrahl passieren. Die Zellen streuen das Licht und emittieren, wenn sie markiert wurden, Fluoreszenzlicht, welches jeweils einzeln detektiert wird.

Die Lichtstreuung wird unterteilt in Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC – „*Forward Scatter*“; SSC- „*Sidewards Scatter*“), wobei die Vorwärtsstreuung vom Zellvolumen abhängt und die Seitwärtsstreuung von der Granularität der Zelle beeinflusst wird. Durch Markierung mit entsprechenden Farbstoffen können Zellen nach Anregung mit einem speziellen Laser fluoreszierendes Licht emittieren. Dieses kann am Durchflusszytometer gemessen werden um zum Beispiel den DNA-Gehalt von Zellen zu bestimmen. Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der in die DNA interkalieren kann und Fluoreszenz zeigt. Die Fluoreszenzintensität einer Zelle ist proportional zu ihrem DNA-Gehalt, welcher Aussagen zur Zellzyklusphase der Zelle zulässt. Während der Apoptose wird die DNA fragmentiert und teilweise von der Zelle ausgestoßen, sodass der DNA-Gehalt einer apoptotischen Zelle niedriger ist als der einer Zelle in der G1-Phase. Solche Zellen mit niedrigerem DNA-Gehalt befinden sich in der sogenannten sub-G1-Phase des Zellzyklus. Mit der DNA-Färbung lässt sich also der Anteil an apoptotischen Zellen in einer Population bestimmen.

Für die Propidium-Iodid-Färbung wurde 1 ml einer Zellkultur eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, der Überstand abgenommen und 300 µl PI-Puffer hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Messung des Anteils der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer.

10.5 Messung der GFP-Expression am Durchflusszytometer

In dieser Arbeit wurde der bicistronische Vektor pMSCV PIG verwendet. Dieser exprimiert neben der jeweiligen FLT3-Mutation gleichzeitig das Gen für ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP). Zwischen beiden Genen liegt eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES), sodass eine Expression des FLT3-Gens auch immer eine Expression des GFP-Gens zur Folge hat. Die Transkription beider Gene erfolgt zu einer gemeinsamen mRNA, aus welcher die zwei Proteine synthetisiert werden. Über die Messung der grünen Fluoreszenz einer Zellpopulation und somit der GFP-Expression am Durchflusszytometer kann man somit auch die Transfektionseffizienz bestimmen.

10.6 „Colony Count Assay“

Zur Bestimmung der proliferativen Aktivität von 32D-Zellen mit Expression des FLT3-WT- oder eines FLT3-ITD-Rezeptors, wurde ein „Colony Count Assay“ durchgeführt. Hierbei werden die Zellen in Medium ohne Wachstumsfaktor kultiviert, welches zusätzlich mit Methylcellulose versetzt ist. Durch die hohe Viskosität der Methylcellulose können die normalerweise konfluenten 32D-Zellen nicht durch das Medium wandern. Teilen sich die

Zellen, bilden sich dadurch makroskopisch sichtbare Kolonien. Anhand der Anzahl der gebildeten Kolonien lässt sich eine Aussage über die proliferative Aktivität der Zellen treffen.

Für den *Colony Count Assay* wurden jeweils 3000 Zellen in 900µl Medium aufgenommen, mit 2,4 ml Methylcellulose versetzt und jeweils 1 ml in ein Well einer 6-Loch-Platte ausgesät. Dieser Ansatz wurde bei 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für 7 Tage inkubiert. Abschließend wurden die Kolonien unter dem Mikroskop ausgezählt.

10.7 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Drei verschiedene FLT3-Inhibitoren, die auch in klinischen Studien zur Therapie der AML untersucht werden, wurden im 32D-Zellkulturmodell getestet.

Für diese Versuche wurden jeweils 5×10^6 Zellen in 5 ml Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Zu den Zellen wurde der jeweilige Inhibitor in der entsprechenden Konzentration hinzugefügt und für 4 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, welche nicht mit Inhibitor behandelt wurden. Zu diesen Zellen wurde ein äquivalentes Volumen an DMSO hinzugefügt, da die Inhibitoren in DMSO gelöst sind und sich eine zelltoxische Wirkung des DMSO mit dieser Kontrolle ausschließen lässt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend sofort lysiert. Die Ergebnisse wurden abschließend mittels Western Blot dokumentiert.

Es wurden folgende Endkonzentrationen der Inhibitoren eingesetzt:

PKC412 (Midostaurin) 10 nM, 50 nM, 100 nM

BAY 43-9006 (Sorafenib) 10 nM, 50nM, 100 nM

AC220 (Quizartinib) 20 nM, 50 nM, 100 nM

10.8 „siRNA-knockdown“

Durch Transfektion von Zellen mit einer für das Zielgen spezifischen „*small interfering RNA*“ (siRNA) kann man eine Verminderung der Expression dieses Gens erreichen. Die siRNA lagert sich an die jeweilige mRNA an und führt zu einem Abbau derselben. Dieses Verfahren wird in dieser Arbeit genutzt, um das transformierende Potential von internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei Expression in 32D-Zellen zu untersuchen.

32D-Zellen wurden mit einer FLT3-spezifischen siRNA und einer unspezifischen Kontroll-siRNA, welche mit Alexa 488 gekoppelt ist transfiziert. Hierfür wurden jeweils 1×10^6 Zellen geerntet, in 100 µl Puffer T resuspendiert und 10 µl der jeweiligen siRNA zugegeben. Die Mischung wurde in eine Elektroporationsküvette aufgenommen und bei folgenden Parametern elektroporiert: Pulsstärke 1700 V, Pulslänge 30 ms, 1 Impuls. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Medium aufgenommen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h und 48 h erfolgte eine PI-Messung am Durchflusszytometer zur Bestimmung der Apoptoserate. Zur Verifizierung des erfolgreichen „knockdowns“ wurden die Zellen nach 48 h geerntet. Lysiert und die Expression von FLT3 mittels Western Blot überprüft.

11. Proteinbiochemische Methoden

11.1 Herstellung von Proteinlysaten

Um zelluläre Proteine analysieren zu können, müssen die Zellen zunächst lysiert werden. Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zellulären Proteine und konnte bei -80°C gelagert werden.

11.2 Messung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode

Die photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford arbeitet mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Dieser kann sich an kationische und unpolare Seitenketten von Aminosäuren anlagern, woraufhin sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Im Spektralphotometer kann diese Änderung gemessen werden, wobei die Farbstoffintensität mit der Konzentration der Proteine im Lysat korreliert. Um genaue Angaben zur Proteinkonzentration von Proben machen zu können, wird stets eine standardisierte Verdünnungsreihe mit BSA mitgeführt.

Jeweils 2 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 200 µl Bio-Rad Dye Reagenz (1:4 mit Aqua dest. verdünnt) versetzt und anschließend in einem Absorptionslesegerät gemessen.

11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ein Gel auf Acrylamidbasis dient als Trägersubstanz um Proteine im elektrischen Feld aufzutrennen. Durch die Assoziation des Natriumdodecylsulfats (SDS) mit Proteinen, werden diese linearisiert und erhalten eine negative Ladung, sodass sie ein einheitliches Wanderungsverhalten im elektrischen Feld zeigen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrer Molmasse, wobei ein Marker mit Proteinen bekannter Molmasse als Vergleich mitgeführt wird. Bei der Durchführung der SDS-Page wurde stets in jeder Probe die gleiche Menge an Protein verwendet, um die Intensität der nach dem Western Blot sichtbaren Banden miteinander vergleichen zu können.

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE wurden jeweils 30 µg Protein mit 1/4 der Menge an 4-fachem Probenpuffer versetzt. Durch Zugabe von zweifach Probenpuffer, wurden die Proben auf ein gleiches Endvolumen eingestellt. Bei 95°C erfolgte für 5 min die Denaturierung der Proteine, sodass sich das SDS optimal anlagern konnte. In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE, bestehend aus einem Sammelgelanteil und einem

Trenngelanteil, angewendet. Auf dieses Gel wurden die Proben sowie der mitgeführte Größenmarker aufgetragen und für circa 2 Stunden bei 100 V die Elektrophorese in „MiniProtean II“-Systemen (Bio-Rad) durchgeführt.

11.4 Western Blot und Immunodetektion

Der Western Blot ist eine Methode um Proteine von einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen. Nach Beendigung der SDS-PAGE wird das Gel zwischen Whatman-Filterpapieren auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, mit Transferpuffer in ein Elektrophoresesystem gestellt und ü. N. bei 30 V geblottet.

Nach dem Blotten haften die Proteine an der Oberfläche der Nitrozellulosemembran und können nun mittels Immunodetektion sichtbar gemacht werden. Zunächst wird die Membran in „*Blocking-Puffer*“ inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper ü. N. auf dem Rollenmischer bei 4°C, welcher das gesuchte Antigen erkennt und bindet. Mit Waschpuffer wird überschüssiger Antikörper von der Membran entfernt und diese danach mit einem Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper erkennt und bindet an das IgG-Fragment des primären Antikörpers und ist seinerseits mit Peroxidase markiert. Gibt man die so behandelte Membran in Luminol-Lösung, katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol und löst somit eine sichtbare Chemolumineszenz aus. Diese kann über eine Kamera detektiert und anhand der Intensität quantifiziert werden.

Die Nitrozellulosemembran kann zum Detektieren weiterer Proteine genutzt werden, wenn man mittels eines „*Stripping-Puffers*“ die bereits gebundenen Antikörper wieder entfernt. Hierfür wird die Membran für 20 min bei 50°C auf dem Schüttler in „*Stripping-Puffer*“ inkubiert, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend erneut eine Stunde mit „*Blocking-Puffer*“ geblockt. Danach kann wie oben beschrieben weiter verfahren werden.

12. Statistik

Um Grafiken zu erstellen und zu analysieren wurde das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc La Jolla, CA) verwendet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem nonparametrischen T-Test (Mann-Whitney-Test) bestimmt. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde in allen Analysen als signifikant betrachtet.

Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der FloJo-Software (Treestar Inc., Ashland, OR) analysiert.

III Ergebnisse

1. Identifikation von internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei Patienten mit AML

Von Patienten, die an einer akuten myeloischen Leukämie litten und sich in der Klinik für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikum Magdeburgs in Behandlung befanden, wurden Blutproben und Knochenmarksbiopsien gewonnen. Alle Patienten waren volljährig und erklärten sich nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung schriftlich damit einverstanden, dass diese Proben für wissenschaftliche Zwecke genutzt werden konnten. Die Durchführung aller Experimente dieser Arbeit erfolgte nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki (World Medical Association) und wurde durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Magdeburg überprüft und freigegeben. Alle hier untersuchten Proben wurden im Rahmen der von der Klinik für Hämatologie und Onkologie durchgeführten HILIFE-Studie zur „Untersuchung onkogener Signaltransduktionswege bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und bei myeloproliferativen Syndromen (MPS)“ gewonnen.

Ziel der Untersuchungen war es, in ausgewählten Patienten neue interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors, speziell in der non-juxtamembranären Domäne, zu identifizieren. Auf das Vorhandensein einer non-JM-ITD wurden Blutproben von neun Patienten, welche FLT3-ITD positiv getestet waren, untersucht. Hierfür wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark gewonnen, mRNA extrahiert, diese in cDNA umgeschrieben und eine PCR mit den Primern *XhoI* forward und *XhoI* reverse durchgeführt.

Diese Primer amplifizieren einen Bereich des *FLT3*-Gens, der die Basen 875-2499 umfasst. In diesem Bereich des Gens liegt auch die Tyrosinkinase-Domäne des FLT3-Rezeptors und somit der die Mutation tragende Abschnitt (Abbildung 5A). Die *XhoI*-Fragmente von FLT3 wurden in den pCR4[®] TOPO-Vektor zwischenkloniert und zur Sequenzierung eingeschickt (Abbildung 5B).

Bei einem der untersuchten Patienten konnte eine non-JM-ITD des FLT3-Rezeptors nachgewiesen und als FLT3-ITDF612LGS (17) identifiziert werden. In diesem Fall umfasst die interne Tandemduplikation 17 Basenpaare und neben einem Aminosäureaustausch an der Insertionsstelle der ITD von Phenylalanin (F) nach Leucin (L) wurden zwei zusätzliche Aminosäuren, Glycin und Serin, vor der Insertion der ITD eingeschoben. Der Austausch von Aminosäuren und die Insertion zusätzlicher Basenpaare durch die Integration einer internen Tandemduplikation sind bereits beschrieben worden (Kayser et al., 2009).

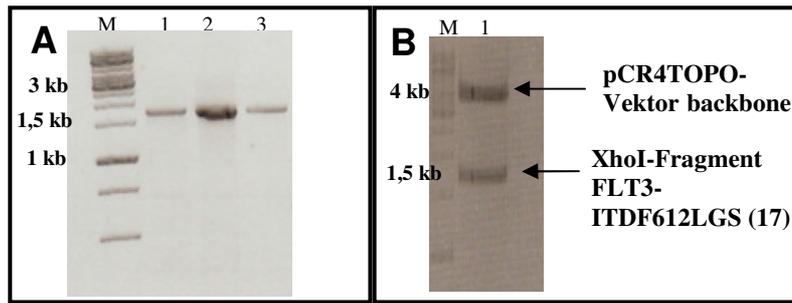


Abbildung 5 A: Gelelektrophorese des PCR –Amplifikates; Als Matrize wurde cDNA, welche aus Patientenmaterial synthetisiert wurde, eingesetzt.

M: Größenstandard

1-3: *XhoI*-Fragment FLT3-ITDF612LGS (17)

B: Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau mit XhoI

Der Vektor pCR4TOPO FLT3-ITDF612LGS (17) wurde mittels *XhoI*-Restriktionsenzym verdaut. M: Größenstandard; 1: Vektorfragmente nach Verdau

Des Weiteren fiel bei der Sequenzierung eine Punktmutation im Bereich der Basen 679-681 auf, welche in einem Aminosäureaustausch von Threonin nach Methionin resultierte. Diese Mutation wurde mittels ortsgerechter Mutagenese zur ursprünglichen Basenfolge zurück mutiert, um einen eventuellen Einfluss dieses Aminosäureaustauschs auf die Ergebnisse auszuschließen.

In allen anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenproben ließen sich lediglich Mutationen in der JM-Domäne des FLT3-Rezeptors nachweisen.

In der Arbeitsgruppe Hämatologie/ Onkologie wurden bei weiteren Untersuchungen von Patientenmaterial zusätzlich andere non-JM FLT3-ITD Mutationen gefunden, von denen zwei in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurden. Es handelt sich hierbei um die Mutationen FLT3-ITDG613E (33) und FLT3-ITDE611V (32) im β 1-Faltblatt des Rezeptors. Abbildung 6 gibt einen Überblick über Insertionsstellen und Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen.

Um einen besseren Vergleich zwischen non-JM FLT3-ITDs und JM FLT3-ITDs zu haben, wurde außerdem eine weitere Mutation in der juxtamembranären Domäne des FLT3-Rezeptors mitgeführt. Hierbei handelt es sich um die Mutation FLT3-ITDK602R (7).

Zur Erklärung der Nomenklatur der in dieser Arbeit untersuchten FLT3-ITDs folgen nun einige Erläuterungen. Durch die Zahl wird die Aminosäure in der Proteinstruktur des FLT3-Rezeptors angegeben, bei welcher die ITD eingeschoben wird. Die Zahl in Klammern gibt jeweils die Anzahl an zusätzlichen Aminosäuren an, welche durch Insertion der ITD entstehen. Durch die Mutationen kommt es an der Stelle der ITD-Insertion zu einem Aminosäureaustausch, der durch die Buchstaben vor und hinter der Positionsangabe deutlich gemacht wird.

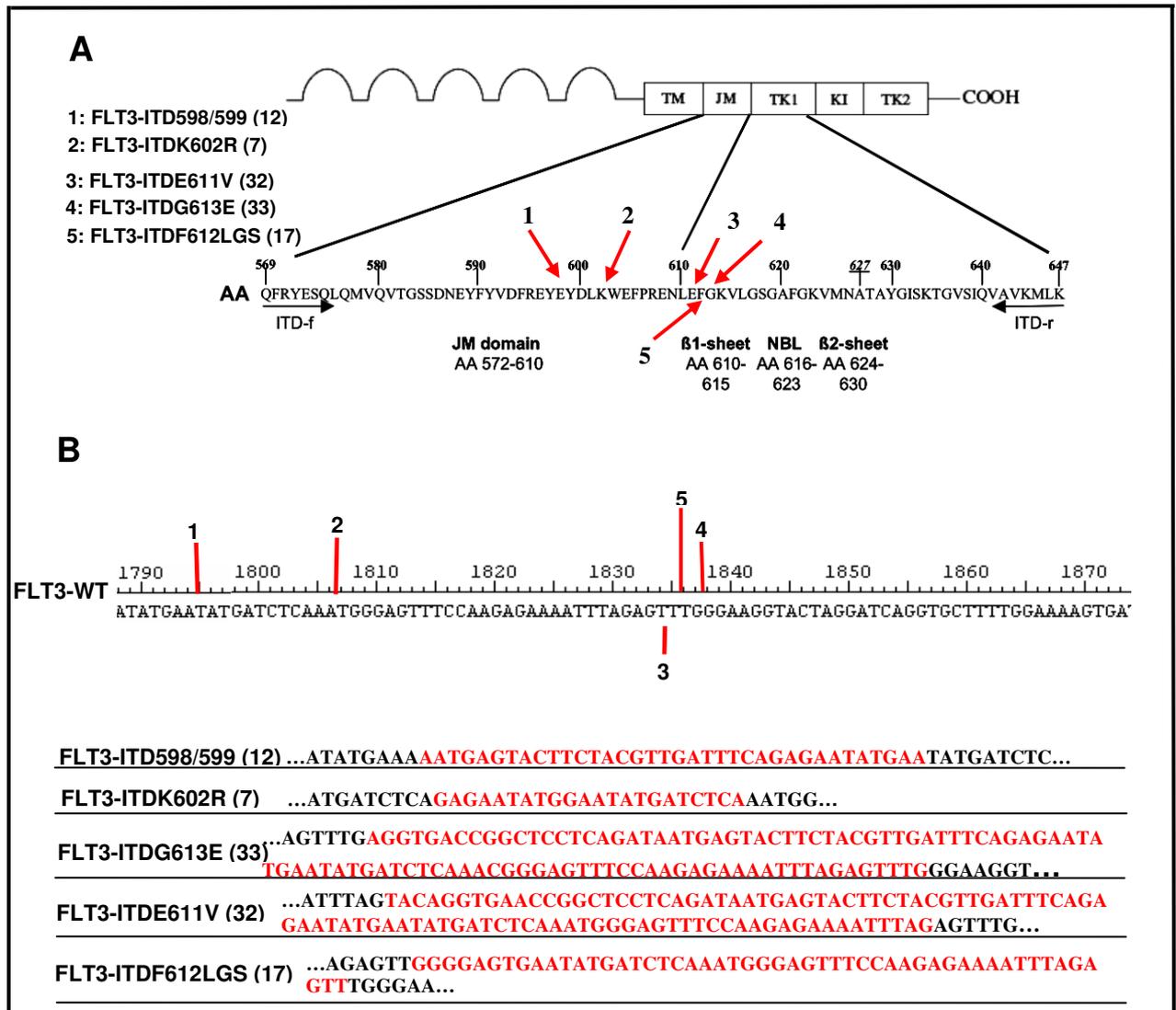


Abbildung 6: Schema des FLT3-Rezeptors und Insertion der FLT3-ITDs

A: FLT3-Rezeptor schematisch (nach Breitenbücher et al., 2009)

TM= transmembranäre Domäne; JM= juxtamembranäre Domäne; TK1/ 2= Tyrosinkinase-Domäne 1/ 2; KI= Kinase-Insert; Gezeigt sind die Insertionsstellen der verschiedenen FLT3-ITDs innerhalb der Aminosäuresequenz des FLT3-Rezeptors.

B: Insertionsstellen verschiedener FLT3-ITDs

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Basenfolge des FLT3-Gens und die Insertionsstellen der internen Tandemduplikationen innerhalb des Gens. Darunter sind Ausschnitte aus den Sequenzen der FLT3-ITD598/599 (12), FLT3-ITDK602R (7), FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDE611V (32) und FLT3-ITDF612LGS (17) abgebildet.

2. Stabile Expression von FLT3-ITDs in 32D-Zellen

2.1. Klonierungsstrategie FLT3-ITDF612LGS

Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit war es, eine stabile Expression der FLT3-Mutationen FLT3-ITDF612LGS (17), FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDE611V (32) und FLT3-ITDK602R (7) in 32D-Zellen zu erreichen. Als Vergleich sollten die bereits beschriebene FLT3-ITD598/599 (12) und der FLT3-WT-Rezeptor mitgeführt werden. Auch diese

Konstrukte sollten stabil in 32D-Zellen transfiziert werden. Alle Konstrukte lagen zu Beginn dieser Arbeit in dem retroviralen Expressionsvektor PIG_IRES_GFP vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich das Konstrukt pMSCV PIG FLT3-ITDF612LGS (17) neu generiert. Zunächst wurde mittels PCR mit FLT3-spezifischen Primern der FLT3-WT Rezeptor aus dem Template pAL FLT3-WT, welches bereits zu Beginn der Arbeit vorlag, amplifiziert. Die PCR wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und das Produkt aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 7A). Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit dem „Topo Cloning Kit“ (Invitrogen) in den pCR4-Vektor subkloniert und die Ligation mittels *HpaI*-Verdau und Gelelektrophorese überprüft (Abb. 7B).

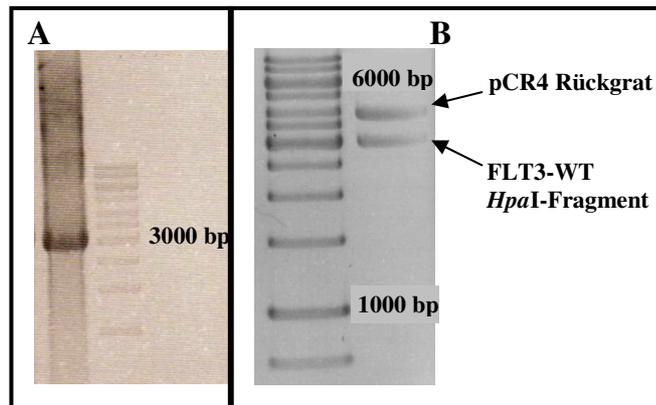


Abbildung 7A: Gelelektrophorese der PCR (FLT3-WT in pAL) mit *HpaI* for/*HpaI* rev

Es wurde eine PCR mit der HiFiTaq und den Primern *HpaI* for/rev auf das Plasmid FLT3-WT im pAL-Vektor durchgeführt. Das Ergebnis ist hier mittels Gelelektrophorese dargestellt. Das PCR-Produkt wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

B: Restriktionsverdau pCR4 FLT3-WT mit *HpaI*

Das Plasmid pCR4 FLT3-WT wurde mit der Restriktionsendonuklease *HpaI* restringiert um die zuvor erfolgte Ligation zu überprüfen.

Das Plasmid pCR4 FLT3-WT wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* verdaut, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. So konnte das Vektor-Rückgrat ohne das *XhoI*-Fragment isoliert werden. Im Anschluss erfolgte die Ligation mit dem zuvor aufgereinigten FLT3-ITDF612LGS (17) *XhoI*-Fragment. Nach der Ligation wurde das generierte Plasmid, das nun die FLT3-ITDF612LGS (17) in gesamter Länge enthält, in *E. coli* transformiert. Es erfolgte die Plasmidpräparation und anschließend ein Restriktionsverdau des Plasmids mit *XhoI*. Die Überprüfung des Restriktionsverdaus mittels Gelelektrophorese ergab ein 1,6 kb großes *XhoI*-Fragment und ein etwa 6 kb großes Fragment, welches dem pCR4-Vektor mit der Restsequenz des *FLT3*-Gens entspricht (Abb. 8).

Das Plasmid pCR4 FLT3-ITDF612LGS (17) wurde zur Sequenzierung eingeschickt, um zu überprüfen, ob das *XhoI*-Fragment der FLT3-ITDF612LGS (17) in der richtigen Orientierung in das Vektor-Rückgrat eingebaut wurde. Nachdem dies bestätigt worden war, wurde dieses Plasmid für die weiteren Experimente verwendet.

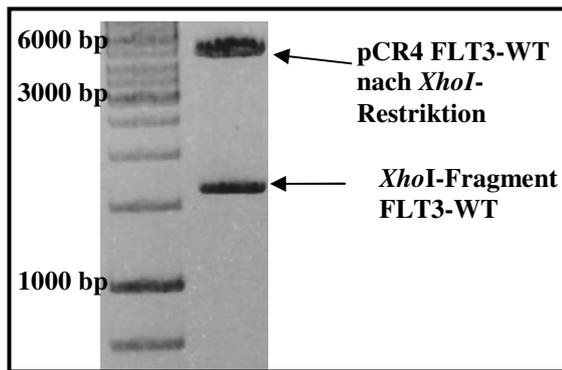


Abbildung 8: Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau mit *XhoI*

Nach dem Restriktionsverdau von pCR4 FLT3-WT mit *XhoI* wurde das Rückgrat des Vektors ausgeschnitten und für die Ligation mit dem *XhoI*-Fragment der FLT3-ITDF612LGS (17) eingesetzt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Klonierung der FLT3-ITDF612LGS (17) in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV PIG mittels des InFusion[®]HD Kloning Kit (Clontech). Dieses Kit ermöglicht es mittels des „In-Fusion“-Enzyms, PCR-Produkte direkt mit linearisierten Vektoren zu ligieren. Das InFusion Kit benötigt speziell konstruierte Primer, welche PCR-Produkte erzeugen müssen, die einen Überhang von 15 Basenpaaren an ihrem 5'-Ende haben, welche mit der Sequenz des linearisierten Vektors übereinstimmen. Am 3'-Ende müssen die Primer eine Sequenz enthalten, die spezifisch für das Zielgen, hier *FLT3*, ist.

Mit den Primern PIG *BglIII* forward und PIG *XhoI* reverse wurde eine PCR mit dem Plasmid pCR4 FLT3-ITDF612LGS (17) als Matrize durchgeführt. Diese wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, das PCR Produkt aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt und für die Klonierung mit dem InFusion-Kit verwendet. Der pMSCV PIG-Vektor wurde zuvor mit den Restriktionsemzymen *BglIII* und *XhoI* linearisiert. Der Verdau wurde ebenfalls mittels Gelelektrophorese überprüft, der linearisierte Vektor aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Nach erfolgter Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli*-Zellen wurde wiederum eine Plasmidpräparation durchgeführt und das Plasmid zur Sequenzierung eingeschickt. Die Sequenzierung zeigte, dass die FLT3-ITDF612LGS (17)-Sequenz nicht korrekt im pMSCV-Vektor vorlag. Aus Zeitgründen konnte eine erfolgreiche Insertion der FLT3-ITDF612LGS (17) im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erreicht werden, sodass diese Mutation nicht weiter untersucht werden konnte.

Die Plasmide pMSCV PIG FLT3-WT, pMSCV PIG FLT3-ITD598/599 (12), pMSCV PIG FLT3-ITDG613E (33), pMSCV PIG FLT3-ITDE611V (32) und pMSCV PIG FLT3-ITDK602R (7), welche in der Arbeitsgruppe Hämatologie/Onkologie bereits vorlagen, sind in dieser Arbeit mittels retroviraler Transduktion in 32D-Zellen eingebracht worden.

2.2 Retrovirale Transduktion von 32D-Zellen

Aus murinen myeloischen Knochenmarkszellen wurde die IL-3 abhängige Zelllinie 32D generiert, welche sich als Modell zur Untersuchung von Onkogenen etabliert hat (Hayakawa

et al., 2000). Nach Transfektion der Zellen mit Genen, welche ein transformierendes Potential haben, proliferieren diese Zellen Wachstumsfaktor-unabhängig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels retroviraler Transduktion die stabile Expression von vier internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors in 32D-Zellen erreicht. Es handelt sich hierbei einerseits um zwei Mutationen in der juxtamembranären Domäne des FLT3-Rezeptors, FLT3-ITD589/599 (12) und FLT3-ITDK602R (7) und andererseits um zwei Mutationen in der non-juxtamembranären Domäne FLT3-ITDG613E (33) und FLT3-ITDE611V (32). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem wildtypischen FLT3-Rezeptor transfiziert und bei allen Experimenten mitgeführt.

Die Transfektionseffizienz konnte mittels Detektion der GFP-Expression im Durchflusszytometer bestimmt werden, da die verwendeten pMSCV-Vektoren bicistronische Vektoren sind, die neben dem zu untersuchenden Gen auch für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) codieren. Da zwischen beiden Genen eine IRES-Sequenz (interne Ribosomen-Eintrittsstelle) liegt, werden sie stets gemeinsam transkribiert. Daraus folgt, dass jede Zelle die FLT3 exprimiert auch GFP exprimiert. Der Prozentsatz an GFP-positiven Zellen entspricht somit auch den erfolgreich mit FLT3 transfizierten Zellen.

2.3 Selektion positiv transfizierter Zellen

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pMSCV PIG enthält neben dem GFP-Gen auch ein Gen, welches für eine Puromycin-Resistenz kodiert. Somit sollten alle 32D-Zellen, welche positiv mit dem pMSCV PIG Vektor transfiziert wurden, resistent gegen Puromycin sein. Diese Tatsache kann man zur Selektion der positiv mit FLT3-WT transfizierten Zellen nutzen, da diese Zellen, anders als die FLT3-ITD positiven Zellen, nicht über einen Wachstumsfaktorentzug selektioniert werden können, da sie IL-3 zur Proliferation benötigen.

Die Selektion erfolgte 48 Stunden nach der Transduktion der 32D-Zellen durch Zugabe von 1 µg/ml Puromycin bzw. durch IL-3-Entzug. Nur die positiv transfizierten Zellen, welche das Puromycin-Resistenzgen tragen oder eine FLT3-ITD exprimieren, können weiterhin proliferieren, während die nicht erfolgreich transfizierten Zellen apoptotisch werden.

Mittels Messung der GFP-Expression im Durchflusszytometer konnte man den Erfolg der Selektion überprüfen. Während der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen 48 h nach der Transfektion relativ gering war, stieg dieser nach Selektion mit Puromycin oder durch Wachstumsfaktorentzug an, da die positiv transfizierten Zellen unter diesen Bedingungen einen Proliferationsvorteil gegenüber den Zellen ohne Resistenzgen bzw. FLT3-ITD haben. Innerhalb einer Woche konnte eine Zunahme der GFP-positiven Zellen auf ca 99 % beobachtet werden.

In Abbildung 9 ist der Prozentsatz GFP-positiver Zellen vor und nach der Selektion mit Puromycin bzw. dem Wachstumsfaktorentzug dargestellt.

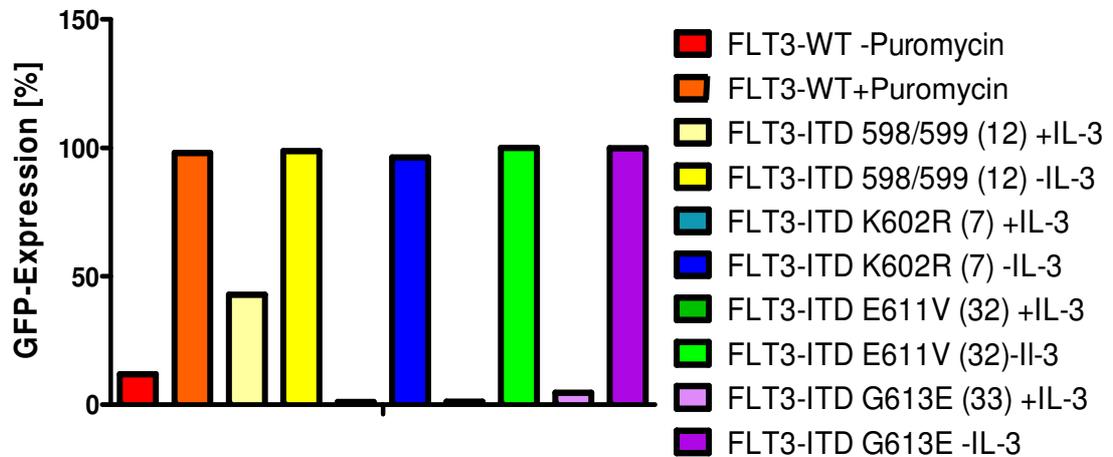


Abbildung 9: GFP-Expression der 32D-Zellen vor und nach Selektion

Die GFP-Messungen im Durchflusszytometer erfolgten 48 h nach retroviraler Transduktion der Zellen bzw. 7 Tage nach Selektion mittels Puromycin bzw. IL-3-Entzug. Dargestellt sind repräsentative Messungen für die einzelnen Zelllinien.

2.4 Verifizierung der Sequenzen der FLT3-ITDs in 32D-Zellen

Vor Beginn der Experimente wurde die Expression der Mutationen des FLT3-Rezeptors in den verschiedenen Zelllinien verifiziert. Mittels der Trizol-Methode erfolgte zunächst die Präparation von mRNA aus den transfizierten 32D-Zellen. Anschließend wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt. Mit der cDNA als Matrize wurde eine PCR des gesamten *FLT3*-Gens durchgeführt. Mittels Agarosegelelektrophorese konnten die erhaltenen PCR-Fragmente aufgetrennt werden. Für jede Zelllinie zeigte sich ein PCR-Fragment bei 3,6 kb, welches der Größe des *FLT3*-Gens entspricht. Die PCR-Produkte wurden anschließend zur Sequenzierung eingeschickt, sodass die Sequenz der jeweiligen FLT3-ITD bestätigt werden konnte.

3. Untersuchung des transformierenden Potentials der FLT3-ITDs

3.1 Die Expression von FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDK602R (7), FLT3-ITD598/599 (12) und FLT3-ITDE611V (32) vermittelt wachstumsfaktor-unabhängige Kolonienbildung und Apoptoseresistenz in 32D-Zellen

Nakao et al. entdeckten 1996 erstmals Mutationen des *FLT3*-Gens bei AML, die sie als interne Tandemduplikationen beschrieben. Weitere Untersuchungen der FLT3-ITDs konnten zeigen, dass es sich hierbei um aktivierende Mutationen handelt, die zu einer konstitutiven

Phosphorylierung des Rezeptors führen (Kiyoi et al., 1998) und Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation von IL-3-abhängigen Zellen vermitteln (Hayakawa et al., 2000). Zur Untersuchung des transformierenden Potentials von FLT3-ITD-Mutationen wurde zunächst das Kolonien-bildende Potential der FLT3-ITD transduzierten 32D-Zellen mittels „Colony Count Assay“ in Methylzellulose ohne Wachstumsfaktor durchgeführt. Methylzellulose weist eine hohe Viskosität auf, sodass die Zellen sich während der Proliferation nicht auf der Zellkulturschale ausbreiten, sondern sogenannte „Kolonien“ formen. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem wildtypischen Rezeptor IL-3-haltiger Methylzellulose mitgeführt.

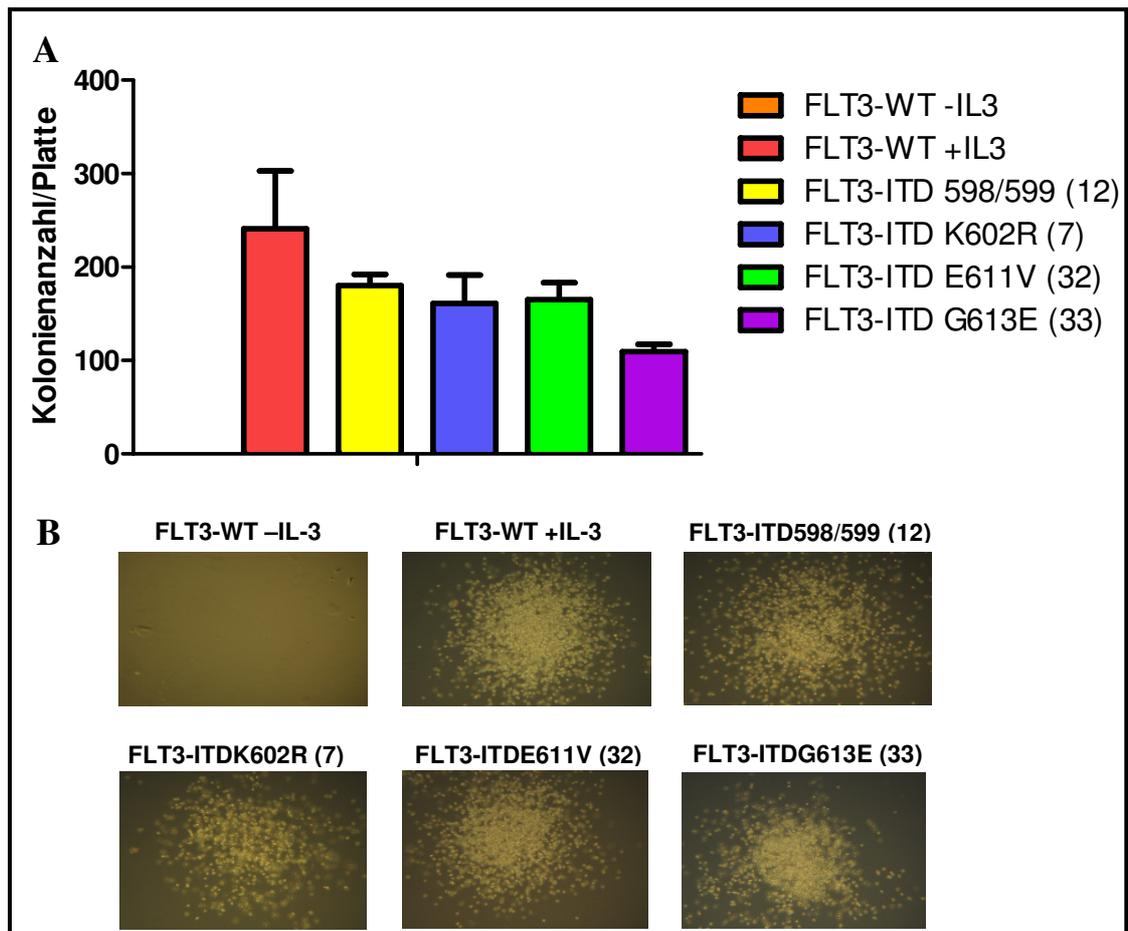


Abbildung 10: Untersuchung des Kolonien-bildenden Potentials („Colony Count Assay“)

Es wurden jeweils 3000 Zellen in Triplikaten in Methylzellulose ausplattiert und die Kolonien nach 5 Tagen ausgezählt. Zellen, die eine FLT3-ITD exprimieren, wurden in Medium ohne Wachstumsfaktor (IL-3) kultiviert, während Zellen, welche mit dem FLT3-WT-Rezeptor stabil transfiziert wurden sowohl in Medium mit als auch ohne IL-3 ausgesät wurden.

A: Der Mittelwert mit Standardabweichung der Kolonienanzahl pro Platte ist dargestellt (n=3). Zellen mit Expression des FLT3-WT-Rezeptors zeigten keine Koloniebildung

B: Fotos einzelner repräsentativer Kolonien

In Abbildung 10 A ist die Anzahl der nach 5 Tagen gewachsenen und ausgezählten Kolonien dargestellt. Eine Kolonienbildung in Medium ohne IL-3 war nur bei Zellen, welche eine FLT3-ITD exprimieren, zu beobachten. 32D-Zellen, welche den wildtypischen FLT3-Rezeptor exprimieren, konnten nur in Medium mit IL-3 Kolonien bilden. Diese Ergebnisse zeigen, dass nur Zellen, welche FLT3-ITD positiv sind, wachstumsfaktor-unabhängig Kolonien bilden können und die FLT3-ITD somit zu einer Transformation der 32D-Zellen führt.

Weiterhin wurden Fotos der Kolonien, welche in Methylzellulose gewachsen waren, gemacht (Abbildung 10 B). Gezeigt sind hier jeweils repräsentative Bilder.

Als weiterführende Untersuchung des transformierenden Potentials der FLT3-ITDs, wurde den transfizierten 32D-Zellen der Wachstumsfaktor IL-3 entzogen. Lediglich Zellen, die eine FLT3-ITD tragen, sollten unter diesen Bedingungen eine Apoptoseresistenz zeigen, während FLT3-WT-Zellen absterben. Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde 24 und 48 Stunden nach IL-3-Entzug mittels PI-Messung am Durchflusszytometer erhoben.

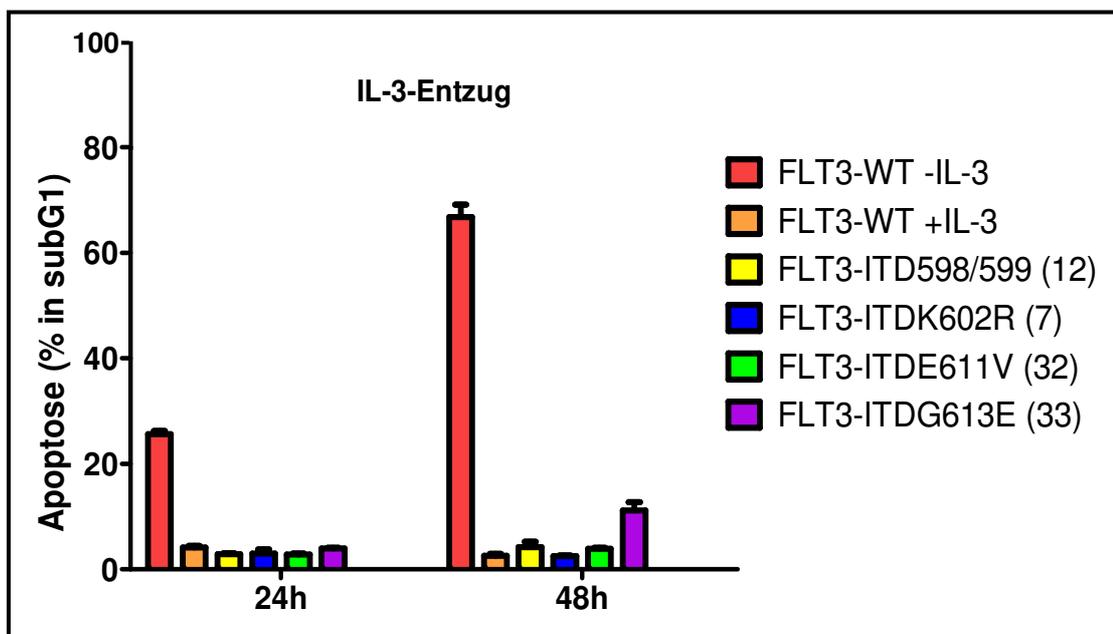


Abbildung 11: Apoptoseresistenz von FLT3-ITD positiven Zellen nach Entzug von IL-3

Alle Zellen wurden dreifach mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in Medium ohne IL-3 resuspendiert. Es wurden jeweils 30000 Zellen/ml in 4 ml Medium in 6-Loch-Platten in Triplikaten ausgesät und nach 24 bzw. 48 h mit Propidiumiodid gefärbt. Dargestellt ist der Anteil an PI-positiven Zellen, welcher mittels Messung im Durchflusszytometer ermittelt wurde. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit dem wildtypischen FLT3-Rezeptor in Medium mit IL-3 mitgeführt.

Aus Abbildung 11 kann man entnehmen, dass Zellen mit dem wildtypischen FLT3-Rezeptor nach Wachstumsfaktorentzug in Apoptose gehen, während die 32D-Zellen mit FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDE611V (32), FLT3-ITDK602R (7) und FLT3-ITD598/599 (12) nach Wachstumsfaktorentzug überleben. Bereits 24 h nach Wachstumsfaktorentzug betrug

der Anteil an apoptotischen Zellen beim FLT3-WT 25,6 %. Dieser Anteil stieg 48 h nach Beginn des Wachstumsfaktorentzuges auf 66,7 % an. Im Gegensatz dazu blieb der Anteil an PI-positiven Zellen bei Expression von FLT3-ITD auch nach 48 h unter maximal 11,8 % (FLT3-ITDG613E (33)).

Diese beiden Experimente zeigen, dass die Expression einer internen Tandemduplikation des FLT3-Rezeptors in 32D-Zellen eine Wachstumsfaktor-unabhängige Kolonienbildung und Apoptoseresistenz vermittelt.

3.2 Einfluss von internen Tandemduplikationen auf die Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors

Der FLT3-Rezeptor liegt im inaktiven Zustand als unphosphoryliertes Monomer vor und erst nach Aktivierung durch Bindung des FLT3-Liganden (FL) erfolgt die Dimersierung und Transphosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne (Dasil et al., 1993; Zhang und Broxmeyer, 2000). Interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors führen zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung und konstitutiven Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie zur Aktivierung von verschiedenen „downstream“ Signalwegen des Rezeptors (Kiyoi et al., 1998).

Die konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors und seiner „downstream“ Signalwege sollte in dieser Arbeit für die verschiedenen internen Tandemduplikationen untersucht werden. Als Vergleich dienten einerseits Zellen mit dem FLT3-WT-Rezeptor und andererseits Zellen mit der bereits ausführlich charakterisierten FLT3-ITD598/599 (12). Dafür wurde zunächst im Western Blot die Expression des FLT3-Rezeptors in den verschiedenen Zelllinien überprüft.

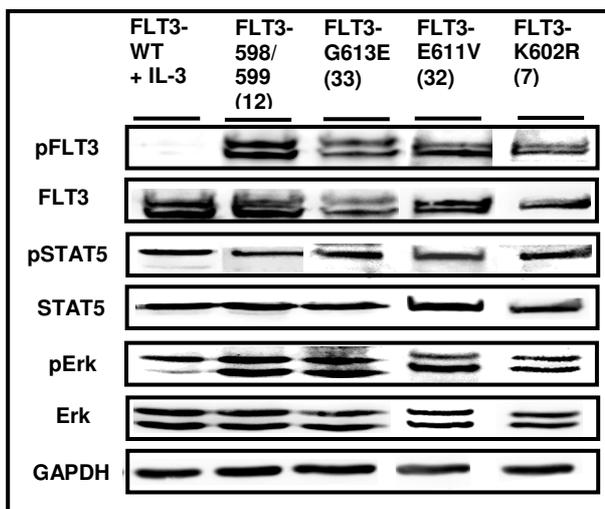


Abbildung 12: Phosphorylierung von FLT3 und „downstream“ Signalwegen in 32D-Zellen

Die Zellen wurden bis auf den FLT3-WT in Medium ohne IL-3 gehalten, lysiert und jeweils die gleiche Menge Protein für den Western Blot eingesetzt. Der Proteinnachweis erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern. Anschließend wurde die Membran „gestrippt“ und mit Antikörpern gegen das jeweilige Gesamtprotein inkubiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Weiterhin wurde der Phosphorylierungsstatus der verschiedenen FLT3-ITD-Rezeptoren untersucht. Es zeigte sich, dass auch ohne Stimulation durch Wachstumsfaktoren eine konstitutive Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors in allen untersuchten Zelllinien mit einer internen Tandemduplikationen nachweisbar ist (Abbildung 12). Zellen, welche den wildtypischen FLT3-Rezeptor exprimieren, wurden stets in Medium mit IL-3 kultiviert. Im Western Blot sieht man bei diesen Zellen keine Phosphorylierung von FLT3, aber eine Phosphorylierung von STAT5 und Erk, welche jedoch nicht durch den FLT3-Rezeptor, sondern über andere, IL-3-gesteuerte Signalwege, verursacht wird.

Zwischen non-juxtamembranären ITDs und juxtamembranären ITDs ist in der Menge des detektierbaren FLT3-Proteins im Western Blot sowie der phosphorylierten „downstream“ Signalwege kein wesentlicher Unterschied sichtbar.

Interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors führen zu einer wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation im Zellkulturmodell und erzeugen eine myeloproliferative Erkrankung im Mausmodell (Kelly et al., 2002). Dies wird über verschiedene Signalwege „downstream“ des FLT3-Rezeptors vermittelt, von denen einige in dieser Arbeit untersucht wurden.

Ein für das transformierende Potential der FLT3-ITDs wesentliches Signalmolekül ist STAT5, welches hier im Gegensatz zum ligandenstimulierten wildtypischen Rezeptor aktiviert ist (Hayakawa et al., 2000). Weiterhin spielt die Signalkaskade des Ras/Raf/Mek/Map-Kinase Signalweges eine wichtige Rolle in der FLT3 vermittelten mitogenen Signalgebung (Zhang, Mantel und Broxmeyer, 1999).

Abbildung 12 gibt die Detektion der phosphorylierten Proteine im Zelllysate mittels phosphospezifischen Antikörpern wieder. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung erfolgte nach dem „Strippen“ der Membran die Detektion des jeweiligen Gesamtproteins.

Bei allen untersuchten FLT3-ITDs konnte eine konstitutive Phosphorylierung und damit Aktivierung dieser Moleküle im Western Blot nachgewiesen werden.

3.3 „Knockdown“ des mutierten FLT3-Rezeptors führt zum Verlust der Apoptose-Resistenz in 32D-Zellen

Um zu zeigen, dass die FLT3-Mutation der verantwortliche Faktor für die Transformation der 32D-Zellen ist, wurde ein „Knockdown“ des *FLT3*-Gens mittels spezifischer siRNA durchgeführt. Hierbei werden die 32D-Zellen mittels Mikroporation mit einer FLT3-spezifischen siRNA transfiziert. Dadurch kommt es zur verminderten Expression des *FLT3*-Gens, da die siRNA mit der FLT3-spezifischen mRNA interferiert und einen Abbau der mRNA verursacht, bzw. die Translation in ein Protein verhindert. Als Kontrolle wurde eine sogenannte „scrambled“ siRNA mitgeführt, welche eine Sequenz hat, für die keine

Homologie im Genom bekannt ist. Auf diese Weise kann man zeigen, dass der Zellstoffwechsel nicht durch die Methode der siRNA-Transfektion wesentlich beeinflusst wird, sondern allein der „knockdown“ des Zielgens für die gesehenen Effekte verantwortlich ist.

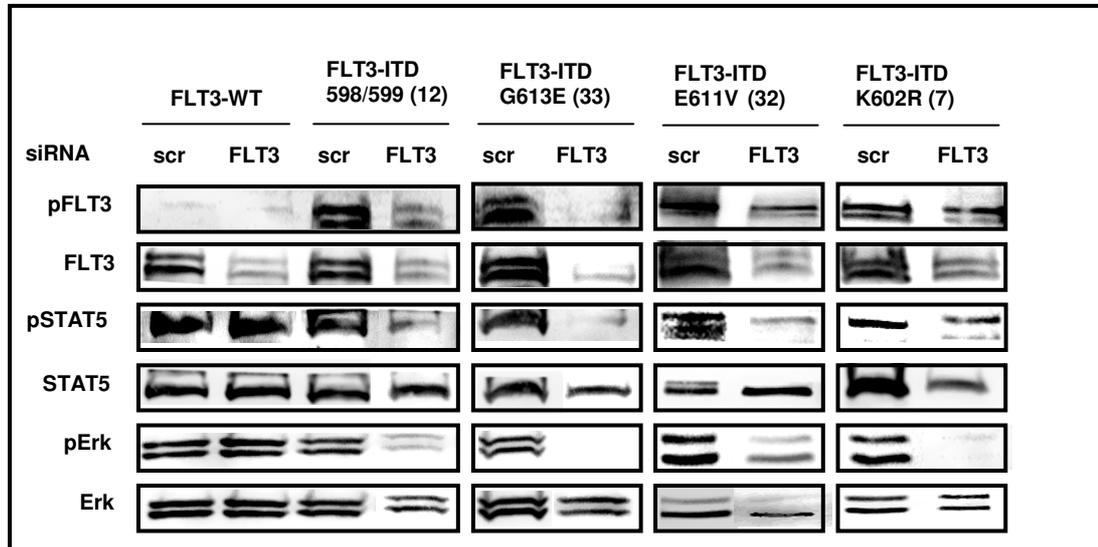


Abbildung 13: Western Blot nach siRNA-„knockdown“ von FLT3

Die Zelllinien wurden mit FLT3-siRNA oder mit Kontroll-siRNA (scrambled) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Zellysate hergestellt, die Proteine extrahiert und ein Western Blot durchgeführt. Es wurde jeweils die gleiche Menge an Protein für alle Zelllinien verwendet.

Die Überprüfung des erfolgreichen „knockdowns“ von FLT3 wurde mittels Western Blot durchgeführt. Hier zeigte sich, dass bei einer Transfektion von „scrambled“ siRNA weiterhin FLT3-Protein nachweisbar ist. Nach der Transfektion mit FLT3-spezifischer siRNA war eine deutliche Reduzierung der FLT3-Expression sichtbar (Abbildung 13). Weiterhin wurde in den FLT3-defizienten Zellen auch die Phosphorylierung von Zielmolekülen wie STAT5 und Erk reduziert.

Somit konnte gezeigt werden, dass die FLT3-ITD der für die konstitutive Aktivierung von STAT5 und Erk in den 32D-Zellen verantwortliche Faktor ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die interne Tandemduplikation des FLT3-Rezeptors auch für die Apoptoseresistenz der Zellen verantwortlich ist. 48 Stunden nach Transfektion der FLT3-spezifischen siRNA zeigten diese Zellen eine Apoptoserate von etwa 80 %, während Zellen, welche mit „scrambled“ siRNA transfiziert wurden nur eine Apoptoserate von rund 25 % zeigten (Abbildung 14).

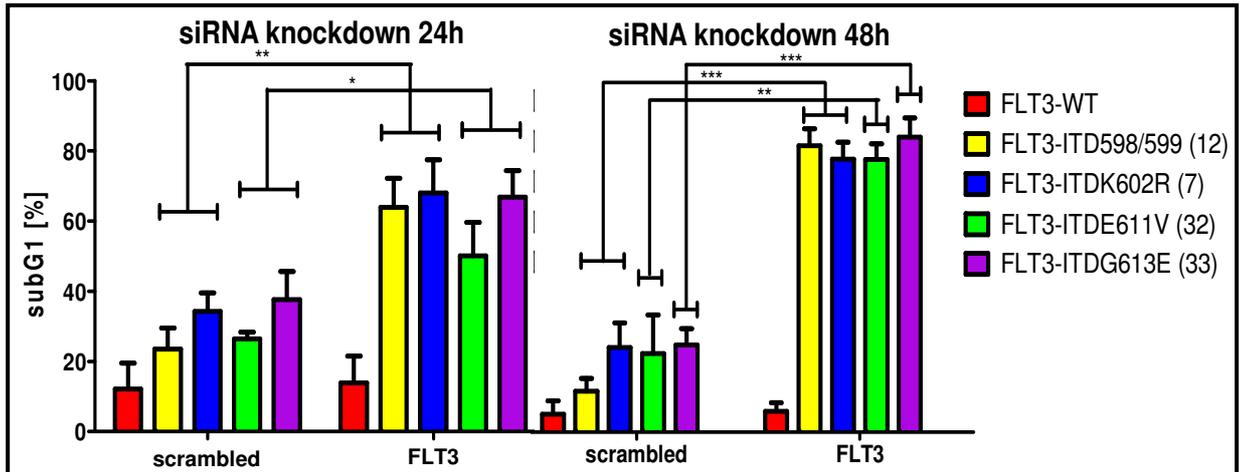


Abbildung 14: siRNA-„knockdown“ des *FLT3*-Gens in 32D-Zellen

Jeweils 24 und 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit siRNA wurde 1 ml Zellsuspension mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der Anteil an PI positiven Zellen, welche sich in der subG1-Phase des Zellzyklus befinden.

4. Untersuchung von aktivierten Signalmolekülen nach Inkubation mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs)

Mutationen im FLT3-Rezeptor spielen in der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie eine wichtige Rolle. Dies wurde als Ansatzpunkt für die Entwicklung gezielter Therapiestrategien genutzt, wodurch Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) im Rahmen von klinischen Studien ihren Einzug in das Therapieregime der AML hielten. Mittels TKIs ist eine gezielte Hemmung der dysregulierten Kinaseaktivität möglich. Besondere Bedeutung haben diese Medikamente für Patienten, die positiv auf eine interne Tandemduplikation des FLT3-Rezeptors getestet wurden, da sie auf konventionelle Chemotherapeutika besonders schlecht ansprechen.

Von den TKIs der ersten Generation wurden in dieser Arbeit Midostaurin (PKC412) und Sorafenib (Bay 43-9006) verwendet. In den letzten Jahren wurden zusätzlich Inhibitoren spezifisch zur Hemmung des FLT3-Rezeptors entwickelt. In dieser Arbeit wurde Quizartinib (AC220), als Vertreter der TKIs der zweiten Generation eingesetzt.

Alle in den vorherigen Kapiteln beschriebenen FLT3-ITD-Mutationen wurden auf Signaltransduktionsebene hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber diesen TKIs untersucht.

4.1. Inhibition der Signaltransduktion durch PKC412 (Midostaurin)

PKC412 ist ein Staurosporin-Derivat, welches ursprünglich als Inhibitor der Proteinkinase C entwickelt wurde (Abb. 15). Weisberg et al. konnten jedoch zeigen, dass PKC412 auch die Aktivität des FLT3-Rezeptors hemmen kann (Weisberg et al., 2002).

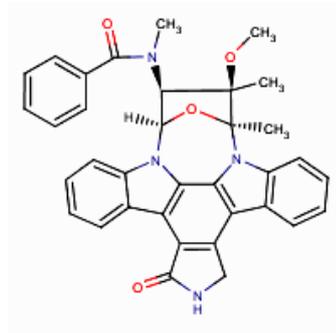


Abbildung 15: Strukturformel von PKC412 (Midostaurin)

Es wurde die Sensitivität der aktivierten Signalmoleküle in 32D-Zellen mit Expression von FLT3-ITD598/599 (12), FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDE611V (32) und FLT3-ITDK602R (7) auf PKC412 getestet. Es erfolgte mittels Western Blot die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus des FLT3-Rezeptors sowie der „downstream“ Moleküle STAT5 und Erk nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von PKC 412.

In Abbildung 16 sind die Western Blots für die verschiedenen 32D-Zellen unter PKC412-Behandlung dargestellt. Alle Zellen mit Expression einer FLT3-ITD zeigen in den Kontrollansätzen mit DMSO eine Phosphorylierung sowohl des FLT3-Rezeptors, als auch von STAT5 und Erk. Mit steigender Konzentration von PKC412 nimmt die Phosphorylierung und somit die Aktivierung dieser Proteine ab.

Bei 32D-Zellen mit Expression des wildtypischen FLT3-Rezeptors verhält es sich mit der Phosphorylierung etwas anders, da diese in Medium mit Zusatz von IL-3 kultiviert wurden. Man sieht keine Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors, da der wildtypische Rezeptor für seine Aktivierung den FLT3-Liganden (FL) benötigt. Allerdings ist eine Phosphorylierung von STAT5 und Erk vorhanden, die unabhängig von der Konzentration von PKC412 nachweisbar bleibt. Diese wird durch IL-3-abhängige Signalwege, welche nicht durch den FLT3-Rezeptor reguliert werden, verursacht. Dadurch ist beim wildtypischen FLT3-Rezeptor auch kein Einfluss der Inhibitorbehandlung auf den Phosphorylierungsstatus der untersuchten Proteine zu erkennen.

Während die in der juxtamembranären Domäne des FLT3-Rezeptors gelegene FLT3-ITD598/599 (12) bei einer Konzentration von 10 nM PKC412 noch eine schwache Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors zeigt, ist dies bei den anderen Mutationen nicht mehr nachweisbar. Ab einer Konzentration von 50 nM PKC412 ist in den Zellen mit mutiertem FLT3-Rezeptor keine Phosphorylierung der untersuchten Proteine mehr nachweisbar.

Hierbei lässt sich kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Sensitivität der einzelnen Zelllinien gegenüber PKC412 beobachten. Sowohl die non-juxtamembranären als auch die

juxtamembranären FLT3-ITDs zeigen bereits bei geringen Konzentrationen des Inhibitors eine Hemmung der Signaltransduktion.

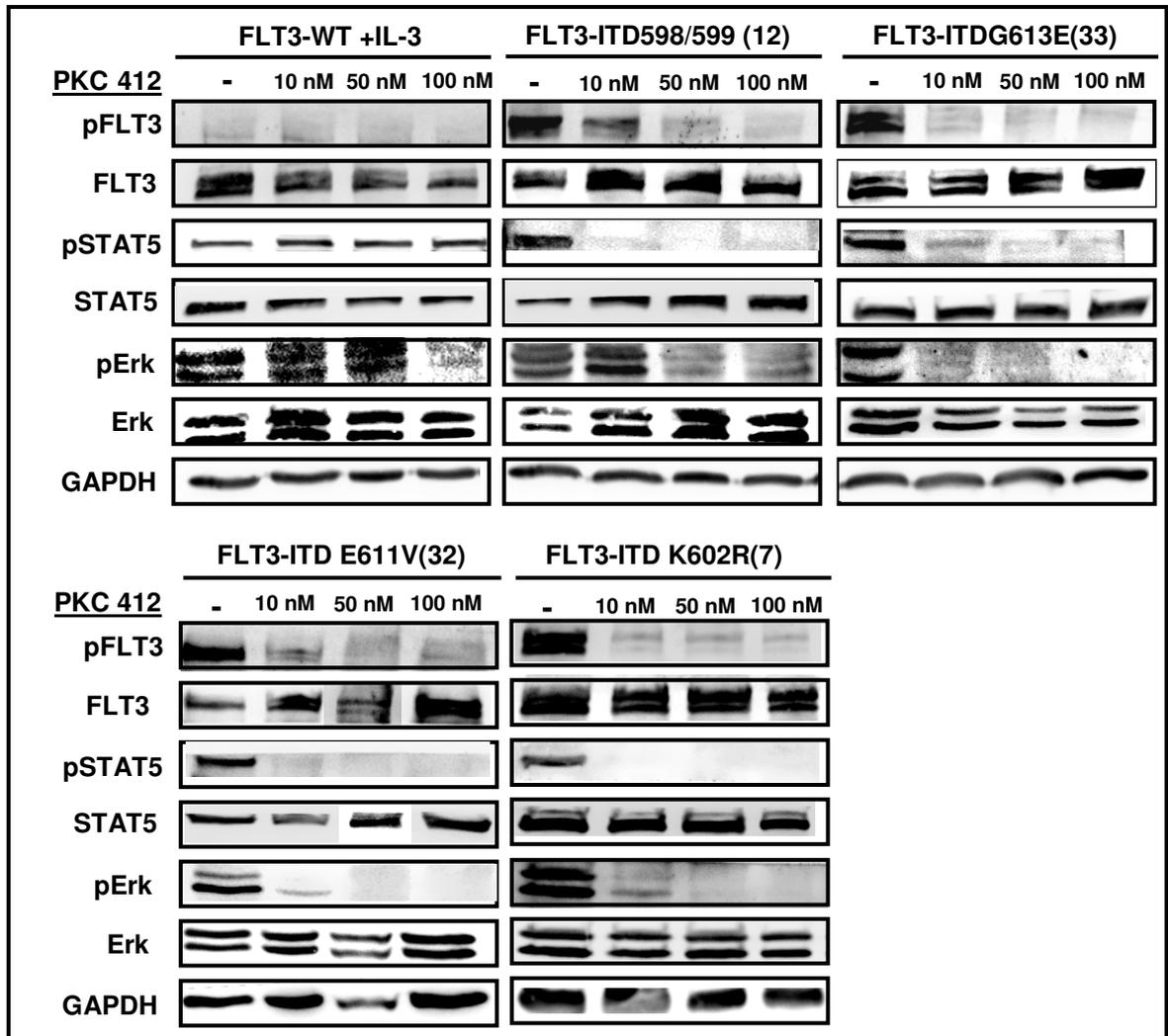


Abbildung 16: Behandlung mit PKC412 (Midostaurin) hemmt die Phosphorylierung von FLT3 und „downstream“ Signalwegen

32D-Zellen mit Expression verschiedener FLT3-ITDs wurden für 4 h mit aufsteigenden Konzentrationen von PKC412 behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Membran wurde zunächst mit phosphospezifischen Antikörpern inkubiert. Danach wurden die Membranen „gestrippt“ und das Gesamtprotein mittels spezifischem Antikörper detektiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zellen mit dem wildtypischen FLT3-Rezeptor wurden in Medium mit IL-3 kultiviert.

4.2 Inhibition der Signaltransduktion durch Bay 43-9006 (Sorafenib)

Sorafenib gehört zur Gruppe der Biaryl-Harnstoffe, wurde ursprünglich zur Hemmung der Serin/Threonin-Kinase Raf1 entwickelt und wurde in der Klinik vorrangig zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms eingesetzt. Es konnte jedoch auch eine Wirksamkeit bei der Hemmung des FLT-3-Rezeptors nachgewiesen und das Medikament zur Therapie der AML eingesetzt werden.

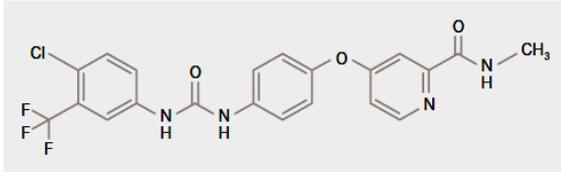


Abbildung 18: Strukturformel von Bay 43-9006 (Sorafenib)

Alle Experimente mit Sorafenib wurden analog zu den Experimenten mit PKC412 durchgeführt.

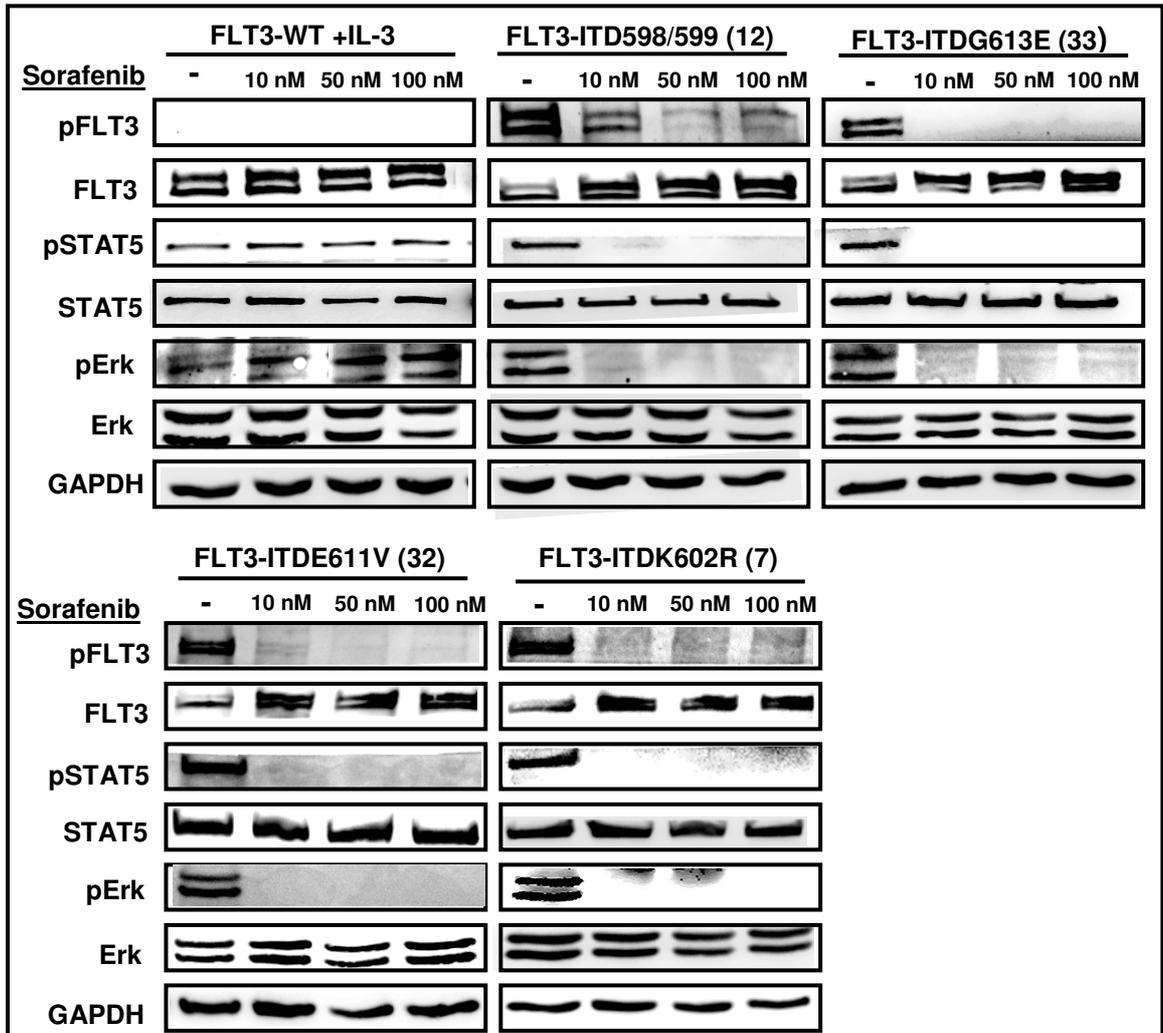


Abbildung 19: Behandlung mit Bay 43-9006 (Sorafenib)

32D-Zellen mit Expression verschiedener FLT3-ITDs wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Bay 43-9006 für 4 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Membran wurde zunächst mit phosphospezifischen Antikörpern inkubiert, danach wurden die Membranen „gestrippt“ und das Gesamtprotein mittels spezifischem Antikörper detektiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zellen mit dem wildtypischen FLT3-Rezeptor wurden in Medium mit IL-3 kultiviert.

Im Western Blot konnten ähnlich Ergebnisse für die Behandlung mit Bay 43-9006 beobachtet werden. Auch hier sieht man für alle untersuchten FLT3-ITDs eine Hemmung der Phosphorylierung von FLT3 und seiner „downstream“ Signalmoleküle STAT5 und Erk schon ab einer Konzentration von 10 nM Bay 43-9006. Einzige Ausnahme bildet FLT3-

ITD598/599 (12), bei welcher noch eine schwache Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors bei 10 nM InhibitorKonzentration sichtbar ist, welche erst bei höheren Konzentrationen von Bay 43-9006 vollkommen gehemmt wird. Somit lässt sich auch hier kein wesentlicher Unterschied zwischen juxtamembranären FLT3-ITDs und non-juxtamembranären FLT3-ITDs hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Sorafenib feststellen.

4.3 Inhibition der Signaltransduktion durch AC220 (Quizartinib)

Zu den so genannten FLT3-Inhibitoren der zweiten Generation gehört AC220 (Quizartinib), welches speziell als Hemmstoff der Tyrosinkinaseaktivität des FLT3-Rezeptors entwickelt wurde. Dadurch erhoffte man sich eine höhere Spezifität und bessere Wirksamkeit in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie.

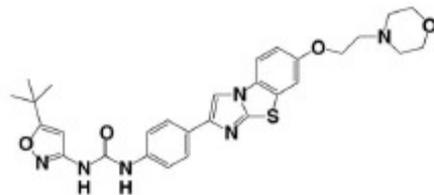


Abb. 20: Strukturformel von AC220 (Quizartinib)

Zur Bestimmung der Sensitivität der verschiedenen FLT3-ITDs gegenüber AC220 wurden die Experimente analog zu den anderen Inhibitoren durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die eingesetzten Konzentrationen von AC220 etwas anders gewählt wurden. Da in Vorexperimenten bei einer Konzentration von 10 nM AC220 kein wesentlicher Effekt zu beobachten war, wurden die Konzentrationen auf 20 nM, 50 nM und 100 nM festgelegt.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse des Western Blots dargestellt, nachdem die Zellen für 4 Stunden mit AC220 behandelt wurden.

Man kann erkennen, dass AC220 die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie der Zielmoleküle STAT5 und Erk hemmt. Während sich bei den Mutationen FLT3-ITD 598/599 (12), FLT-ITDK602R (7) und FLT3-ITDE611V (32) auch bei einer Konzentration von 20 nM noch phosphoryliertes FLT3-Protein nachweisen lässt, ist dies bei FLT3-ITDG613E (33) nicht der Fall. Weiterhin zeigen FLT3-ITDK602R (7) und FLT3-ITDE611V (32) auch eine Phosphorylierung von STAT5 und Erk, die erst bei einer Konzentration von 50 nM AC220 nicht mehr nachweisbar ist. Bei der FLT3-ITD598/599 (12) lässt sich lediglich noch ein schwaches Signal für pErk bei einer InhibitorKonzentration von 20 nM nachweisen, während für pSTAT5 kein Signal mehr erhalten wird.

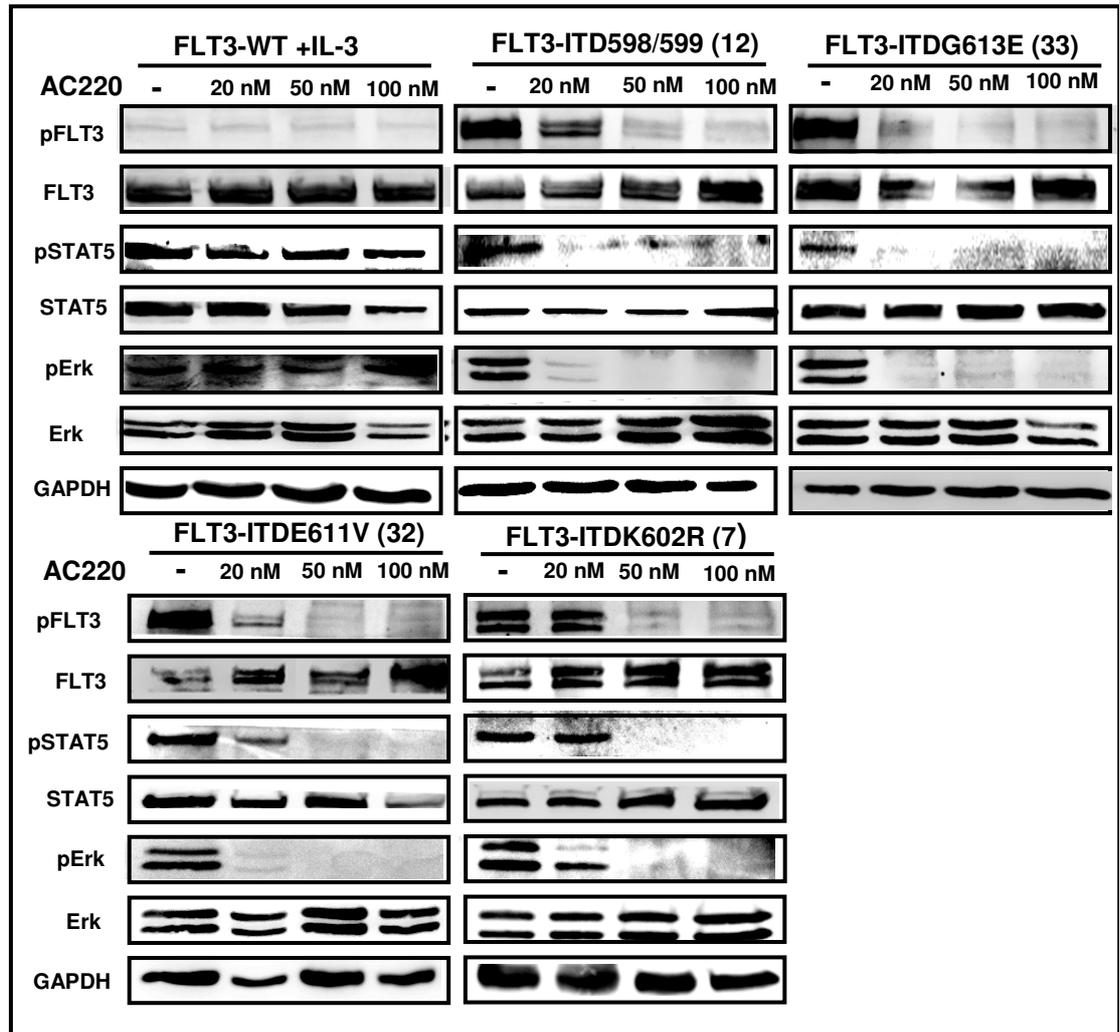


Abbildung 22: Behandlung mit AC220 (Quizartinib)

32D-Zellen mit Expression verschiedener FLT3-ITDs wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von AC220 für 4 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Membranen wurden mit phosphospezifischen Antikörpern inkubiert, danach wurden die Membranen „gestrippt“ und das Gesamtprotein mittels spezifischem Antikörper detektiert. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Zellen mit dem wildtypischen FLT3-Rezeptor wurden in Medium mit IL-3 kultiviert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene FLT3-Mutationen sich in ihrer Sensitivität gegenüber den untersuchten Inhibitoren unterscheiden. Dies könnte in der Klinik bei der Auswahl der besten Therapiestrategie helfen, indem die Sensitivität der FLT3-ITD des zu behandelnden Patienten hinsichtlich des ausgewählten Inhibitors getestet wird. Ein eindeutiger Unterschied zwischen JM-FLT3-ITDs und non-JM-FLT3-ITDs konnte hier nicht aufgezeigt werden.

IV. Diskussion

Die humane Hämatopoese ist ein komplexer Prozess, in welchem FLT3 besonders für frühe hämatopoetische Vorläuferzellen eine wichtige Rolle spielt. Folglich ist es naheliegend, dass Mutationen des *FLT3*-Gens zur Entstehung von verschiedenen hämatologischen Erkrankungen beitragen. Während der FLT3-Rezeptor in der normalen Hämatopoese hauptsächlich in CD34⁺-Zellen exprimiert wird, kommt es bei Leukämie zu einer aberranten Expression des FLT3-Rezeptors auch auf CD34⁻-Zellen sowie zu einer Überexpression des Rezeptors auf leukämischen Blasten (Carow et al., 1996). Weiterhin tragen Mutationen des FLT3-Rezeptors wesentlich zu Pathogenese der Leukämien bei. Interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors gehören zu den häufigsten Mutationen bei zytogenetisch normaler akuter myeloischer Leukämie (Thiede et al., 2002). Es handelt sich hierbei um aktivierende Mutationen (Kiyoi et al., 1998), die mit hohen Leukozytenzahlen und einer besonders schlechten Prognose assoziiert sind (Kiyoi et al., 1999; Fröhling et al., 2002).

Nakao et al. beschrieben 1996 erstmal das Vorkommen von internen Tandemduplikationen in der juxtamembranären Domäne des FLT3-Rezeptors. In den letzten Jahren wurde jedoch auch vielfach das Vorkommen von ITDs in der non-JM-Domäne des FLT3-Rezeptors beschrieben (Breitenbuecher et al., 2009). Kayser et al. konnten 2009 zeigen, dass ITDs in der Tyrosinkinase-Domäne des FLT3-Rezeptors mit einem schlechteren Gesamtüberleben (OS), einer schlechteren kompletten Remissionsrate (CR) und einem schlechteren remissionsfreiem Überleben (RFS) assoziiert sind. Die molekularen Mechanismen, welche entscheidend für die schlechtere Prognose dieser Mutationen sind, konnten noch nicht identifiziert werden. Einen Ansatzpunkt bilden „Reactive Oxygen Species“ (ROS), von welchen man glaubt, dass sie entscheidend an der Karzinogenese beteiligt sind, unter anderem indem sie Doppelstrangbrüche der DNA induzieren (Vallyathan et al., 1998; Karanjawala et al., 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass Zellen mit Expression von FLT3-ITD ein erhöhtes Level an ROS zeigen, welches vermutlich über eine Interaktion von pSTAT5 mit RAC1 induziert wird. Durch ROS kommt es zu vermehrten Doppelstrangbrüchen der DNA, welche zu einer erhöhten genomischen Instabilität führen können und somit weitere Mutationen bei FLT3-ITD positiver AML begünstigen könnten. Diese könnten zum resistenten Phänotyp beitragen und zumindest eine partielle Erklärung für die Aggressivität dieser Krankheitsentität bieten (Sallmyr et al., 2008). Weitere Untersuchungen bezüglich Mechanismen, welche für die schlechte Prognose von FLT3-ITD positiven Patienten mit AML verantwortlich sind, stehen noch aus. Bereits bekannt ist jedoch, dass es eine Vielzahl an unterschiedlichen Mutationen des FLT3-Rezeptors gibt,

welche sich in der Sensitivität gegenüber TKIs wesentlich unterscheiden. Die Untersuchung vieler verschiedener Mutationen des FLT3-Rezeptors dient der Risikostratifizierung und Entwicklung von gezielten Therapiestrategien für Patienten, welche Träger dieser unterschiedlichen Mutationen sind.

Ziel dieser Arbeit war es, exemplarisch interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors in der JM-Domäne und in der non-JM Domäne hinsichtlich des Kolonienbildenden-Potentials, der Apoptoseresistenz und der Signaltransduktion mit und ohne Tyrosinkinaseinhibitoren zu vergleichen.

1. Transformierendes Potential von Längenmutationen des FLT3-Rezeptors

Längenmutationen des FLT3-Rezeptors kommen bei etwa 25 % der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie vor (Kottardis et al., 2001, Schnittger et al., 2002). Durch die konstitutive Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Dysregulation der nachgeschalteten Signaltransduktion, welche wesentlich für die Transformation myeloischer und lymphatischer Zellen ist (Mizuki et al., 2000). Ein etabliertes Zellkulturmodell zur Untersuchung des transformierenden Potentials sowie der Signaltransduktion solcher Mutationen ist die 32D-Zelllinie. (Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al. 2000) 32D-Zellen sind murine, myeloische Zellen, welche für die Proliferation IL-3 als Wachstumsfaktor benötigen. Hier lassen sich die Bedingungen, welche bei akuter myeloischer Leukämie vorliegen, sehr gut reproduzieren.

Hayakawa et al. konnten im Jahr 2000 zeigen, dass FLT3-ITDs zu einer Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation von 32D-Zellen führen. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass diese Mutationen zu einer Liganden-unabhängigen Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors führen (Kiyoi et al., 1998). Ein Ziel dieser Arbeit war es, dies auch für die hier untersuchten, neuen FLT3-ITDs im 32D-Zellkulturmodell nachzuweisen und eventuell bestehende Unterschiede zwischen JM-ITDs und non-JM-ITDs aufzuzeigen.

Zunächst sollte das Proliferationsverhalten der erfolgreich transfizierten 32D-Zellen mit Expression der verschiedenen FLT3-ITDs untersucht werden.

Nach Entzug des Wachstumsfaktors IL-3 gingen 32D-Zellen mit Expression des FLT3-WT-Rezeptors in Apoptose. Lediglich Zellen mit Expression von FLT3-ITDs konnten auch in Abwesenheit von IL-3 weiter proliferieren und zeigten keinen Anstieg der Apoptoserate nach Wachstumsfaktorentzug. Alle hier untersuchten FLT3-ITDs vermittelten IL-3 unabhängiges Wachstum und Apoptoseresistenz der 32D-Zellen.

Ein weiteres Experiment zur Untersuchung der proliferativen Aktivität von 32D-Zellen mit FLT3-ITD Mutationen in dieser Arbeit war ein „Colony Count Assay“. Bei diesem Versuch werden die Zellen in semisolidem Methylzellulosemedium kultiviert. Kommt es zur Zellteilung wird durch die Viskosität des Mediums ein Wandern der Zellen verhindert,

sodass makroskopisch sichtbare Kolonien entstehen. Die Anzahl der Kolonien kann anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Alle Zelllinien wurden in Methylzellulose Medium ohne Zusatz von IL-3 kultiviert. Zur Koloniebildung kam es nur bei 32D-Zellen mit Expression von FLT3-ITDs, während 32D-Zellen, welchen den wildtypischen FLT3-Rezeptor trugen ohne IL-3 keine Kolonien bilden konnten. Kultivierte man 32D-Zellen mit Expression des wildtypischen FLT3-Rezeptors in Medium mit Zusatz von IL-3 kam es auch bei diesen Zellen zur Koloniebildung. Diese Zellen zeigten auch die meisten Kolonien (241), da IL-3 ein starkes proliferatives Signal vermittelt. Zellen mit Mutationen des FLT3-Rezeptors bildeten geringfügig weniger Kolonien innerhalb von 5 Tagen. Bei FLT3-ITD598/599 (12) konnten 180, bei FLT3-ITDK602R (7) 161 und bei FLT3-ITD E611V (32) 165 Kolonien ausgezählt werden. Die geringste Anzahl von Kolonien fand sich bei der Mutation FLT3-ITD G613E (33) mit nur 109 Kolonien. Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass die untersuchten FLT3-ITDs ein Wachstumsfaktor-unabhängiges Kolonien-bildendes Potential in 32D-Zellen vermitteln.

Dass die Transformation der Zellen auf die Mutation des FLT3-Rezeptors zurückzuführen ist wurde validiert, indem ein siRNA-„knockdown“ von FLT3 durchgeführt wurde. Der erfolgreiche „knockdown“ konnte im Western Blot nachgewiesen werden, wobei mit FLT3-siRNA transfizierte Zellen eine geringere Expression von FLT3, sowie eine verminderte Aktivierung der „downstream“ Signalwege STAT5 und Erk aufwiesen. Zellen, welche lediglich mit einer Kontroll-siRNA („scrambled-siRNA“) transfiziert wurden, zeigten keine verminderte Expression von FLT3. Nach der erfolgreichen Transfektion von FLT3-siRNA verloren die FLT3-ITDs exprimierenden Zellen ihre Apoptoseresistenz. Nach 48 h lag die Apoptoserate für diese Zellen bei rund 80 %, während der Kontroll-Ansatz eine Apoptoserate von etwa 20 % aufwies.

Die ebenfalls erhöhte Apoptoserate bei 32D-Zellen, welche mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, lässt sich durch den Stress erklären, dem die Zellen durch den Prozess der Mikroporation ausgesetzt sind. Bereits 48 h nach Transfektion der „scrambled-siRNA“ zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Apoptoserate in dieser Zellpopulation, während sie bei Zellen, welche mit FLT3-siRNA transfiziert wurden weiter ansteigt. Durch diesen Kontrollansatz lässt sich ein Einfluss der Methode der Mikroporation auf das Proliferationsverhalten der Zellen ausschließen.

Es wurden auch Zellen mit Expression des wildtypischen Rezeptors einem FLT3-„knockdown“ unterzogen. Bei diesen Zellen zeigte sich hinsichtlich der Apoptoserate, welche stabil bei ca. 5 % lag kein Unterschied zwischen FLT3-siRNA und „scrambled siRNA“. Diese Zellen wurden in Medium mit IL-3 kultiviert und sind bezüglich Überleben und Proliferationsfähigkeit nicht vom FLT3-Rezeptor, sondern nur von IL-3 gesteuert

Signalwegen abhängig, sodass nach „knockdown“ des FLT3-Rezeptors auch kein Anstieg der Apoptose zu erwarten war. IL-3 aktiviert unter anderem den PI-3-Kinase-Signalweg, welcher eine wichtiger Rolle bei der Hemmung der Apoptose spielt (Franke et al., 2007). Im Western Blot konnte auch für diese Zellen eine verminderte Expression von FLT3 nachgewiesen werden, während STAT5 und Erk weiterhin über den IL-3 gesteuerten Signalweg aktiviert blieben.

Die bisherigen Ergebnisse lassen erkennen, dass alle hier untersuchten internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors für die Transformation der 32D-Zellen verantwortlich sind, während die Proliferation von Zellen mit wildtypischem FLT3-Rezeptor unabhängig von FLT3 über den Wachstumsfaktor IL-3 vermittelt wird. Somit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten FLT3-ITDs ein transformierendes Potential besitzen.

2. Onkogene Signaltransduktion von FLT3-ITDs

Durch die Insertion einer ITD innerhalb des FLT3-Rezeptors kommt es zu einer konstitutiven, Liganden-unabhängigen Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors (Yamamoto et al., 2001; Gilliland und Griffin, 2002). Der Mechanismus, über welchen die Rezeptortyrosinkinase-Aktivität dereguliert wird, ist noch nicht genau bekannt. Es wurde gezeigt, dass die JM-Domäne des FLT3-Rezeptors im inaktiven Zustand als inhibitorische Domäne fungiert. Vermutet wird, dass es durch die Insertion der ITD zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt, welche eine sterische Blockade der Aktivierungsschleife der Kinase und damit die Inhibition der Kinaseaktivität verhindert (Hirota et al., 1998; Griffith et al., 2004). In fast allen bis jetzt untersuchten FLT3-ITDs ist die im Leserahmen liegende Insertion die Duplikation eines Bruchstücks der JM-Domäne. Auf der Suche nach Gemeinsamkeiten bei verschiedenen ITDs zeigte sich, dass **der Großteil der duplizierten Fragmente ein Tyrosin-reiches Fragment der JM-Domäne enthalten, welches die Aminosäuren 591-599 (YVDFREYEEY) umfasst (Vempati et al., 2007). Die Duplikation von Arginin an Stelle 595 (R595) scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen, da sie bei vielen Patienten gefunden wurde und eine alleinige Duplikation von R595 im FLT3-WT-Rezeptor ausreichte, um Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation von Ba/F3-Zellen zu vermitteln.** Alle in dieser Arbeit untersuchten FLT3-ITDs enthalten innerhalb der ITD einen großen Teil dieses Tyrosin-reichen Abschnitts und weisen hier auch eine Duplikation von R595 auf. Einzige Ausnahme bildet die Mutation FLT3-ITDK602R (7), welche weder einen Teil dieses Abschnitts noch eine Duplikation von R595 aufweist. Vempati et al. (2007) beschrieben, dass die Duplikation von R595 ein wichtiger Faktor für die starke proliferative Aktivität ist, welche durch FLT3-ITDs vermittelt wird. Mutationen ohne Duplikation dieses Tyrosin-Restes vermittelten im Zellkulturmodell hingegen eine schwächere Proliferation.

Alle in dieser Arbeit untersuchten internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors führten bei stabiler Expression in 32D-Zellen zu einer Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation der Zellen. In allen Zelllinien konnte eine konstitutive Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors auch ohne Ligandenstimulation nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Menge an phosphoryliertem Protein konnte nicht nachgewiesen werden. Für alle Western Blot-Experimente wurde jeweils die gleiche Menge Protein zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Dahingegen zeigten 32D-Zellen mit Expression des wildtypischen FLT3-Rezeptors keine Phosphorylierung und somit auch keine Aktivierung des Rezeptors. Die im Western Blot detektieren Signale für phospho-STAT5 waren jedoch für Zellen mit Expression des FLT3-WT-Rezeptors, unter Kultivierung mit IL-3, wesentlich stärker als bei den FLT3-ITDs. In diesen Zellen wird die Phosphorylierung von STAT5 nicht über den FLT3-Rezeptor vermittelt, sondern über IL-3 getriggerte FLT3-unabhängige Signalwege. Diese Tatsache könnte die stärkere Aktivierung von STAT5 in FLT3-WT Zellen erklären.

Der konstitutiv aktivierte, mutierte FLT3-Rezeptor führt zur Aktivierung promotogener „downstream“ Signalkaskaden wie dem MAP-Kinase-Signalweg und STAT5 (Chung et al., 2005) und unterscheidet sich in der Signaltransduktion vom wildtypischen FLT3-Rezeptor. Es wurde die Hypothese postuliert, dass durch die ITD eine Aktivierung des Rezeptors in verschiedenen Zellkompartimenten und nicht nur wie bei der Liganden-stimulierten Aktivierung, an der Zelloberfläche erfolgen kann. Durch die Insertion der ITD wird der Transport des Rezeptorproteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) behindert, sodass der Rezeptor in der geschützten Umgebung des ER eine aberrante Signaltransduktion vermitteln kann, welche normalerweise durch den endozytotischen Abbau des Rezeptors beendet worden wäre (Choudhary et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass bei Retention des mutierten FLT3-Rezeptors im ER die Signaltransduktion über STAT5 weiter läuft und das transformierende Potential erhalten bleibt (Schmidt-Arras et al., 2009). Die Lokalisation des Rezeptors in verschiedenen Zellkompartimenten könnte auch für die Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren eine Rolle spielen, da die Permeabilität der Inhibitoren in diese Kompartimente nicht gewährleistet sein muss.

Eine besondere Rolle in der Signaltransduktion von FLT3-ITDs spielt der „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT5), welchem große Bedeutung bei der Transformation von myeloischen Zellen bei AML zugemessen wird (Morrigl et al., 2005; Hoelbl et al., 2006). STAT-Proteine wurden erstmalig im Zusammenhang mit der Zytokin-vermittelten Regulation der Genexpression beschrieben, bis ihre Beteiligung an Onkogen-vermittelter Signaltransduktion sie in den Fokus der Forschung rückte. Mehrere Gruppen

konnten eine konstitutive Aktivierung von STAT5 in Blasten bei akuter myeloischer Leukämie nachweisen (Gouilleux-Gruart et al., 1996; Xia et al., 1998). Zhang et al. konnten 2000 zeigen, dass STAT5a eine wichtige Rolle in der FL-vermittelten Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors spielt (Zhang et al., 2000). Weiterhin wurde hier eine direkte Phosphorylierung von STAT5 durch die Rezeptorstyrosinkinase FLT3, ohne Zwischenschaltung von Janus-Kinasen, nachgewiesen. Als besonders wichtig wurde hier die Vermittlung der Proliferation über den STAT5-Signalweg nach FL-Stimulation des FLT3-Rezeptors gewertet. Auffällig war weiterhin, dass nach IL-3-Stimulation der Zellen eine Phosphorylierung von STAT5a und STAT5b erfolgte.

Im Gegensatz dazu zeigten Hayakawa et al. im gleichen Jahr, dass nur FLT3-Rezeptoren mit einer internen Tandemduplikation zu einer Aktivierung von STAT5 führen, während der wildtypische FLT3-Rezeptor auch nach Stimulation mit FL keine STAT5-Phosphorylierung vermittelt (Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000). Die Aktivierung von STAT5 über FLT3-Signalkaskaden wird als distinkte Eigenschaft des mutierten FLT3-Rezeptors angesehen, welche eine wichtige Rolle für das transformierende Potential der ITDs spielt.

Beide Arbeitsgruppen konnten bestätigen, dass die konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors zu einer konstitutiven Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT5 führt (Hayakawa et al., 2000). Ebenso wurde gezeigt, dass diese konstitutive Aktivierung von STAT5 wesentlich zur onkogenen Transformation beiträgt (Moriggl et al., 2005). Aktiviertes STAT5 hemmt unter anderem proapoptische Proteine wie Bcl-xl (Dumon et al., 1999) und trägt somit zur Apoptoseresistenz der onkogenen Zellen bei.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Zellen, die einen wildtypischen FLT3-Rezeptor exprimieren, bei Stimulation mit IL-3 eine Phosphorylierung von STAT5 zeigen. Diese wurde jedoch nicht durch den wildtypischen FLT3-Rezeptor vermittelt, da dieser nach Stimulation mit IL-3 unphosphoryliert, also nicht aktiviert vorlag. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine Aktivierung von STAT5 durch IL-3-vermittelte, FLT3-unabhängige Signalkaskaden (Mui et al., 1995). Bekannt ist, dass die Aktivierung von STAT5 wichtig für die Proliferation hämatopoetischer Zellen ist (Onishi et al., 1998; Nosaka et al., 1999). Wurden 32D-Zellen mit Expression des wildtypischen FLT3-Rezeptors ohne IL-3 kultiviert ließ sich keine Phosphorylierung von STAT5 nachweisen und die Zellen gingen in Apoptose (Daten nicht gezeigt).

In dieser Arbeit konnte für 32D-Zellen mit Expression einer FLT3-ITD eine Wachstumsfaktor-unabhängige Phosphorylierung und Aktivierung von STAT5 nachgewiesen werden. Der im Western Blot verwendete Antikörper gegen phospho-STAT5 erkennt sowohl STAT5a als auch STAT5b, sodass eine Differenzierung zwischen beiden Unterformen nicht möglich war. Eine Stimulation von 32D-Zellen mit Expression des

wildtypischen FLT3-Rezeptors mit dem FLT3-Liganden (FL) wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Ein weiteres „downstream“ Signalmolekül von FLT3, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Serin/Threonin-Kinase Erk1/2, welche Teil des MAP-Kinase-Signalweges ist. Durch die Aktivierung des FLT3-Rezeptors mittels FL kommt es über verschiedene Adaptermoleküle zu einer Phosphorylierung von Erk (Masson et al., 2009). FLT3-ITDs führen im Ba/F3- bzw. 32D-Zellkulturmodell zu einer konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges und in leukämischen Blasten von Patienten mit FLT3-ITD positiver AML konnte eine Phosphorylierung von Erk1/2 nachgewiesen werden (Hayakawa et al., 2000). Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges in Zellen mit Expression des wildtypischen FLT3-Rezeptors zur Induktion von Apoptose führt. Zellen die einen mutierten FLT3-Rezeptor exprimieren zeigten nach Hemmung des MAP-Kinase-Signalweges eine verminderte proliferative Aktivität (Hayakawa et al., 2000).

Alle in dieser Arbeit untersuchten FLT3-ITDs führten zu einer Liganden-unabhängigen Phosphorylierung von Erk1/2. Dies konnte im Western Blot mittels eines Antikörpers, welcher sowohl Erk1 als auch Erk2 detektiert, nachgewiesen werden. Durch Behandlung der verschiedenen FLT3-ITD exprimierenden Zellen mit Inhibitoren und Hemmung der FLT3-Rezeptoraktivität wurde auch die Phosphorylierung von Erk1/2 gehemmt. Dies zeigt, dass die Aktivierung von Erk1/2 in 32D-Zellen mit Expression einer FLT3-ITD durch die Aktivität des FLT3-Rezeptors stimuliert wird. In Zellen mit Expression des wildtypischen FLT3-Rezeptors konnte eine IL-3-gesteuerte Aktivierung von Erk1/2 nachgewiesen werden, welche unabhängig von der Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den hier untersuchten FLT3-ITDs kein Unterschied in der Signaltransduktion zu bereits charakterisierten FLT3-ITDs besteht.

3. Einfluss der Größe und Position von Internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors

Interne Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors gehen mit der Insertion von zusätzlichen Basenpaaren in das Gen einher. Bei der Untersuchung verschiedener ITDs fiel neben den unterschiedlichen Insertionsstellen der Tandemduplikationen auch deren variierende Größe auf. 2009 konnten Kayser et al. in einer Studie mit 241 Patienten, welche an AML erkrankt waren, ITDs mit einer Länge von 15 bis 180 Basenpaaren finden (Kayser et al., 2009). Eine Korrelation von Länge sowie Position der Insertion mit der Prognose bzw. der Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Erste Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Länge von ITDs auf klinische Endpunkte zeigten schlechtere Ergebnisse für Patienten mit langen (>40 Basenpaare) ITDs (Stirewalt et

al., 2006), während eine andere Gruppe kurz darauf Ergebnisse veröffentlichte, nach denen eine lange (>70 Basenpaare) ITD mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist (Kusec et al., 2006). Gleichzeitig widerlegte die Gruppe von Ponziani et al. den Einfluss der Länge von ITDs auf klinische Endparameter (Ponziani et al., 2006). Alle Gruppen arbeiteten mit einer relativ kleinen Anzahl von Patienten und erst Kayser et al. wiederholten 2009 diese Untersuchungen mit einer größeren Kohorte von Patienten. Sie zeigten außerdem, dass Patienten mit einer längeren ITD einen geringeren Prozentsatz an kompletter Remission erreichten, als Patienten mit kürzeren Insertionen (Kayser et al., 2009).

Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich einerseits durch verschiedene „cut-off“ Punkte für die Entscheidung zwischen „langer“ und „kurzer“ ITD, andererseits durch Unterschiede im Therapieregime, welche aus den Veröffentlichungen nicht eindeutig hervorgehen, erklären. Nur bei den Ergebnissen von Kayser et al. wurde berücksichtigt, ob es sich bei den ITDs um solche in der JM-Domäne des FLT3-Rezeptors handelt oder um ITDs, die in der Tyrosinkinase-Domäne lokalisiert sind. Da dies ein wichtiger prognostischer Faktor ist, ist ein Einfluss auf die dargestellten Ergebnisse wahrscheinlich.

In dieser Arbeit wurden zwei Mutationen der juxtamembranären Domäne des FLT3-Rezeptors, FLT3-ITD598/599 (12) und FLT3-ITDK602R (7), mit zwei Mutationen der non-juxtamembranären Domäne, FLT3-ITDE611V (32) und FLT3-ITDG613E (33), verglichen. Die Mutationen in der non-JM-Domäne befinden sich im β 1-Faltblatt des FLT3-Rezeptors. Insertionen in diesem Bereich sind mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert (Kayser et al., 2009). Die hier untersuchten non-JM-ITDs sind mit einer Länge von 32 bzw. 33 Basenpaaren Insertion deutlich länger als die untersuchten JM-ITDs. Ein Einfluss der ITD-Länge konnte in dieser Arbeit deshalb nicht untersucht werden, da beide JM-ITDs eher kürzere Insertionen aufwiesen und es sich bei den non-JM-FLT3-ITDs um längere Einschübe handelt. Um den Einfluss der Länge von FLT3-ITDs zu untersuchen, könnte man mehrere unterschiedlich lange ITDs, die im gleichen Abschnitt des Rezeptors lokalisiert sind, miteinander vergleichen. Idealerweise sollte die Insertion der ITDs an exakt der gleichen Stelle innerhalb des Rezeptors erfolgen, um eine gute Vergleichbarkeit zu erreichen.

Die in dieser Arbeit untersuchten internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors unterscheiden sich nicht nur durch ihre Länge, sondern auch durch den Integrationsort. Es kommt bei fast allen Mutationen zu einem Austausch von Aminosäuren an der Insertionsstelle. Je nach Struktur der eingeschobenen Aminosäuren kann dies einen Einfluss auf die Sekundär- und Tertiärstruktur des Rezeptors haben. Dies wiederum kann, wie bereits von Griffith et al. gezeigt, zu Veränderungen bei der Aktivierung bzw. Inaktivierung des FLT3-Rezeptors führen (Griffith et al., 2004).

Besonders interessant ist hier die FLT3-ITDF612LGS (17), welche mit zusätzlicher Insertion von Aminosäuren außerhalb der Tandemduplikation einhergeht. Deswegen wäre die Untersuchung dieser Mutation, die leider im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, ein weiterer Ansatz um die biologischen Eigenschaften von FLT3-ITDs weiter zu charakterisieren. Ein Einfluss der zusätzlich eingeschobenen Aminosäuren auf das biologische Verhalten von Zellen, welche diese Mutation tragen, ist nicht ausgeschlossen.

4. Inhibition der FLT3-ITD vermittelten Signaltransduktion durch Tyrosinkinase-Inhibitoren

Patienten, die an AML erkrankt sind und eine Mutation des *FLT3*-Gens aufweisen, zeigen ein deutlich reduziertes Gesamtüberleben (OS) im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutationen (Abu-Duhier et al., 2000; Kottardis et al., 2001). Deswegen wurde die Suche nach neuen Therapiestrategien in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie besonders auf FLT3 als Zielmolekül fokussiert. Mit der gezielten Hemmung der Aktivität des FLT3-Rezeptors erhofft man sich, einen Faktor, welcher wesentlich für die Proliferation und Apoptoseresistenz der leukämischen Zellen ist, ausschalten zu können. Medikamente, die diese Voraussetzung erfüllen, sind Tyrosinkinaseinhibitoren, welche durch Interaktion mit dem FLT3-Rezeptor dessen Aktivität hemmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden exemplarisch drei verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren untersucht. Hierbei handelt es sich um Midostaurin und Sorafenib, welche als TKIs der ersten Generation gelten, sowie den spezifischen FLT3-Inhibitor Quizartinib, welcher zu den TKIs der zweiten Generation gehört.

Midostaurin (PKC412), ein Tyrosinkinaseinhibitor mit Aktivität gegen unterschiedlichste Kinasen, wurde erstmalig von Weisberg et al. auch als Inhibitor des FLT3-Rezeptors beschrieben (Weisberg et al., 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass Midostaurin in Ba/F3-Zellen, welche mit einer FLT3-ITD transfiziert worden waren, die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie seiner „downstream“ Signalmoleküle hemmt. Weiterhin wurde im Mausmodell das Überleben von Mäusen, welche aufgrund einer aktivierenden Mutation des FLT3-Rezeptors an einer myeloproliferativen Erkrankung litten, durch die Behandlung mit Midostaurin signifikant verlängert (Kelly et al., 2002). In einer klinischen Phase I Studie mit 95 Patienten, welche an AML oder einem myelodysplastischen Syndrom erkrankt waren, wurde die Wirksamkeit von PCK412 untersucht. Es zeigte sich eine positive Auswirkung auf die untersuchten klinischen Endparameter sowohl für Patienten mit mutiertem FLT3-Rezeptor als auch für Patienten ohne Mutation, hier allerdings mit einer niedrigeren Frequenz, als für Patienten mit FLT3-Mutation (Fischer et al., 2010).

32D-Zellen mit Expression der verschiedenen FLT3-ITDs sowie des wildtypischen FLT3-Rezeptors wurden im Rahmen dieser Arbeit mit ansteigenden Konzentrationen von

Midostaurin behandelt und wichtige Signalmoleküle hinsichtlich ihrer Sensitivität überprüft. Die IC_{50} für die Hemmung der Tyrosinphosphorylierung des FLT3-Rezeptors liegt für Midostaurin im Zellkulturmodell bei 10 nM, während für die Hemmung des Zellwachstums eine IC_{50} unter 30 nM determiniert wurde (Weisberg et al., 2002). Angelehnt an die Ergebnisse von Weisberg et al. wurden in dieser Arbeit Konzentrationen von 10 nM, 50 nM und 100 nM Midostaurin eingesetzt. Anhand von Western Blot-Untersuchungen konnte zunächst gezeigt werden, dass nach der Behandlung mit Midostaurin die Phosphorylierung und somit Aktivierung des FLT3-Rezeptors in allen untersuchten Zelllinien nicht mehr nachweisbar war. Auch für die Phosphorylierung von STAT5 und Erk1/2 konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion nach Inhibitorbehandlung nachgewiesen werden. Während für die FLT3-ITD598/599 (12) bei einer Konzentration von 10 nM Midostaurin noch eine geringe Menge an phosphoryliertem FLT3-Protein nachgewiesen werden konnte, war dies für die anderen Mutationen nicht mehr der Fall. Lediglich die Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Erk konnte bei dieser Konzentration des Inhibitors noch bei allen Zelllinien nachgewiesen werden, was darauf hindeuten könnte, dass noch eine geringe Aktivität des FLT3-Rezeptors vorhanden ist, jedoch nicht mehr genügend phosphoryliertes Protein vorliegt, um es im Western Blot zu detektieren. Damit wurde die Wirksamkeit von Midostaurin auf molekularer Ebene für alle hier untersuchten FLT3-ITDs bewiesen.

32D-Zellen mit Expression des wildtypischen FLT3-Rezeptors zeigten keine Reaktion auf die Behandlung mit Midostaurin, da diese Zellen mit IL-3 inkubiert wurden und die Signaltransduktion des FLT3-Rezeptor nicht aktiviert ist.

In gleicher Art und Weise wurden die Experimente mit Sorafenib, ebenfalls ein TKI der ersten Generation, durchgeführt. Sorafenib ist ebenfalls ein multifunktionaler Kinaseinhibitor, welcher ursprünglich für die Hemmung der Kinase c-Raf entwickelt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Sorafenib auch eine Inhibition des FLT3-Rezeptors auslöst (Wilhelm et al., 2004; Auclair et al., 2007). Zhang et al. konnten zeigen, dass Sorafenib in Zelllinien, welche einen FLT3-Rezeptor mit interner Tandemduplikation tragen, bereits in viel niedrigeren Konzentrationen einen Arrest des Zellwachstums und Apoptose auslöst als in Zelllinien ohne diese Mutation (Zhang et al., 2008). Hier konnte auch gezeigt werden, dass Sorafenib bei Patienten mit AML, welche Träger eine FLT3-ITD waren, zu einer Reduktion leukämischer Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark führte. Für Sorafenib wurde eine IC_{50} für die Hemmung der Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors von 2,8 nM definiert (Auclair et al., 2007; Lierman et al., 2007). In dieser Arbeit wurden Endkonzentrationen von 10, 50 und 100 nM Sorafenib eingesetzt. Auch hier zeigte sich bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 10 nM eine Hemmung der Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors im Western Blot für alle untersuchten Zelllinien. Auch die Aktivierung der

„downstream“ Signalmoleküle Erk1/2 und STAT5 wurden bereits bei der niedrigsten verwendeten InhibitorKonzentration gehemmt.

Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Midostaurin oder Sorafenib zwischen non-JM-FLT3-ITDs und JM-FLT3-ITDs konnte anhand der Western Blot-Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren wurden spezifische Inhibitoren für die Hemmung des FLT3-Rezeptors entwickelt, um die Therapie der AML zu verbessern. Einer dieser Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation ist Quizartinib (Chao et al., 2009). Der Vorteil dieses neuen Inhibitors liegt einerseits in seiner hohen Spezifität und Potenz und andererseits in seinen günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass Quizartinib in Potenz und Selektivität den TKIs der ersten Generation deutlich überlegen ist. Auch die Hemmung der Phosphorylierung von FLT3 *in vivo* sowie eine Verlängerung des Überlebens von Mäusen mit FLT3-ITD-positiver AML wurden nachgewiesen (Zarrinkar et al., 2009). Erste klinische Studien mit Quizartinib zeigten eine gute Wirksamkeit dieses Inhibitors, wobei Patienten mit FLT3-ITD positiver AML besser auf die Therapie ansprachen als Patienten ohne diese Mutation (Cortes et al., 2009). In dieser Arbeit wurde mit Konzentrationen von 20, 50 und 100 nM Quizartinib gearbeitet.

Bei der Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit AC220 konnten Unterschiede zwischen den einzelnen ITDs aufgezeigt werden. Bis auf die FLT3-ITDG613E (33) zeigten alle Zelllinien bei der niedrigsten InhibitorKonzentration noch eine Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors. Eine Aktivierung von STAT5 lässt sich hier nur bei FLT3-ITDK602R (7) und FLT3-ITDE611V (32) eindeutig nachweisen. Bei den juxtamembranären FLT3-ITDs zeigt FLT3-ITD598/599 (12) eine höhere Sensitivität in der Inhibition der Signalmoleküle gegenüber dem Inhibitor als die FLT3-ITDK602R (7). Vergleicht man beide non-JM-FLT3-ITDs zeigt sich, dass die FLT3-ITDE611V (32) eine geringere Sensitivität gegenüber AC220 zeigt als die FLT3-ITDG613E (33), welche bereits bei der niedrigsten InhibitorKonzentration eine Hemmung der Phosphorylierung von FLT3 zeigt.

Zusätzlich muss zu dieser Arbeit noch eine Bemerkung hinsichtlich der Zellkultur-Experimente gemacht werden. Nach Fertigstellung des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde im Labor eine Mycoplasmen-Infektion bei einem Großteil der verwendeten Zelllinien festgestellt. Ob die verwendeten Zelllinien zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente von einer Mykoplasmen-Infektion betroffen waren, lässt sich nicht mehr abschließend klären, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine Kontamination mit Mykoplasmen kann verschiedene Effekte auf das biologische Verhalten der Zellen haben. Es wurde gezeigt, dass einige Mykoplasmen-Spezies zur Hemmung der Apoptose der

infizierten Zelllinien führen, während durch andere apoptotische Vorgänge beschleunigt werden können (Zhang & Lo, 2006). Effekte der Mykoplasmen-Infektion auf das biologische Verhalten der hier untersuchten Zellen sind somit nicht ganz auszuschließen.

Die variierende Sensitivität verschiedener FLT3-ITDs gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren ist ein wesentliches Problem bei der Entwicklung von Therapiestrategien bei zytogenetisch normaler AML. Grundsätzlich wird zwischen primärer Resistenz, also kein Ansprechen auf einen TKI, und sekundärer Resistenz, initiales Ansprechen auf Inhibitoren mit Verlust der Sensitivität im Therapieverlauf, unterschieden (Kindler et al., 2010). Dies fiel unter anderem in einer klinischen Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit von Midostaurin auf (Fischer et al., 2010). Hier zeigten einige Patienten nach initial gutem Ansprechen auf Midostaurin, im weiteren Verlauf eine Resistenz. Auf der Suche nach Gründen für diese Resistenzentwicklung wurde bei einem Indexpatienten eine Punktmutation in der ATP-Bindungstasche des Rezeptors nachgewiesen und als möglicher Resistenzmechanismus identifiziert (Heidel et al., 2006). Da ein initiales Ansprechen auf den Inhibitor beobachtet wurde, handelt es sich hier um einen sekundären Resistenzmechanismus. Durch *in vitro* Screening von verschiedenen Mutationen in der ATP-Bindungstasche der FLT3-Rezeptors konnten weitere Punktmutationen in dieser Region identifiziert werden, welche eine Resistenz gegen verschiedene TKIs vermitteln (Cools et al., 2004). Auch Mutationen außerhalb der ATP-Bindungstasche können zu einer Resistenz gegenüber Inhibitoren des FLT3-Rezeptors führen. Eine Mutation im β 2-Faltblatt des Rezeptors (FLT3-ITD 627E) führt zu einer primären Resistenz gegenüber PKC412 durch Hochregulation des antiapoptotischen Proteins MCL-1 (Breitenbuecher et al., 2009). Die Aktivierung von MCL-1 war unabhängig von der Hemmung der FLT3-Phosphorylierung. Hier wird gezeigt, dass die Aktivierung von alternativen Signalwegen bei Inhibition des FLT3-Rezeptors, ebenfalls eine Apoptoseresistenz vermitteln kann. Ob bei den FLT3-ITDs G613E (33) und E611V (32) ebenfalls ein solcher Mechanismus vorliegt wurde bisher noch nicht untersucht. Auch ist noch nicht klar, ob die verstärkte Expression von MCL-1 ein gemeinsames Merkmal von FLT3-ITDs der Tyrosinkinasedomäne ist, oder ob dies nur für die Mutation FLT3-ITD 627E, welche im β 2-Faltblatt des Rezeptors lokalisiert ist, zutrifft. Eine Hochregulation der Expression antiapoptotischer Gene konnte jedoch bereits für einige verschiedene FLT3-Mutationen nachgewiesen und als ein Resistenzmechanismus gegenüber TKIs postuliert werden (Konopleva et al., 2002; Breitenbuecher et al., 2009).

Diese Hypothese wurde durch Experimente bestätigt, die zeigten, dass eine längere Exposition von verschiedenen AML-Zelllinien gegenüber TKIs zur Resistenzentwicklung führte, auch ohne dass Mutationen im FLT3-Rezeptor nachgewiesen werden konnten. Vielmehr zeigte sich eine Aktivierung von „downstream“ Signalwegen trotz nachgewiesener

Hemmung des FLT3-Rezeptors (Piloto et al., 2007). Es wurde spekuliert, dass eine Aktivierung von anderen, antiapoptotischen Signalmolekülen diese veränderte Signaltransduktion vermittelt. Ein Hinweis hierfür war eine erhöhte Menge an phosphorylierten Proteinen in TKI-resistenten im Vergleich zu TKI-sensitiven Zelllinien. Ähnliche Mechanismen werden auch für das Auftreten von primären Resistenzen verantwortlich gemacht. In einer Phase 1/2 Studie mit dem Inhibitor CEP-701 bei Patienten mit AML zeigten einige Patienten trotz nachgewiesener Hemmung der Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors kein klinisches Ansprechen auf den Inhibitor (Smith et al., 2004).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass verschiedene Mutationen innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors ein unterschiedliches Verhalten gegenüber TKIs zeigen (Bagrintseva et al., 2004). Eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors und Vermittlung von Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation konnten Bagrintseva et al. für alle untersuchten Mutationen gleichermaßen nachweisen, während sich die Sensitivität gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren wesentlich unterschied. Es wurde auch gezeigt, dass im Verlauf der Therapie mit TKIs verschiedene Mutationen innerhalb der TKD entstehen, die eine sekundäre Resistenz vermitteln. Obwohl duale TKD/ITD Mutationen bei Diagnosestellung von AML selten sind, kann man anhand der Daten von Bagrintseva et al. (2004) vermuten, dass diese Mutationen sich während der Therapie mit TKIs entwickeln könnten.

Die exakte Aminosäuresequenz von FLT3-Mutationen spielt eine wichtige Rolle für die primäre Resistenz gegenüber TKIs. Dies konnte auch anhand von Untersuchungen verschiedener Mutationen in der Aktivierungsschleife des FLT3-Rezeptors gezeigt werden. Der Austausch einzelner Aminosäuren führte hier zu signifikanten Unterschieden hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber FLT3-Inhibitoren (Grundler et al., 2003). Diese Daten implizieren die Notwendigkeit der exakten Mutationsanalyse von Patienten mit zytogenetisch normaler AML vor Therapiebeginn, um die bestmögliche Therapiestrategie finden zu können.

Ein in klinischen Studien beobachteter Effekt war, dass die Hemmung von FLT3 durch TKIs über lange Zeiträume zu einer erhöhten Expression von FLT3-Ligand (FL) führt (Sato et al., 2011). Auch dies könnte einen wesentlichen Beitrag zur Resistenzentwicklung *in vivo* leisten.

Weiterhin zeigten Untersuchungen zum Einfluss der Stammzell-Nische, dass auch die Umgebung, in welcher sich leukämische Zellen befinden, einen Einfluss auf die Wirksamkeit von TKIs haben kann. Es wurde nachgewiesen, dass Stromazellen der Stammzell-Nische einen protektiven Effekt auf FLT3-ITD positive primitive Progenitor-Zellen gegenüber TKIs haben (Parmar et al., 2011). Auch für Chemotherapeutika konnte dies nachgewiesen werden. Als Mechanismus, über welchen die Apoptoseresistenz

vermittelt wurde, ist unter anderem die Hochregulation von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie identifiziert worden (Konopleva et al., 2002). Diese Ergebnisse stützen die Hypothesen, dass die Entwicklung von Resistenzen über unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden kann und vielfältige Einflüsse *in vivo* eine Rolle hierbei spielen.

Die oben genannten Beispiele verdeutlichen die große Variabilität einzelner interner Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors sowohl hinsichtlich biologischem Verhalten als auch der Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren. In dieser Arbeit wurden zwei Mutationen im β 1-Faltblatt des Rezeptors mit zwei JM-FLT3-ITDs verglichen. Alle Mutationen zeigten unterschiedliche Resultate bei der Behandlung mit TKIs, was im Einklang mit den bereits von anderen Gruppen erhobenen Daten steht.

In dieser Arbeit wurden die 32D-Zellen mittels retroviraler Transduktion mit den verschiedenen FLT3-ITDs transduziert. Bei dieser Methode kommt es zu einer Infektion der 32D-Zellen mit einem retroviralen Partikel, welcher die zu untersuchende Mutation trägt. Dieses Virion vermittelt die Integration des zu untersuchenden Gens in das Genom der Zielzelle. Die Integration kann dabei prinzipiell an allen Stellen des Genoms erfolgen und dabei ein Mal oder auch mehrfach stattfinden. Dies wiederum hat einen Einfluss auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens. Eine vielfache Integration führt demnach zu einer verstärkten Expression und kann somit auch die Effekte des exprimierten Gens verstärken. . Außerdem kann die Stärke der Genexpression auch vom Integrationsort innerhalb des Genoms abhängig sein (Jaenisch et al., 1981). Durch die Western Blot-Untersuchungen konnte hier ein ähnliches Expressionslevel des FLT3-Rezeptors für alle ITDs in den 32D-Zellen nachgewiesen werden.

Ein weiteres Phänomen, welches bei retroviraler Transduktion auftreten kann, ist die sogenannte Insertionsmutagenese (Stocking et al., 1993; Li et al., 2002). Dabei kommt es durch virale Promotor- und Enhancersequenzen zu einer Aktivierung von zelleigenen benachbarten Genen. Dieser Mechanismus kann durch Aktivierung von promotogenen Signalwegen zu einer verstärkten Resistenz einzelner Zelllinien gegenüber verschiedenen TKIs führen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen JM-FLT3-ITDs und non-JM-FLT3-ITDs hinsichtlich der Signaltransduktion und der Sensitivität der aktivierten Signalmoleküle gegenüber den untersuchten Inhibitoren feststellen.

V. Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen wie die AML, beruhen meist auf Mutationen in Genen, welche Wachstum und Apoptose sowie die Differenzierung von Zellen regulieren, wodurch es zu einer Störung des natürlichen Ablaufs dieser Vorgänge kommt. Mutationen des FLT3-Gens bei akuter myeloischer Leukämie wurden erstmals 1996 von Nakao et al. als so genannte interne Tandem-Duplikationen (ITDs) in der juxtamembranären (JM) Domäne des FLT3-Rezeptors beschrieben (Nakao et al., 1996). Diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des FLT3-Rezeptors sowie seiner downstream-Signalmoleküle und verursachen im Mausmodell eine myeloproliferative Erkrankung (Hayakawa et al., 2000; Kiyoi et al., 1999; Kelly et al., 2002). Breitenbuecher et al. beschrieben 2009 erstmals eine ITD, welche in der non-juxtamembranären Domäne des FLT3-Rezeptors integrierte. In dieser Arbeit wurde zunächst eine weitere non-JM-ITD aus Patientenmaterial identifiziert, die FLT3-ITDF612LGS (17). Weiterhin wurden zwei non-JM-FLT3-ITDs (FLT3-ITDG613E (33), FLT3-ITDE611V (32)) sowie zwei JM-ITDs (FLT3-ITD598/599 (12), FLT3-ITDK602R (7)) mittels retroviraler Transduktion stabil in 32D-Zellen exprimiert. Alle Mutationen vermittelten ein Kolonienbildendes Potential und eine Apoptoseresistenz der Zellen und zeigten im Western Blot eine konstitutive Phosphorylierung FLT3-Rezeptors sowie seiner downstream-Signalmoleküle STAT5 und Erk. Ein Unterschied in der Signaltransduktion zwischen beiden Gruppen von Mutationen konnte nicht beobachtet werden.

Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) der ersten und zweiten Generation hinsichtlich der Inhibition der Signalmoleküle, zeigten keine relevanten Unterschiede zwischen non-JM-FLT3-ITDs und JM-FLT3-ITDs. Vergleicht man die untersuchten JM-FLT3-ITDs miteinander, zeigten sich jedoch innerhalb dieser Gruppe Unterschiede bezüglich der Inhibition von Signalmolekülen durch die verschiedenen TKIs. Das gleiche gilt für die non-JM-FLT3-ITDs. Dies deutet darauf hin, dass nicht allein der Integrationsort, sondern auch andere Faktoren, wie Länge und genaue Sequenz der ITD einen Einfluss auf das biologische Profil von mutierten Zellen haben könnten.

VI. Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, a C., Wilson, G. a, Gari, M. a, Peake, I. R., Rees, D. C., Vandenberghe, E. a, et al. (2000)** “FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group.” *British Journal Of Haematology* 111(1): 190-5.
- Agnès, F, Shamoob 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”. *Gene* 145: 283–288.
- Auclair, D., Miller, D., Yatsula, V., Pickett, W., Carter, C., Chang, Y., Zhang, X., et al. (2007).** “Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells.” *Leukemia: 21*(3), 439-45.
- Bagrintseva, K., Schwab, R., Kohl, T. M., Schnittger, S., Eichenlaub, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., et al. (2004).** “Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitors in FLT3-ITD-transformed hematopoietic cells.” *Blood, 103*(6), 2266-75.
- Brandts, C. H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwäble, J., et al. (2005)** “Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation.” *Cancer research* 65(21): 9643-50.
- Breitenbuecher, F., Markova, B., Kasper, S., Carius, B., Stauder, T., Böhmer, F. D., et al. (2009)** “A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML.” *Blood* 113(17): 4063-73.
- Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, Markova B, Carius B, Brecht A, Duyster J, Haferlach T, Huber C, Fischer T. (2009)** “Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor.” *Blood* 113(17): 4074-4077
- Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D. (1996)** “Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias.” *Blood* 87: 1089–1096.
- Chao, Q., Sprankle, K. G., Grotzfeld, R. M., Lai, A. G., Carter, T. a, Velasco, A. M., Gunawardane, R. N., et al. (2009)** “Identification of N-(5-tert-butylisoxazol-3-yl)-N’-{4-[7-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)imidazo[2,1-b][1,3]benzothiazol-2-yl]phenyl}urea dihydrochloride (AC220), a uniquely potent,

- selective, and efficacious FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitor.” *Journal Of Medicinal Chemistry* 52(23): 7808-16
- Choudhary C, Schwable J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. (2005)** “AML associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations.” *Blood* 106: 265-273.
- Choudhary, C., Olsen, J. V., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P. N. G., Böhmer, F. D., Gerke, V., et al. (2009).** “Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes.” *Molecular cell*, 36(2), 326-39.
- Chung, K. Y., Morrone, G., Schuringa, J. J., Wong, B., Dorn, D. C., & Moore, M. a S. (2005).** “Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis.” *Blood*, 105(1), 77-84.
- Clark, J. J., Cools, J., Curley, D. P., Yu, J.-C., Lokker, N. a, Giese, N. a, & Gilliland, D. G. (2004).** “Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518.” *Blood*, 104(9), 2867-72.
- Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Fabbro, D., Clark, J. J., Griffin, J. D., et al. (2004)** “Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia.” *Cancer research* 64(18): 6385-9
- Cortes J., Foran J., Ghirdaladze D. et al. (2009).** “AC220, a potent, selective second generation FLT3 receptor tyrosin kinase (RTK) inhibitor in a first-in-human (FIH) phase 1 AML study.” *Blood*, 114. Abstract 636
- Dosil M, Wang S, Lemischka IR. (1993)** “Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells.” *Mol Cell Biol* 13: 6572-6585.
- Dumon, S., Santos, S. C., Debierre-Grockiego, F., Gouilleux-Gruart, V., Cocault, L., Boucheron, C., Mollat, P., et al. (1999).** “IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line.” *Oncogene*, 18(29), 4191-9.
- Fischer, T., Stone, R. M., Deangelo, D. J., Galinsky, I., Estey, E., Lanza, C., Fox, E., et al. (2010).** “Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3.” *Journal Of Clinical Oncology*, 28(28): 4339-45.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998).** “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.” *Nature*, 391(6669), 806-11
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., & Cantley, L. C. (1997).** “PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis.” *Cell*, 88(4), 435-7.

- Fröhling, S., Schlenk, R. F., Breitruck, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., 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.” *Analysis*, 4372-4380. doi: 10.1182/Blood-2002-05-1440.
- Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S, Peschle C. (1995)** “Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors.” *Blood* 86(5): 1661-1670.
- Gilliland, D. G., & Griffin, J. D. (2002).** „The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.” *Blood*, 100(5), 1532-42.
- Gouilleux-Gruart, V., Gouilleux, F., Desaint, C., Claisse, J. F., Capiod, J. C., Delobel, J., Weber-Nordt, R., et al. (1996).** “STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients.” *Blood*, 87(5), 1692-7.
- Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. (2004)** “The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain.” *Molecular Cell*.13(2): 169-178.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. (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. *Blood* 92(7): 2322-2333.
- Grundler, R., Thiede, C., Miething, C., Steudel, C., Peschel, C., & Duyster, J. (2003).** “Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3 receptor.” *Blood*, 102(2), 646-51.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000).** “An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.” *Nature*, 404(6775), 293-6.
- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. (2000)** “Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines.” *Oncogene* 19(5): 624-631.
- Heidel, F. H., Mar, B. G., & Armstrong, S. a. (2011)** “Self-renewal related signaling in myeloid leukemia stem cells.” *International Journal Of Hematology* 94(2):109-17
- Heidel, F., Solem, F. K., Breitenbuecher, F., Lipka, D. B., Kasper, S., Thiede, M. H., Brandts, C., Serve, H., Roesel, J., Giles, F., Feldman, E., Ehninger, W., Schiller, G. J., Nimer, S., Stone, R. M., Wang, Y., Kindler, Th., Cohen, P. S.,**

- Huber,C., Fischer,Th (2006)** “Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain.” *Blood* 107(1): 293-300.
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Tunio GM, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. (1998)** “Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors.” *Science* 279: 577- 580.
- Hoelbl, A., Kovacic, B., Kerenyi, M. a, Simma, O., Warsch, W., Cui, Y., Beug, H., et al. (2006).** “Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation.” *Blood*, 107(12), 4898-906.
- Irusta PM, DiMaio D. (1998)** “A single amino acid substitution in a WW-like domain of diverse members of the PDGF receptor subfamily of tyrosine kinases causes constitutive receptor activation.” *The EMBO Journal* 17(23): 6912-6923.
- Jaenisch, R., Jähner, D., Nobis, P., Simon, I., Löhler, J., Harbers, K., & Grotkopp, D. (1981).** „Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice.” *Cell*, 24(2), 519-29.
- Karanjawala, Z. E., Murphy, N., Hinton, D. R., Hsieh, C. L., & Lieber, M. R. (2002).** „Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants.” *Current biology: CB*, 12(5), 397-402.
- Kayser, S., Schlenk, R. F., Londono, M. C., Breitenbuecher, F., Wittke, K., Du, J., Groner, S., et al. (2009)** “Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome.” *Blood* 114(12): 2386-92.
- Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. (2002)** “FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model.” *Blood* 99(1): 310-318.
- Kindler, T., Lipka, D. B., & Fischer, T. (2010).** „FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years.” *Blood* 116(24): 5089-102.
- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. (1999)** “Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia.” *Blood* 93(9): 3074-80.
- Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, NaoeT. (2002)** “Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain.” *Oncogene* 21: 2555-2563
- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. (1998)** “Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product.” *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 12(9): 1333-1337.

- Konopleva, M., Konoplev, S., Hu, W., Zaritsky, a Y., Afanasiev, B. V., & Andreeff, M. (2002).** “Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins.” *Leukemia* 16(9), 1713-24.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. (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 K.” *Blood* 98(6): 1752-1759.
- Kusec R., Jaksic O., Ostojic S., Kardum-Skelin I., R. V. A. B. J. (2006).** “To the editor : More on prognostic significance of FLT3 / ITD size in acute myeloid leukemia (AML).” *Blood*, 405-406.
- Lavagna-Sevenier C, Marchetto S, Birnbaum D, Rosnet O. (1998)** “FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates.” *Leukemia* 12: 301-310
- Levis, M., Murphy, K. M., Pham, R., Kim, K.-T., Stine, A., Li, L., McNiece, I., et al. (2005).** “Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells.” *Blood* 106(2): 673-80.
- Li, Z., Düllmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., et al. (2002).** “Murine leukemia induced by retroviral gene marking.” *Science (New York, N.Y.)*, 296(5567), 497.
- Lierman, E., Lahortiga, I., Van Miegroet, H., Mentens, N., Marynen, P., & Cools, J. (2007).** “The ability of sorafenib to inhibit oncogenic PDGFRbeta and FLT3 mutants and overcome resistance to other small molecule inhibitors.” *Haematologica*, 92(1), 27-34
- Lyman SD, James L, Zappone J, Sleath PR, Beckmann MP, Bird T. (1993)** “Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene.” *Oncogene* 8: 815–822.
- Marchetto S, Fournier E, Beslu N, Aurran-Schleinitz T, Dubreuil P, Borg JP, Birnbaum D, Rosnet O. (1999)** “SHC and SHIP phosphorylation and interaction in response to activation of the FLT3 receptor.” *Leukemia* 13: 1374- 1382
- Masson K, Liu T, Khan R, Sun J, Rönstrand L. (2009)** “A role of Gab2 association in Flt3 ITD mediated Stat5 phosphorylation and cell survival.” *British journal of haematology* 146(2):193-202
- Metzelder, S., Wang, Y., Wollmer, E., Wanzel, M., Teichler, S., Chaturvedi, A., Eilers, M., et al. (2009)** „Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation.” *Blood* 113(26): 6567-71.

- Metzelder, S. K., Wollmer, E., Neubauer, a, & Burchert, a. (2010)** „[Sorafenib in relapsed and refractory FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia: a novel treatment option].” *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)* 135(38): 1852-6.
- Miller, D. G., Adam, M. a, & Miller, a D. (1990).** “Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection.” *Molecular and cellular biology*, 10(8), 4239-42.
- Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. (2000)** “Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways.” *Blood* 96: 3907-3914.
- Mizuno, T., Chou, M. Y., & Inouye, M. (1984).** “A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(7), 1966-70.
- Moriggl, R., Sexl, V., Kenner, L., Dutsch, C., Stangl, K., Gingras, S., Hoffmeyer, A., et al. (2005).** “Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis.” *Cancer cell*, 7(1), 87-99.
- Mui, A. L., Wakao, H., O’Farrell, A. M., Harada, N., & Miyajima, A. (1995).** “Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs.” *The EMBO journal*, 14(6), 1166-75.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. (1996)** “Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia.” *Leukemia* 10: 1911-1918.
- Namikawa R, Muench MO, de Vries JE, Roncarolo MG. (1996)** “The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin- 7 in promoting stromal-cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells in vitro.” *Blood* 87: 1881-1890.
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, a L., & Kitamura, T. (1999).** “STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells.” *The EMBO journal*, 18(17), 4754-65.
- Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A. L., Gorman, D., McMahon, M., Miyajima, A., et al. (1998).** “Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation.” *Molecular and cellular biology*, 18(7), 3871-9.
- Parmar, A., Marz, S., Rushton, S., Holzwarth, C., Lind, K., Kayser, S., Döhner, K., et al. (2011)** “Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first-generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors.” *Cancer research* 71(13): 4696-706.

- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C., & Fire, a. (2000).** “Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference.” *Molecular cell*, 6(5), 1077-87.
- Piloto, O., Wright, M., Brown, P., Kim, K.-T., Levis, M., & Small, D. (2007).** “Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways.” *Blood*, 109(4), 1643-52.
- Ponziani V., Gianfaldoni G., Mannelli F., Leoni F., S. C., Guglielmelli P., Antonioli E., Longo G., A. B. A., & Vannucchi, A. (2006).** “The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients.” *Leukemia*, (Figure 2), 2074-2076. doi:10.1038/sj.leu.2404368
- Rocnik, J. L., Okabe, R., Yu, J.-chen, Lee, B. H., Giese, N., Schenkein, D. P., & Gilliland, D. G. (2006)** „Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD.” *In Vitro* 108(4): 1339-1345.
- Rosnet O, Buhning HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D. (1996)** “Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells.” *Leukemia* 10: 238-248.
- Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE. (1996)** “The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro.” *Blood* 87: 1317-1325.
- Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K.-T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., et al. (2008).** “Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML.” *Blood*, 111(6), 3173-82.
- Sato, T., Yang, X., Knapper, S., White, P., Smith, B. D., Galkin, S., Small, D., et al. (2011).** “FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo.” *Blood*, 117(12), 3286-93.
- Schmidt-Arras, D., Böhmer, S.-A., Koch, S., Müller, J. P., Blei, L., Cornils, H., Bauer, R., et al. (2009).** “Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality.” *Blood*, 113(15), 3568-76.
- Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. (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.” *Blood* 100(1): 59-66.

- Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM. (1996)** “Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro.” *Blood* 87: 3563-3570.
- Smith, B. D., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K. M., et al. (2004).** “Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia.” *Blood*, 103(10), 3669-76.
- Stirewalt, D. L., Kopecky, K. J., Meshinchi, S., Engel, J. H., Pogossova-Agadjanyan, E. L., Linsley, J., Slovak, M. L., et al. (2006).** “Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia.” *Blood*, 107(9), 3724-6. doi:10.1182/blood-2005-08-3453
- Stocking, C., Bergholz, U., Friel, J., Klingler, K., Wagener, T., Starke, C., Kitamura, T., et al. (1993).** “Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line.” *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 8(3), 197-209.
- Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Klimek, V., Galinsky, I., Estey, E., Nimer, S. D., Grandin, W., et al. (2005)** “Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412.” *Blood* 105(1): 54-60.
- Thiede C, Studel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. (2002)** „Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia : association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis.” *Bone* 99(12): 4326-4335.
- Vallyathan, V., Shi, X., & Castranova, V. (1998).** “Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. “*Environmental health perspectives, 106 Suppl* (October), 1151-5.
- Vempati, S., Reindl, C., Kaza, S. K., Kern, R., Malamoussi, T., Dugas, M., Mellert, G., et al. (2007).** “Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential.” *Blood*, 110(2), 686-94.
- Weisberg, E., Boulton, C., Kelly, L. M., Manley, P., Fabbro, D., Meyer, T., Gilliland, D. G., et al. (2002)** “Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412.” *Cancer cell* 1(5): 433-43.
- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., et al. (2004).** “BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.” *Cancer research*, 64(19), 7099-109.

- Williams, D. A., Lemischka, I. R., Nathan, D. G., & Mulligan, R. C. (1984).** "Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse." *Nature*, 310(5977), 476-80
- Xia, Z., Baer, M. R., Block, A. W., Baumann, H., & Wetzler, M. (1998).** "Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts." *Cancer research*, 58(14), 3173-80.
- Xu, Q., Simpson, S.-E., Scialla, T. J., Bagg, A., & Carroll, M. (2003).** "Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation." *Blood* 102(3): 972-80.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. (2001)** "Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies." *Blood* 97: 2434-2439
- Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Khsima K, Matsuo Y, Naoe T. (1997)** "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines." *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 11(10): 1605-1609
- Zarrinkar, P. P., Gunawardane, R. N., Cramer, M. D., Gardner, M. F., Brigham, D., Belli, B., Karaman, M. W., et al. (2009)** "AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML)." *Blood* 114(14): 2984-92.
- Zhang S, Broxmeyer HE. (2000)** "Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase." *Biochem Biophys Res Commun* 277: 195-199.
- Zhang, S., Mantel, C. & Broxmeyer, H. E. (1999)** "Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells." *J. Leukocyte Biol.* 65: 372-380
- Zhang, B. S., Fukuda, S., Lee, Y., Hango, 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." *Journal of Experimental Medicine*, 192(5).
- Zhang, S., & Lo, S.-C. (2007).** "Effect of mycoplasmas on apoptosis of 32D cells is species-dependent." *Current microbiology*, 54(5), 388-95.

- Zhang, W., Konopleva, M., Shi, Y.-xi, McQueen, T., Harris, D., Ling, X., Estrov, Z., et al. (2008)** “Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia.” *Journal of the National Cancer Institute* 100(3): 184-98.
- Zhou, J., Bi, C., Janakakumara, J. V., Liu, S.-C., Chng, W.-J., Tay, K.-G., Poon, L.-F., et al. (2009)** “Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML.” *Blood* 113(17): 4052-62.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Fischer danke ich für die Übernahme der Dissertation in der Klinik für Hämatologie/ Onkologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Weiterhin möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und aller notwendigen Materialien im Forschungslabor der Hämatologie/ Onkologie bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Tina Schnöder für die praktische Anleitung in der Laborarbeit, die geduldige Beantwortung theoretischer Fragen und die ständige Motivation auch nach Rückschlägen nicht den Mut zu verlieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Thomas Mack für die Hilfe beim Erlernen von Arbeitstechniken und den regen wissenschaftlichen Austausch.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. med Florian Heidel, Dr. Marie-Christine Wagner, Patricia Arreba, Nomusa Mashamba, Akhilesh Datt Pandey, Stephanie Frey und Uta Schönborn für die nette Atmosphäre im Labor und zahlreiche hilfreiche Tipps bei der täglichen Arbeit.

Für die Durchsicht meiner Arbeit und für die Hilfe im Kampf mit Textverarbeitungsprogrammen mittels stundenlanger Telefonkonferenzen möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken.

Außerdem möchte ich Herrn Daniel Schindele für ständige moralische Unterstützung und liebevolle Aufbauarbeit nach stressigen Labortagen danken.

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Anne Ballaschk
Geburtsdatum: 17.09.1984
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

09/1991-08/1995 9. Grundschule Berlin Mitte
09/1995-07/2004 Georg-Friedrich-Händel-Oberschule Berlin
Abschluss: Abitur
10/2005-11/2011 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-
Universität Magdeburg
Abschluss: Staatsexamen 11/2011

Doktorarbeit

seit April 2008 Klinik für Hämatologie und Onkologie
Universitätsklinik Magdeburg unter der Betreuung von
Prof. Th. Fischer

Thema: Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von
Internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei
akuter myeloischer Leukämie

Berufliche Laufbahn

seit 04/2012 Assistenzärztin in Weiterbildung, Klinik für
Unfallchirurgie Otto-von-Guericke Universität
Magdeburg

Veröffentlichungen:

**Heidel, F. H., Mack, T. S., Razumovskaya, E., Blum, M.-C., Lipka, D. B.,
Ballaschk, A., Kramb, J.-P., et al. (2012).** 3,4-Diarylmaleimides-a novel class
of kinase inhibitors-effectively induce apoptosis in FLT3-ITD-dependent cells.
Annals of hematology, 91(3), 331–44.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei akuter myeloischer Leukämie

in der Klinik für Hämatologie und Onkologie
mit Unterstützung durch Prof. Dr. Thomas Fischer
ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine
anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.
Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur
Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner
Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Anne Ballaschk