

Biologische Charakterisierung von unterschiedlichen FLT3 internen Tandemduplikationen (ITD) in der akuten myeloischen Leukämie (AML)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplombiologe Thomas Sebastian Mack

geboren am 15.11.1982 in Wiesbaden

Gutachter: Prof. Thomas Fischer
Klinik für Hämatologie und Onkologie
Universitätsklinikum Magdeburg

Prof. Stefan Fröhling
Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen
Universität Heidelberg

eingereicht am: 25. Juni 2013

verteidigt am: 14. Januar 2014

- Meinen Eltern
Elisabeth und Karl-Ernst und
der Liebe meines Lebens-

Ein frei denkender Mensch
bleibt nicht da stehen,
wo der Zufall ihn hinstößt.
(Heinrich von Kleist)

Zusammenfassung:

Bei der AML wurden kürzlich ITD-Mutationen des *FLT3*-Gens in der Tyrosinkinasedomäne 1 (TKD1) mit Lokalisationsstellen innerhalb des Beta 1-Faltblatts, der Nukleotidbindeschleife und des Beta2-Faltblatts beschrieben. Multivariate Analysen aus klinischen Studien zeigten, daß die Lokalisation von *FLT3*-ITDs innerhalb des Beta 1-Faltblatts einen ungünstigen prognostischen Faktor für AML-Patienten darstellen. Kürzlich konnte unsere Gruppe einen neuen Mechanismus einer primären Resistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) in einem Patienten identifizieren, welcher eine Beta 2-Faltblatt-ITD an der Stelle 627 aufwies. Daher untersuchten wir die *in-vitro* Sensitivität von wachstumsfaktorabhängigen hämatopoetischen Zelllinien gegenüber TKIs, welche unterschiedliche, aus Patientenproben isolierte *FLT3*-ITDs exprimierten. Im Vordergrund standen dabei TKD1-ITDs, welche aus Patientenproben isoliert und in zwei Expressionsvektoren (pAL und pMSCV-Puromycin-IRES-GFP) subkloniert worden waren. Nachdem die beiden wachstumsfaktorabhängigen Zelllinien (Ba/F3 und 32D) stabil transfiziert bzw. transduziert worden waren, wurde zunächst das transformierende Potential untersucht. Weiterhin erfolgte eine Analyse der konstitutiven Phosphorylierung der mutierten *FLT3*-Rezeptoren sowie der Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege. Zur Untersuchung der Transformation wurden die Zellen in Methylcellulose-Medium nach IL-3-Entzug inkubiert. Induktion von Apoptose wurde nach Inkubation mit unterschiedlichen TKIs mittels Durchflusszytometrie bestimmt. *FLT3*-ITD Mutationen mit Lokalisationen in zwei unterschiedlichen Domänen wurden dabei näher untersucht: (1) Beta 1-Faltblatt (ITD611V(32) und ITD613E(33)) und (2) der Nukleotidbindeschleife (ITD620V(28)) des *FLT3*-Rezeptors. 32D- und Ba/F3-Zellen, welche diese ITD-Mutationen exprimieren, zeigten Koloniebildung in Methylcellulose-Medium, wachstumsfaktorunabhängige Proliferation nach IL-3-Entzug und konstitutive Phosphorylierung der *FLT3*-Rezeptorsignaltransduktion. Als Kontrolle dienten drei ITDs in der juxtamembranären Domäne; ITD598/599(12), ITD598/599(22) und ITD602R(7). Beta 1-Faltblatt-ITDs zeigten im Vergleich zu diesen Kontrollen signifikant weniger Apoptose gegenüber TKI-Behandlung (PKC412, Sorafenib und AC220). Die Ergebnisse deuten an, dass dieser Effekt in der Lokalisation der ITD innerhalb einer funktionellen Domäne des *FLT3*-Rezeptors und nicht in der Länge begründet liegt. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Untersuchung der Lokalisation der ITD-Mutationen aufgrund ihres möglichen Einflusses auf unterschiedliche Therapieoptionen (TKIs, Chemotherapie bzw. Stammzelltransplantationen) in aktuelle und zukünftige klinischen Studien eingeschlossen werden sollte.

Summary:

In AML, the recently described tyrosine kinase domain-1 (TKD1)-ITDs of *FLT3* are located within the beta 1-sheet, nucleotide binding loop and beta 2-sheet, respectively. Multivariate analysis of clinical data revealed that location of FLT3-ITDs within the beta 1-sheet of TKD1 is an unfavorable prognostic factor. Recently, we uncovered a novel mechanism of primary resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in a patient displaying an atypical localization within the beta 2-sheet-ITD (A627E). Here, we characterized *in-vitro* sensitivity to FLT3-TKI in growth factor dependent hematopoietic cell lines expressing a representative panel of FLT3-ITDs isolated from patient material. In particular, we compared sensitivity of beta 1-sheet ITDs with typical ITDs located in the juxtamembrane domain of FLT3. FLT3-ITDs isolated from patient material, were sequenced, subcloned in parallel into two expression vectors (pAL and pMSCV-Puromycin-IRES-GFP), and stably expressed in growth-factor dependent hematopoietic Ba/F3 cells and in parallel in 32D cells. Constitutive phosphorylation of FLT3-ITD receptors and of downstream signaling pathways was analyzed by Western-blotting. Transformation of Ba/F3 and 32D cells was investigated by colony formation assays and by withdrawal of IL-3. Induction of apoptosis in response to various concentrations of FLT3-kinase inhibitors was measured by flow-cytometry. Biological characteristics of *FLT3*-ITD mutations located in two different structural domains of FLT3-kinase were characterized: (1) beta 1-sheet-ITDs E611V(32) and Q613E(33) and (2) nucleotide binding loop-ITD A620V(28). Hematopoietic cells (32D and Ba/F3) expressing these ITD mutations showed colony formation in methylcellulose medium, growth-factor independent proliferation upon IL-3 withdrawal and constitutive phosphorylation of FLT3 signaling. Three ‘typical’ juxtamembrane domain (JMD) ITDs were used as controls; ITD598/599(12), ITD598/599(22) and ITDK602R(7). As compared to these JM-ITDs, we observed significantly less apoptosis of beta1-sheet-ITDs across all concentrations of FLT3-kinase inhibitors (PKC412, Sorafenib and AC220) applied. Our results indicate that differential sensitivity is rather an effect of ITD-localization within a functional domain of FLT3 and not necessarily conferred by the length of ITDs. Taken together, our data provide a rationale to prospectively analyze not only the *FLT3*-ITD mutation status or FLT3-ITD allelic ratio but also location of ITD-mutations in ongoing clinical trials as this may have direct impact on response to therapy (tyrosine kinase inhibitors, chemotherapy, allogeneic stem cell transplantation) in FLT3-ITD positive AML.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Summary

Abbildungsverzeichnis	I-II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV-VIII

1. Einleitung	1
1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)	1
1.2. Entstehung akuter myeloischer Leukämien	3
1.3. Rezeptortyrosinkinase FLT3	5
1.4. Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors.....	8
1.5. Mutationstypen des FLT3-Rezeptors	9
1.6. Inhibition von FLT3 durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) und Resistenzen	14
2. Zielsetzung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	20
3.1. Material	20
3.2. Methoden.....	29
3.2.1. Aufbereitung von humanen mononukleären Zellen.....	29
3.2.2. Molekularbiologische Methoden	29
3.2.2.1. Transformation von Bakterienkulturen	29
3.2.2.2. DNA-Präparation	30
3.2.2.3. Kryokonservierung.....	30
3.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.2.2.5. Präparation von mRNA.....	31
3.2.2.6. Synthese von cDNA (Reverse Transkription).....	31
3.2.2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
3.2.2.8. Restriktion von DNA-Fragmenten	32
3.2.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.2.2.10. Agarose Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA.....	33
3.2.2.11. Subklonierung mittels TOPO-System.....	33
3.2.2.12. In-Fusion-Klonierung.....	34
3.2.2.13. Sequenzierung von DNA-Molekülen.....	34
3.2.2.14. Verwendete Marker.....	34
3.2.3. Zellkultur.....	34
3.2.3.1. Kultivierung von Zelllinien.....	34
3.2.3.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien	35
3.2.3.3. Ermittlung der Zellzahl	35
3.2.3.4. Transfektion von Zelllinien mittels Elektroporation.....	36
3.2.3.5. Infektionen von Zelllinien	36

3.2.3.6.	Analyse des klonalen Wachstums von Zellen.....	36
3.2.4.	Proteinbiochemische Methoden	37
3.2.4.1.	Erstellung von Zelllysaten.....	37
3.2.4.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford	37
3.2.4.3.	„Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid“-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.2.4.4.	Immunchemischer Nachweis von Proteinen („Westernblotting“).....	38
3.2.4.5.	Immunpräzipitation	39
3.2.5.	Durchflusszytometrische „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) Analysen.....	40
3.2.5.1.	Messung der Apoptose	40
3.2.5.2.	Messung von Oberflächenproteinen	41
3.2.5.3.	Messung von intrazellulären Proteinen	41
3.2.5.4.	Behandlung von FLT3-ITD-transformierten Zellen mit Inhibitoren	42
3.2.6.	siRNA-Oligo-Behandlung.....	42
3.2.7.	Statisik.....	43
4.	Ergebnisse	44
4.1.	Identifikation und Charakterisierung von ITD-Mutationen innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne 1 (TKD1) von FLT3.....	44
4.1.1.	Identifikation von TKD1-Mutationen in <i>FLT3</i> -ITD-positive AML Patienten	44
4.1.2.	Stabile Expression der verschiedenen <i>FLT3</i> -TKD1-ITD in murinen hämatopoetischen Ba/F3-Zellen.....	46
4.1.3.	<i>FLT3</i> -TKD1-ITD-exprimierende Zellen zeigen ein IL-3-unabhängiges Wachstum.....	48
4.1.4.	<i>FLT3</i> -TKD1-ITDs weisen Apoptoseresistenz nach IL-3-Entzug auf	49
4.1.5.	TKD1-ITD-exprimierende Zellen zeigen konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie nachgeschalteter Signalwege	50
4.1.6.	Transformierte hämatopoetische Zellen sind abhängig von der <i>FLT3</i> -ITD-Mutation	52
4.2.	Inhibition der konstitutiv aktivierten FLT3-Rezeptoren durch Verwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren	53
4.2.1.	<i>FLT3</i> -ITDs in der TKD1-Domäne zeigen eine differentielle Apoptose-Induktion nach Tyrosinkinase-Inhibitoren-Behandlung	54
4.2.2.	FLT3-TKIs inhibieren die Tyrosin-Phosphorylierung von <i>FLT3</i> -ITDs sowie die nachgeschalteten Signalkaskaden	56
4.2.3.	Analyse alternativer Signalwege nach Inhibition der konstitutiven Aktivierung der FLT3-Rezeptoren mit einer Beta 1-Faltblatt-ITD	63
4.3.	Stabile Transduktion von hämatopoetischen Vorläuferzelllinien mit <i>FLT3</i> -TKD1-ITDs und <i>FLT3</i> -JM-ITDs	65
4.3.1.	<i>FLT3</i> -TKD1-ITDs sind aktivierende und transformierende Mutationen... 66	
4.3.2.	<i>FLT3</i> -TKD1-ITDs vermitteln eine differentielle Apoptose-Induktion nach Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung	71

4.3.3.	FLT3-TKIs inhibieren die Tyrosin-Phosphorylierung von FLT3 und STAT5 in Beta 1-Faltblatt-ITDs und JM-ITDs	73
5. Diskussion	76
6. Ausblick und zukünftige Untersuchungen	94
Literaturverzeichnis	96
Anhang		
Danksagung		
Lebenslauf		
Erklärung		

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie
- Abbildung 2: AML-assoziierte Genrearrangements und Mutationen
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors sowie der Kristallstruktur der intrazellulären Regionen.
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der FLT3-Signaltransduktion.
- Abbildung 5: ITD-Lokalisation und deren Einfluss auf die Prognose bei *FLT3*-ITD-positiven AML-Patienten
- Abbildung 6: Zusammenfassung von möglichen Resistenzmechanismen
- Abbildung 7: Darstellung der Lokalisation der in AML-Patienten identifizierten ITD-Mutationen in der JM- und TKD1-Domäne.
- Abbildung 8: Expression der unterschiedlichen *FLT3*-ITD-Rezeptoren (TKD1- und JM-ITD) in der murinen IL3-abhängigen Ba/F3-Zelllinie.
- Abbildung 9: IL-3-unabhängige Wachstum der *FLT3*-TKD1-ITD exprimierenden Ba/F3-Zellen.
- Abbildung 10: Apoptoseresistenz der mit *FLT3*-ITD-transfizierten Ba/F3-Zellen nach IL-3-Entzug.
- Abbildung 11: TKD1-ITD-Mutationen zeigen nach IL-3-Entzug eine konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie eine Aktivierung nachgeschalteter Signalwege.
- Abbildung 12: Ba/F3-ITD-exprimierende Zellen sind abhängig vom onkogenen FLT3-Rezeptor.
- Abbildung 13: Strukturformeln der verwendeten TKI.
- Abbildung 14: ITDs im Beta 1-Faltblatt des FLT3-Rezeptors zeigen eine verzögerte Apoptose-Induktion nach TKI-Behandlung in Ba/F3-Zellen.
- Abbildung 15: Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch Sorafenib und AC220.
- Abbildung 16: Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch AC220.
- Abbildung 17: Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch PKC412.

- Abbildung 18: Inhibition von ERK1/2 und Sensitivität gegenüber PKC412 in Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)-Zellen.
- Abbildung 19: PKC412 inhibiert die unterschiedlichen konstitutiv aktivierten *FLT3*-ITD-Rezeptoren.
- Abbildung 20: TKI-Behandlung führt nicht zu einer differentiellen Expression von Bcl-xL und Mcl-1 in den unterschiedlichen Ba/F3 *FLT3*-ITD Zellen.
- Abbildung 21: Darstellung der Lokalisation der in AML-Patienten identifizierten ITD-Mutationen in der JM-Domäne.
- Abbildung 22: GFP-Expression vor IL-3-Entzug und Apoptoseresistenz nach IL-3-Entzug der mit unterschiedlichen *FLT3*-Konstrukten transduzierten Ba/F3- und 32D-Zellen.
- Abbildung 23: TKD1-ITD- und JM-ITD-Mutationen zeigen nach IL-3-Entzug eine konstitutive Autophosphorylierung des *FLT3*-Rezeptors und eine Aktivierung von STAT5.
- Abbildung 24: Expression von ITDs im Beta 1-Faltblatt des *FLT3*-Rezeptors in Ba/F3- und 32D-Zellen zeigen eine verzögerte Apoptose-Induktion nach TKI-Behandlung.
- Abbildung 25: Inhibition der *FLT3*-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch AC220.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zusammenfassung der ITD-Lokalisation bei *FLT3*-ITD-positive AML-Patienten
- Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Suspensionszellen.
- Tabelle 3: Auflistung der verwendeten adhärenente Zellen.
- Tabelle 4: Auflistung des verwendeten Bakterienstamm.
- Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.
- Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Plasmide.
- Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Inhibitoren.
- Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Enzyme.
- Tabelle 9: Auflistung verwendeter Chemikalien.
- Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Geräte.
- Tabelle 11: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.
- Tabelle 12: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.
- Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Computerprogramme.

Abkürzungsverzeichnis

A280	Absorptionmaximum bei 280nm
A260	Absorptionmaximum bei 260nm
A230	Absorptionmaximum bei 230nm
A	Absorption [nm]
A	Alaninrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
Abb.	Abbildung
abs.	absolute
ALL	akute lymphatische Leukämie
Ala	Alaninrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
AML	akute myeloische Leukämie
Amp.	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	“Aqua destilata”, lat. destilliertes Wasser
Arg	Argininrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
AS	Aminosäure(n)
Bcl-1	“ <i>B cell lymphoma</i> ”
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	“Complementary DNA”, engl. komplementäre DNA
C/EBPalpha	“ <i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i> ”
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CR	komplette Remission
ddNTP	Di-Desoxy-NTP
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	„destilata“, lat. destilliert
DFG-Motiv	„Aspartat(D)-Phenylalanin(F)-Glycin(G)“
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
d.h.	dass heißt
DMF	N,N-Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
downstream	Engl. Stromabwärts
E	Glutamatrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
E	extrazellulär
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	„ <i>Extracellular-signal-regulated kinases</i> “
EtBr	Ethidiumbromid
et al.	et altera
ExPASy	„Expert Protein Analysis System“
Fa.	Firma
FAB	„ <i>French-American-British</i> “
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FCS	Fötale Kälberserum
FL	FLT3 Ligand
FLT3	„ <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i> “
FMS	„ <i>Fibroblast-macrophage stimulating factor</i> “
for	forward-(Primer)
G	Glycinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
GAPDH	„ <i>Glycerinaldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase</i> “
g	Einheit der Erdbeschleunigung (gravity)
°C	Grad Celsius
GFP	„Green fluorescent protein“
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutamatrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
Gly	Glycinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
h	Engl. „hour“ = Stunde
HPLC	„High-Performance Liquid Chromatography“
IC(50)	Die Konzentration, bei der 50 % der Zellen leben
IL-3	Interleukin 3
IL-7	Interleukin 7

IP	Immunpräzipitation
ITD	Interne Tandemduplikation
JM	juxtamembranär
JM-B	JM-Bindemotiv
JM-S	JM-Schaltermotiv
JM-Z	JM-Zippermotiv
K	Lysinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
kb	Kilo-Basenpaare (10^3 Basenpaare)
kD	Kilodalton
KI	Kinase-Insert
LB-Medium	„Luria Broth“; Bakterienmedium
λ	lambda
Lys	Lysinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
M	molar
mA	Milli-Ampere
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase
mRNA	messenger-RNA
MCS	„Multiple cloning site“ (multiple Klonierungsschnittstelle)
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
n	Anzahl durchgeführter Experimente
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
Neg	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPM1	„ <i>Nucleophosmin 1</i> “
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte

Oligo-(dT)	Oligo-Desoxy-Thymidin
ORF	“Open reading frame”
p	phospho (in Westernblotbeschriftungen)
p	statistische Wahrscheinlichkeit
PBS	“Phosphate buffered saline“
PCR	“Polymerase chain reaction”
PDGF	„ <i>Platelet derived growth factor</i> “
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidium Iodid
PIG	Puromycin-IRES-GFP-Vektor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC γ 1	Phospholipase C- γ 1
pmol	Picomol
R	Argininrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
Rel.	relativ
rev	reverse-(Primer)
RNA	Ribonukleinsäuren
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
S	Serinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
SB	“SYTOX® Blue dead cell stain”
SCF	„ <i>Stem cell factor</i> “
SDS-PAGE	“Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese”
Ser	Serinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
si	“small interfering”
STAT	“ <i>Signal transducer and activator of transcription</i> ”
T	Threoninrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	“Tris-Borat-EDTA”
TBST	“Tris-Buffered Saline Tween 20”
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin

Thr	Threoninrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
TKD1	Tyrosinkinase Domäne 1 (“N-lobe”)
TKD2	Tyrosinkinase Domäne 2 (“C-Lobe”)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TM	transmembranär
TMRE	Tetramethylrhodamine
tot	total
Tyr	Tyrosinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
UV	Ultraviolett
Val	Valinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
V	Volt
V	Valinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
WT	Wildtyp
Y	Tyrosinrest (bezogen auf die Proteinstruktur)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)

Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems. In Abhängigkeit vom klinischen Verlauf unterscheidet man akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien sind lebensbedrohliche Erkrankungen und durch einen aggressiven Verlauf gekennzeichnet. Sie führen unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tode. Charakteristisch für akute Leukämien sind Proliferation und Akkumulation von malignen unreifen hämatopoetischen myeloischen Zellen, die ihre Fähigkeit zur Differenzierung in funktionstüchtige Granulozyten und Monozyten verloren haben. Diese sogenannten Blasten entstehen in einem Mehrstufenprozess (Appelbaum, 2001) und vermehren sich unkontrolliert in Knochenmark und Blut. Durch diese entartete, unkontrollierte und stark vermehrte Bildung von Leukozyten und deren funktionsuntüchtigen Vorläuferstufen resultiert eine Verdrängung der normalen Hämatopoese (in Abb. 1 „blass“ dargestellt).

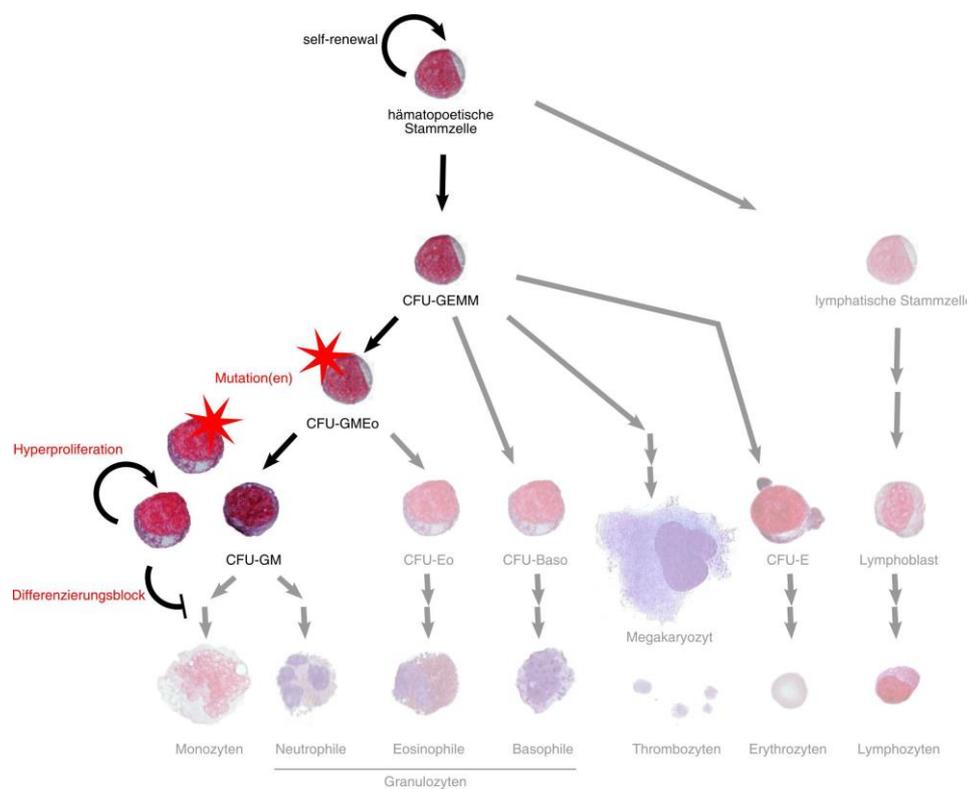


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie (nach Hoffbrand et al., 2003). Dargestellt ist eine somatische Mutation in Vorläuferzellen der myeloischen Reihe. Diese führt zu ungehemmter Proliferation und Akkumulation von unreifen Zellen, den sogenannten Blasten. Andere myeloische Linien bzw. unreifere Zellen können ebenfalls betroffen sein. Die Anreicherung von Blasten kann zur Verdrängung der normalen Hämatopoese („blass“Darstellung) führen.

Akute Leukämien treten in allen Altersstufen auf, wobei im Kindesalter über 90 % als akute lymphatische Leukämien (ALL) eingestuft werden. Dagegen sind akute myeloische Leukämien (AML) und ihre Unterformen mit ca. 80 % vermehrt im Erwachsenenalter zu verzeichnen (Gökbuget et al., 2005). Die Inzidenz einer AML beträgt 3,8 aus 100.000 Menschen pro Jahr mit einer leicht erhöhten Wahrscheinlichkeit bei Männern (Gökbuget et al., 2005). Das klinische Bild und die Symptomatik sind durch die zunehmende hämatopoetische Insuffizienz infolge der blastären Infiltration des Knochenmarks geprägt und führen dadurch zur Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie (Gökbuget et al., 2005). Um eine differenzierte Therapiestrategie für die Patienten zu gewährleisten, ist eine umfassende Diagnostik entsprechend der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) unerlässlich. Zur Einteilung der Erkrankung nach der WHO-Klassifikation (Tabelle 1) werden zur Diagnosesicherung neben Anamnese, Blutbild und Differentialblutbild vor allem zytologische, histologische, molekulargenetische und immunologische Verfahren verwendet. Sowohl eine zytogenetische als auch eine molekulargenetische Analyse von AML-Blasten ermöglicht eine auf der Pathogenese basierende prognostische Unterteilung der einzelnen AML-Typen. So sind chromosomale Rearrangements wie etwa balancierte Translokationen bzw. Inversionen (z.B. t(8;21)-Translokation oder Inversion auf Chromosom 16) mit einer guten Prognose, Deletionen (z.B. von Chromosom 5) hingegen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Haferlach und Schoch, 2002).

Trotzdem weisen 45 % der AML-Patienten keine dieser chromosomalen Aberrationen auf und werden als AML mit normalen Karyotyp (AML-NK) diagnostiziert. In dieser Gruppe werden molekulargenetische Techniken eingesetzt, um das Auftreten von somatischen Mutationen in Genen wie z.B. *FLT3*, *CEBPA* oder *NPM1* nachzuweisen. Diese besitzen eine starke prognostische Relevanz (Löwenberg et al., 2008; Schlenk et al., 2008; Mrozek et al., 2007). Dabei stellt die Anwesenheit einer Längenmutation im Gen der Rezeptortyrosinkinase „*FMS-like tyrosine kinase 3*“ (*FLT3*) einen der stärksten prognostischen Faktoren dar. Bei diesen Längenmutationen handelt es sich um interne Tandemduplikationen (ITD) der chromosomalen Sequenz. Solche Aberrationen treten häufig bei AML-NK-Patienten auf und erhöhen das Krankheitsrückfallrisiko. Sie beeinflussen darüber hinaus negativ das Überleben der AML-Patienten und müssen daher als negativer prognostischer Faktor angesehen werden (Brunet et al., 2012; Thiede et al., 2002; Schnittger et al., 2002; Fröhling et al., 2002; Whitman et al., 2001; Rombouts et al., 2000) (vgl. Abschnitt Mutationstypen des FLT3-Rezeptors).

Die Therapie einer AML wird mit kurativem Ziel durchgeführt, wobei sich die Prognose mit steigendem Alter zunehmend verschlechtert. Das allgemeine Therapieprinzip lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Induktionstherapie und Postremissionstherapie.

Ziel der Induktionstherapie ist die komplette Remission (CR). Das bedeutet eine Eliminierung der Blasten im peripheren Blut, die Regeneration der Hämatopoese (Thrombozyten > 100.000 Zellen/ μl und Neutrophilen > 1.000 Zellen/ μl) und ein Blastenanteil unter fünf Prozent. Das Standard-Induktionsprotokoll nach dem 7+3 Schema kombiniert eine siebentägigen Verabreichung von Cytarabin ($100 - 200\text{mg}/\text{m}^2$) gefolgt von einer dreitägigen Verabreichung eines Anthrazyklins (z.B. $45 - 90 \text{mg}/\text{m}^2$ Daunorubicin) (Gökbuget et al., 2005). In aktuellen Therapiestudien wird der Einfluss von vielversprechenden Kombinationstherapien mit Histonacetylasehemmern, Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und anderen Substanzen auf die CR-Rate bei AML-Patienten getestet (zusammengefasst von Kindler et al., 2010). Im Anschluss an die Induktionstherapie folgt die Postremissionstherapie, die auch als Konsolidierungstherapie bezeichnet wird. Nach der Induktionstherapie müssen Patienten, die in kompletter Remission sind, zwingend eine Konsolidierungstherapie erhalten. So soll ein Rezidiv, d.h. ein erneutes Auftreten der AML nach CR verhindert werden. Abhängig vom Risikoprofil des Patienten wird hierbei entweder eine Strategie der Hochdosistherapie oder eine Blutstammzelltransplantation durchgeführt (Gökbuget et al., 2005).

1.2. Entstehung akuter myeloischer Leukämien

Die Ursache einer AML ist eine maligne Entartung einer Vorstufe von myeloischen Vorläuferzellen des blutbildenden Systems (vgl. Abb. 1). Bei dieser Entartung treten eine bis mehrere Genmutationen ein, welche in Abwesenheit eines Wachstumsfaktors zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle führen. Dadurch entsteht gegenüber nicht entarteten Wildtypzellen ein Überlebensvorteil. Es wurden einige Risikofaktoren identifiziert, welche die Entstehung einer Leukämie verursachen können. Neben hohen Dosen Radioaktivität gehören zu den Risikofaktoren vor allem die Exposition gegenüber chemischen Substanzen (wie z.B. Benzole oder Pestizide) und einige Medikamente, welche zur Behandlung von Krebs eingesetzt werden (Brandts et al., 2010; Gökbuget et al., 2005). Es wird vermutet, dass diese Risikofaktoren zu Fehlern im Reparaturmechanismus führen und dadurch die jeweiligen Genmutationen entstehen lassen. Die AML ist klinisch, zytogenetisch und molekulargenetisch eine sehr heterogene Erkrankung. Chromosomale Rearrangements, die zu einem Fusionsgen führen sowie weitere Mutationen, welche bei AML-Patienten auftreten, sind in Abbildung 2 zusammengefasst (Falini et al., 2007). Bei den AML-Patienten mit normalen Karyotyp ist das

Gen der Rezeptortyrosinkinase „*FMS-like tyrosine kinase 3*“ (*FLT3*) neben genetischen Veränderungen von „*Nucleophosmin 1*“ (*NPM1*) eines der am häufigsten mutierten Aberrationen (Bacher et al., 2010; Falini et al., 2007).

Mehrere Untersuchungen von verschiedenen Onkogenen (u.a. *FLT3*-Mutationen, *K*- oder *N-Ras*-Mutationen, *AML1/ETO*- und *MLL*-Fusionsgene) in murinen Tiertransplantationsmodellen deuten daraufhin, dass die alleinige Expression dieser Onkogene in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen, den sogenannten Progenitoren, eine transformierende Eigenschaft besitzen. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der Hämatopoese und eine Expansion des Stammzell-Pools. Im Fall von *FLT3*-Mutationen ist die Ausprägung des chronischen Phänotyps abhängig von der Aktivität der Tyrosinkinase. Die konstitutive Aktivität der Kinase ist unabdingbar für die Ausbildung einer myeloproliferativen Erkrankung im Mausmodell, aber nicht suffizient für das Auftreten eines AML-Phänotyps. Untersuchungen in Mausmodellen haben gezeigt, dass die Progression einer myeloproliferativen Erkrankung in eine AML eine weitere Genmutation (Genrearrangements wie z.B. *AML1/ETO*- oder *MLL*-Fusionsgene) benötigt (Dash et al., 2001). Darum wird nach dem gegenwärtigen Leukämogenesemodell angenommen, dass mindestens zwei kooperative genetische Aberrationen gleichzeitig auftreten müssen (Gilliland und Griffin, 2002). Mittlerweile werden zwei Klassen an Mutationen unterschieden: Klasse 1 Mutationen (Kinasen, z.B. *FLT3*-Mutationen), welche den Zellen einen proliferativen bzw. einen Überlebensvorteil verleihen, aber nicht die Differenzierung affektieren. Dem gegenüber stehen Klasse 2 Mutationen (Fusionsgene bzw. Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *PML/RAR α* -, *AML1/ETO*- oder *MLL*-Fusionsgene), welche die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen und die Regulation der Apoptose negativ verändern (Gilliland und Griffin, 2002).

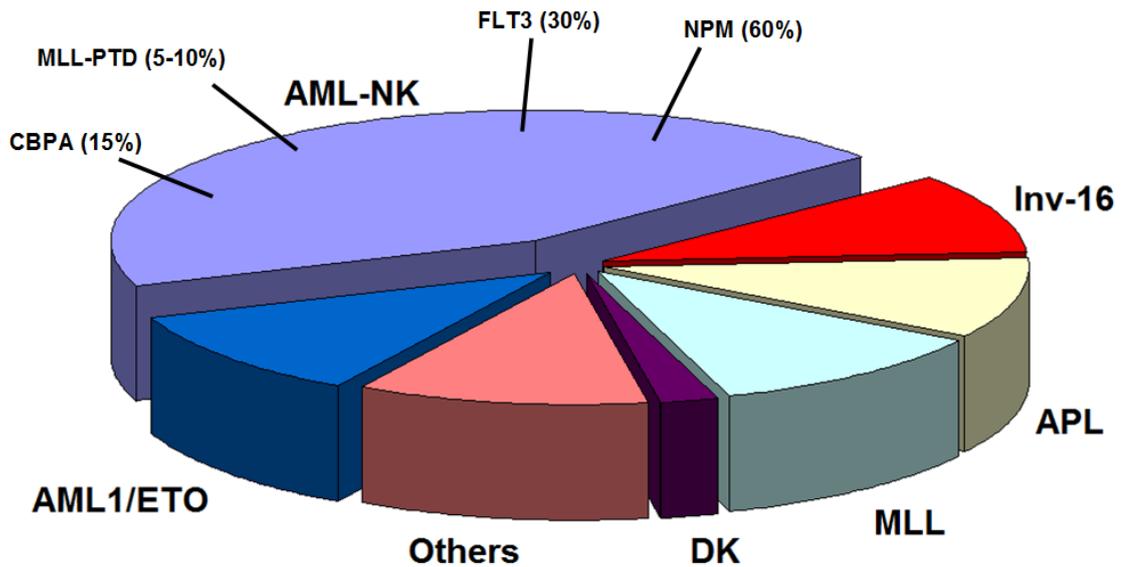


Abbildung 2: AML-assozierte Genrearrangements und Mutationen (modifiziert nach Falini et al., 2007). Bei der AML zeigen ungefähr 40 % der Patienten keine zytogenetischen Veränderungen und werden als AML mit normalen Karyotyp bezeichnet. In dieser Gruppe sind *FLT3*-Mutationen eine der häufigsten genetischen Aberrationen.

1.3. Rezeptortyrosinkinase *FLT3*

Die normale Hämatopoese ist ein komplex reguliertes System aus Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen. Die membranständige Rezeptortyrosinkinase *FLT3* spielt dabei als hämatopoetischer Wachstumsvermittler eine entscheidende Rolle in der zellulären Signaltransduktion und Kommunikation von hämatopoetischen Progenitoren. Die Expression von *FLT3* wurde für frühe lymphoide und myeloide Progenitoren beschrieben (Turner et al., 1996; Brasel et al., 1995; Rosnet et al., 1993; Birg et al., 1992; Matthews et al., 1991). Darüber hinaus tritt die Expression auch in lymphatischen Organen wie z.B. der Leber und der Plazenta auf (Zeigler et al., 1994; Maroc et al., 1993), wobei in Megakaryozyten, erythroiden Zellen und Mastzellen hingegen keine Expression von *FLT3* nachgewiesen werden konnte (Stirewalt und Radich, 2003). Neben dem hämatopoetischen System konnte gezeigt werden, dass auch im Nervensystem der *FLT3*-Rezeptor exprimiert wird (deLapeyrière et al., 1995; Ito et al., 1993). Boyer et al. (2011) haben in einem Mausmodell gezeigt, dass alle hämatopoetischen Zellen bei der Differenzierung zur ausgereiften Zelle ein *FLT3*-positives Zellstadium durchlaufen. In diesem streng regulierten System wird die Funktion des *FLT3*-Rezeptors durch die Aktivität seines Liganden (FL) bestimmt (Hannum et al., 1994; Lyman et al., 1993). Die Stimulation von isolierten murinen Knochenmarkszellen mit FL resultiert in einer Expansion von primitiven hämatopoetischen Progenitoren (Broxmeyer et al., 1995; Gabbianelli et al., 1995; Hirayama et al., 1995;

Hudak et al., 1995; Muench et al., 1995). Ebenso führt die Anregung von ruhenden humanen CD34⁺/CD38⁻ Knochenmarkszellen mit FL zu Proliferation und Überleben der Zellen (Haylock et al., 1997; Rusten et al., 1996; Shah et al., 1996; McKenna et al., 1995). Eine Ko-Stimulation mit weiteren Zytokinen, wie z.B. „*stem cell factor*“ (SCF) induziert sowohl bei murinen als auch bei humanen Progenitoren die Differenzierung in ausgereifte myeloide Zellen (Haylock et al., 1997; Shah et al. 1996; Piacibello et al., 1995). Darüber hinaus entsteht ein synergistischer Effekt zwischen FL- und Interleukin-7 (IL-7)-Stimulation bei der Expansion und Differenzierung von humanen und murinen lymphatischen pro-B-Zellen (Namikawa et al., 1996; Ray et al., 1996; Veiby et al., 1996). Trotz vieler Gemeinsamkeiten hinsichtlich Expression und Aktivierung des FLT3-Rezeptors durch seinen Ligand in Maus und Mensch zeigen sich aber dennoch Unterschiede zwischen diesen beiden Systemen. So ist der FL für humane CD34⁺/CD38⁻ Knochenmarkszellen unverzichtbar für die Proliferation der Zellpopulation in *in vitro*-Langzeit-Kultivierungsexperimenten (Haylock et al., 1997; Petzer et al., 1996), wohingegen im murinen System FL für diese Population in den gleichen *in vitro*-Experimenten nicht essentiell ist (Fujimoto et al., 1996).

Die membranständige Rezeptortyrosinkinase (RTK) wird durch das *FLT3*-Gen kodiert (Rosnet et al., 1991a). Das humane FLT3-Protein besitzt eine Länge von 993 Aminosäuren und zählt zur Klasse III der RTK (Carrow et al., 1996; Agnès et al., 1994). Neben den 16 anderen RTK-Klassen werden in der Klasse III alle Rezeptortyrosinkinasen eingeteilt, welche strukturell mit dem „Platelet-derived growth factor“ (PDGF)-Rezeptor verwandt sind (Rosnet et al., 1994; Agnes et al., 1993). Neben FLT3 zählen zu dieser Klasse noch PDGF, c-Kit und C-FMS (Rosnet et al., 1993; Andre et al., 1992; Rosnet et al., 1991(a); Rosnet et al., 1991b). Der FLT3-Rezeptor besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranären und einem intrazellulären Bereich. Der extrazelluläre Bereich setzt sich aus fünf immunoglobulinähnlichen Domänen zusammen und ist für die Bindung des Liganden verantwortlich. Die transmembranäre Domäne durchspannt die Zellmembran. Der intrazelluläre Bereich untergliedert sich in eine juxtamembranäre (JM) Domäne und zwei Tyrosinkinase-Domänen (TKD1 und TKD2), welche durch eine Kinase-Insert-Domäne verbunden sind (Rosnet et al., 1993(b)) (siehe Abb. 3A). Die JM-Domäne, welche eine autoinhibitorischen Funktion besitzt, kann in drei weitere topologische Komponenten eingeteilt werden (Griffith et al., 2004): Das N-terminale JM-Bindemotiv (JM-B) (AS572-578), das Schaltermotiv (JM-S) (AS579-592) und das C-terminale Zippermotiv (JM-Z) (AS593-603) (siehe Abb. 3B). Das JM-B berührt nach Computeranalysen trotz seiner kurzen fingerähnlichen Struktur alle wichtigen strukturellen Komponenten, welche für die Aktivierung des FLT3-Rezeptors entscheidend

sind (Knighton et al., 1991). Durch die Bindung an zentrale Flächen des FLT3-Rezeptors und den Kontakt zu weiteren Schlüsselkomponenten der katalytischen Domäne der TKD1 und TKD2 verdeckt das JM-B-Motiv knapp 80% der wasserlöslichen Proteinstruktur (Griffith et al., 2004; Knighton et al. 1991). Daher geht man davon aus, dass dieses Motiv die inaktive Struktur des FLT3-Rezeptors stabilisiert, indem es die Rotation des „N-lobe“ (TKD1) zum „C-lobe“ (TKD2) zur Bildung einer aktivierten Kinasestruktur verhindert (Griffith et al., 2004). Dem JM-B-Motiv folgt direkt das JM-S-Motiv, welches trotz seiner Größe (AS579-592) nur mit einem geringen Anteil des restlichen Proteins interagiert. Eine dominante Besonderheit stellen die beiden Tyrosine Y589 und Y591 dar, welche vermutlich eine essentielle Funktion für eine korrekte Struktur innerhalb der inaktiven FLT3-Kinase haben (Griffith et al., 2004). Man geht von einer ähnlichen Funktion bei dem JM-Z-Motiv (AS593-603) aus, welches die Gelenkdomäne (AS604-609) mit dem JM-S-Motiv verbindet. Die TKD-Domänen können ebenfalls in weitere funktionelle Domänen untergliedert werden. So besteht die TKD1 („N-lobe“) aus fünf Beta-Faltblättern. Die TKD2 („C-lobe“) ist dagegen vorwiegend aus Helices aufgebaut. Ähnlich wie bei anderen Kinasen ermöglicht die Kinase-Insert-Domäne eine Rotation der TKD1 entgegen der TKD2 zu der „inaktiven“ Kinase-Konformation (Huse et al., 2002). Entsprechend führt eine umgekehrte Rotation zu einer Annäherung katalytischer Proteinreste und somit zur „aktiven“ Kinase-Konformation (Griffith et al., 2004; Huse et al., 2002). Somit geht man vom folgenden Szenario der FLT3-Rezeptor-Aktivierung aus: Der FLT3-Rezeptor liegt in Abwesenheit des Liganden als inaktives monomeres Protein in der Plasmamembran vor. Dabei blockiert die JM-Domäne sterisch die ATP-Binde-Domäne des FLT3-Rezeptors (Griffith et al., 2004). Sobald der FL an die extrazelluläre Domäne des FLT3-Rezeptors bindet kommt es zu einer Konformationsänderung im intrazellulären Bereich des Rezeptors. Dies führt zu einer Dimerisierung mit einem zweiten FLT3-Rezeptor und einer Transphosphorylierung der JM-Domäne (Heldin et al., 1995; Turner et al., 1995). Es kommt zu einer Rotation der beiden TKD-Domänen, wobei ATP-Moleküle Zugang zum katalytischen Zentrum (ATP-Binde-Domäne) erhalten und damit eine komplette Aktivierung des FLT3-Rezeptors ermöglichen (Griffith et al., 2004). Durch weitere Phosphorylierungen binden Adapterproteine und aktivieren damit die intrazelluläre Signaltransduktion von Effektorproteinen (Stirewalt und Radich, 2003; Rossner et al., 1994; Lyman et al., 1993; Dosil et al., 1993). Dephosphorylierung durch Tyrosinphosphatasen führen hingegen zur Deaktivierung und Internalisierung des FLT3-Rezeptors (Arora et al., 2011; Schmidt-Arras et al., 2005).

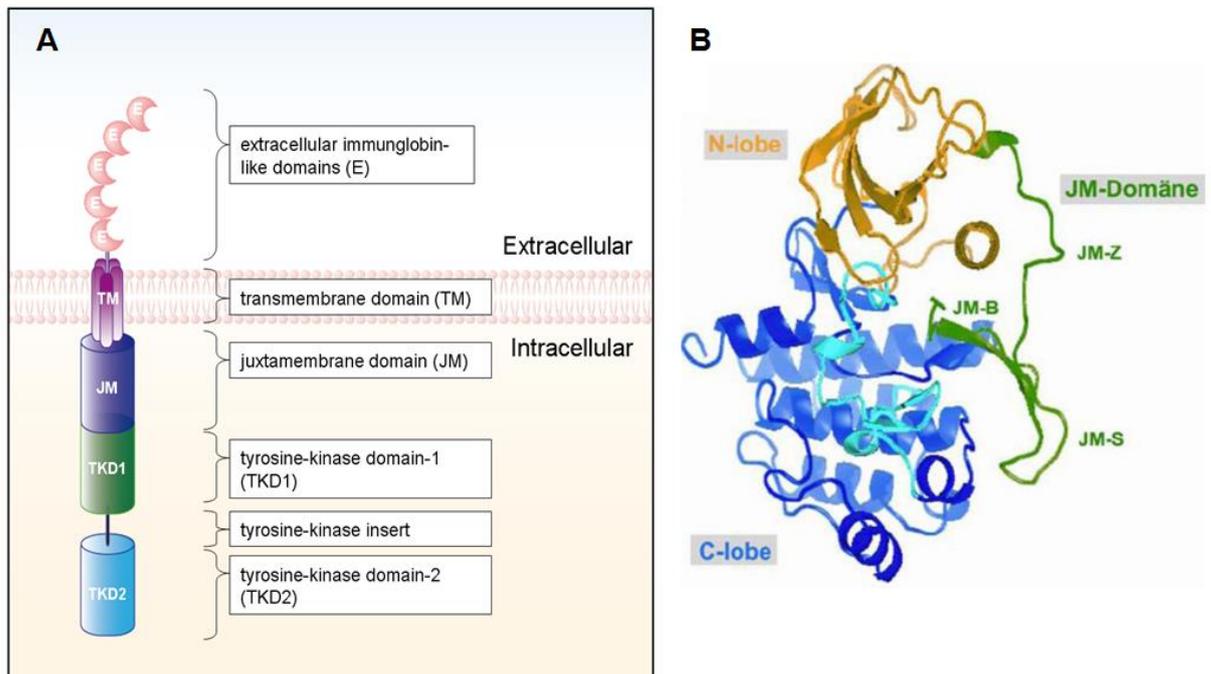


Abbildung 3: Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors sowie der Kristallstruktur der intrazellulären Regionen. A) Die schematische Darstellung zeigt den transmembranen FLT3-Rezeptor mit den fünf extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (E), die transmembranäre Domäne (TM), sowie den intrazellulären Bereich, bestehend aus der juxtamembranen Domäne (JM) und der Tyrosinkinasedomäne (TKD), welche sich aus zwei Tyrosinkinasedomänen (TKD1 und TKD2) zusammensetzt und durch das Tyrosinkinase-Insert verbunden wird. B) Die Kristallstruktur zeigt ein dreidimensionales Modell der Tyrosinkinase. Dargestellt ist die Tyrosinkinasedomäne mit der TKD1 („N-lobe“) (gelb), der TKD2 („C-lobe“) (blau) und der Aktivierungsschleife (cyan). Die grün gezeichnete juxtamembranäre (JM) Domäne hat eine wichtige autoinhibitorische Funktion im FLT3-Rezeptor (nach Reindl und Spiekermann, 2006).

1.4. Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors

Die ersten Analysen zur Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors wurden mit chimären Rezeptortyrosinkinasen durchgeführt, da der Ligand für die FLT3-Kinase noch nicht bekannt war. Hierbei wurde der extrazelluläre Bereich eines bis dahin bekannten Rezeptors mit dem intrazellulären Bereich des FLT3-Rezeptors zusammenkloniert und anschließend in der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 sowie in der murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3 exprimiert (Dosil et al., 1993; Lyman et al., 1993, Maroc et al., 1993). Die Expression des chimären Rezeptors führte nach Stimulation mit dem jeweiligen Liganden zur wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation der Zellen. Intrazelluläre Analysen zeigten, dass die Stimulation des chimären Rezeptors zu einer Aktivierung der Phospholipase C- γ 1 (PLC γ 1), „Ras guanosine triphosphatase (GTPase)- activating protein“, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), GRB2, SHC, SHIP, FYN und SRC führt (Dosil et al., 1993). Diese Ergebnisse konnten nach der Klonierung von FL bestätigt werden (Zhang et al., 1999). Weitere Studien mit dem nativen FLT3-Rezeptor zeigten, dass es durch die Stimulation mit

FL zur Assoziation von FLT3 mit GAB1, GAB2, SHP2 und CBL kommt (Zhang et al., 2000; Zhang et al., 1999; Lavagna-Sevenier et al., 1998). Die Phosphorylierung dieser Adapter-Proteine führt zur Aktivierung von nachgeschalteten Signaltransduktionswegen. So wird durch die Aktivierung von CBL, GAB2, SHIP und SHC die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) sowie AKT phosphoryliert (Zhang et al., 1999; Lavagna-Sevenier et al., 1998; Casteran et al., 1994; Rottapel et al., 1994), was in einer Steigerung des Zellmetabolismus durch die Modifikation des nachgeschalteten Protein-Translations-Initiationsfaktors eIF4E und der Serin-/Threonin-Kinase p70S6 resultiert (siehe Abb. 4). Parallel binden bei der Aktivierung des FLT3-Rezeptors die Adapterproteine GRB2 und GAB1 an die Kinase, was zur Initiation der „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Signaltransduktionskaskade führt (Casteran et al., 1994; Dosil et al., 1993). Daraus resultiert eine Phosphorylierung der „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK1/2) (Gilliland und Griffin, 2002), welche wiederum eine Reihe wichtiger Substrate wie z.B. RSK-Kinasen oder Transkriptionsfaktoren wie Elk1 oder Myc phosphoryliert. Diese sind entscheidend die Zellproliferation durch Translationsinitiation und beeinflussen den Zellzyklus durch Transkriptionsinitiation (Sheridan et al., 2008; Frödin und Gammeltoft, 1999) (siehe Abb. 4). Gleichzeitig inhibieren sowohl die PI3K/AKT- als auch die ERK1/2-Signaltransduktionskaskade die Apoptose durch Hemmung von pro-apoptotischen Proteinen der „B-cell lymphoma 2“ (Bcl-2)-Familie (Bax/Bad/Bim/Bid) (Yang et al., 2005). Andererseits wird der proteosomale Abbau von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (Mcl-1/Bcl-2/Bcl-xL) gehemmt (Stirewalt und Radich, 2003; Socolovsky et al., 1999; Lisovsky et al., 1996). Man hat herausgefunden, dass Teile dieser Signaltransduktionskaskaden bei der Leukämogenese ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (Gilliland und Griffin, 2002; Birg et al., 1994; DaSilva et al., 1994).

1.5. Mutationstypen des FLT3-Rezeptors

Die Aktivierung einer RTK ist in nicht-transformierten Zellen ein streng regulierter Prozess. Eine durch Mutationen hervorgerufene dysregulierte Aktivität der Kinase resultiert in gestörter und aberranter zellulärer Signaltransduktion und führt in den meisten Fällen zu wachstumsfaktorunabhängiger Proliferation der betroffenen Zelle. Von den bisher bekannten RTK sind mehr als die Hälfte an der Entstehung von malignen Erkrankungen beteiligt (Blume-Jensen und Hunter, 2001). So führen auch Mutationen des FLT3-Rezeptors zu gesteigerter proliferativen Kapazität und erhöhtem Überleben der leukämischen Zelle. Bei AML-Patienten mit normalen Karyotyp treten bis 40 % Aberrationen im Gen der

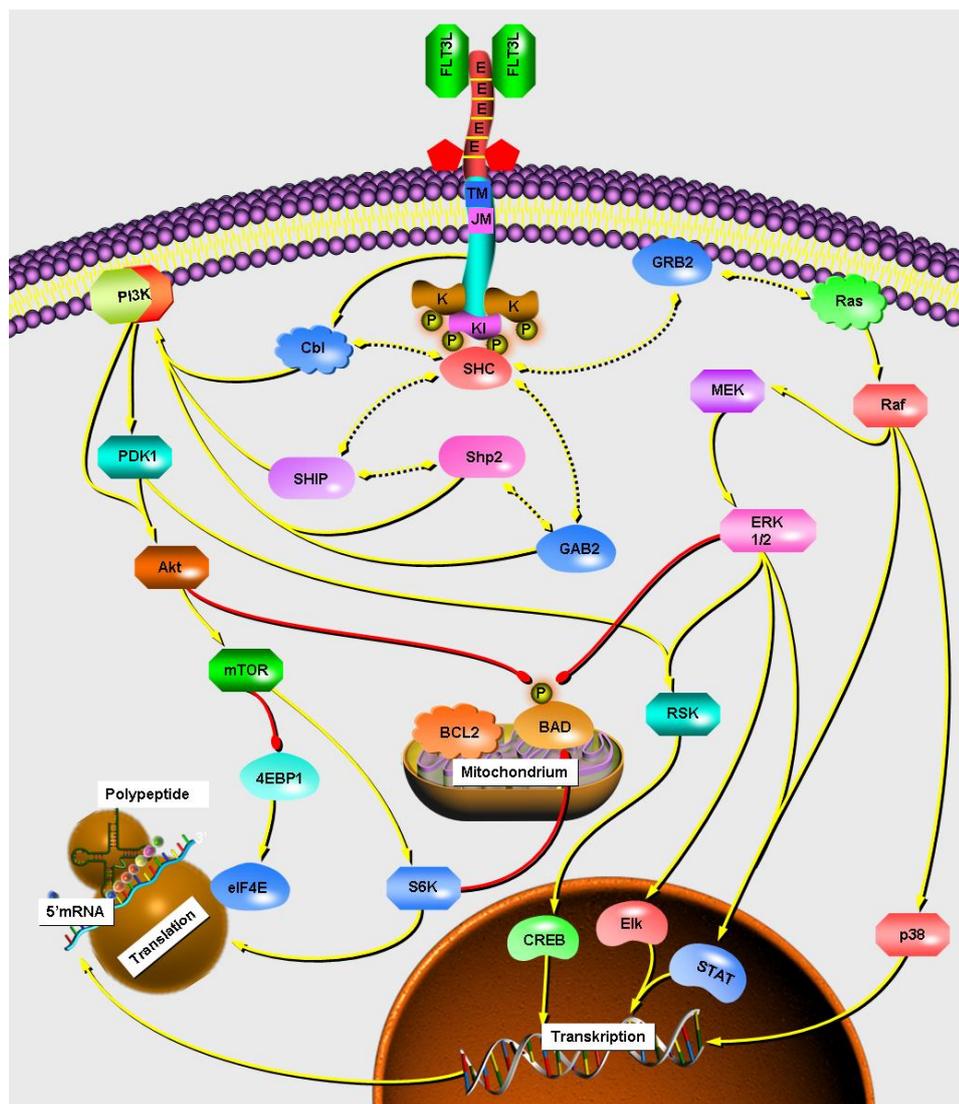


Abbildung 4: Schematische Darstellung der FLT3-Signaltransduktion. Die schematisch vereinfachte Abbildung zeigt die Signaltransduktion des FLT3-Rezeptors. Zentral steht der FLT3-Rezeptor (extrazelluläre Domänen (E), transmembranäre Domäne (TM), juxtamembranäre Domäne (JM), Kinasedomänen (K) und Kinase-Insert (KI) mit dem gebundenen FLT3-Ligand (FLT3L)). Die Aktivierung führt zur Signaltransduktionskaskade vom Rezeptor über diverse Adapter- und Effektorproteine zur Modifikation von Translation, Transkription und Erhalt des mitochondrialen Potentials (modifizierte Abbildung der Signalweg-Zeichen-Software „ProteinLounge“).

Rezeptortyrosinkinase *FLT3* auf und stellen damit eine der häufigsten Aberrationen in der AML dar (Kindler et al., 2010; Falini et al., 2007). Es werden dabei zwei verschiedene aktivierende Mutationstypen des FLT3-Rezeptors unterschieden: Interne Tandemduplikationen (ITD) in ungefähr 30 % (Kayser et al., 2009; Fröhling et al., 2002; Kottaridis et al., 2001; Nakao et al., 1996) und Punktmutationen in knapp 10 % der AML-Patienten (Heidel et al., 2006; Abu-Duhier et al., 2001; Yamamoto et al., 2001). In den meisten Fällen treten die Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der zweiten TKD des FLT3-Rezeptors auf. Beide Mutationstypen führen generell zur konstitutiven Aktivierung des

FLT3-Rezeptors. Einige Punktmutationen bilden hierbei jedoch Ausnahmen, da sie keine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors bzw. keine wachstumsfaktorunabhängige Proliferation der Zellen bewirken (Heidel et al., 2006). So konnte Fröhling et al. (2007) unter Verwendung einer Hochdurchsatz-Sequenzierungsanalyse zeigen, dass einige Punktmutationen abhängig von ihrer Position an der malignen Transformation beteiligt sind. Sie werden als sogenannte „driver“-Mutationen bezeichnet. Andere Punktmutationen wiederum tragen nicht zu der Tumorgenese bei und bleiben biologisch neutral. Diese Mutationen werden als „passenger“-Mutationen bezeichnet (Fröhling et al., 2007).

Die bisherigen Untersuchungen von *FLT3*-ITD-Mutationen deuten darauf hin, dass es sich bei diesem Mutationstyp um „driver“-Mutationen in der AML handelt (Smith et al., 2012; Fröhling et al., 2007). *FLT3*-ITD-Mutationen sind Längenmutationen, die auf Duplikationen der *FLT3*-Gensequenz beruhen. Diese führen zu einer direkten Wiederholung innerhalb der kodierenden Sequenz, einem sogenannten „Tandemrepeat“. Die Länge variiert dabei von drei bis zu mehr als hundert Nukleotiden (Yokota et al., 1997). Darüber hinaus können auch Einschübe von Nukleotiden auftreten, die nicht in der ursprünglichen *FLT3*-Sequenz vorhanden sind (Kayser et al., 2009). Die hohe Frequenz der ITD-Mutationen in der AML führte dazu, deren Einfluss auf den klinischen Verlauf und auf das Überleben von AML-Patienten zu untersuchen. So konnten mehrere unabhängige Studien zeigen, dass die Anwesenheit von *FLT3*-ITD-Mutationen einen signifikant negativen Effekt auf die Krankheitsprogression, das Rückfallrisiko und das Gesamtüberleben von AML-Patienten haben (Fröhling et al., 2002, Kottaridis et al., 2002; Kottaridis et al., 2001; Shih et al., 2002; Thiede et al., 2002; Rombouts et al., 2000; Kiyoi et al., 1999). Studien weisen auch darauf hin, dass die Präsenz einer *FLT3*-Mutation den klinischen Verlauf einer AML im Alter über 60 Jahren nicht signifikant beeinflusst, was sich plausibel durch den Fakt erklären lässt, dass die Prognose in diesem Altersbereich für die Erkrankung ohnehin wesentlich schlechter ist (Stirewalt et al., 2001). Darüber hinaus beeinflusst die Anwesenheit einer *FLT3*-ITD ebenso den klinischen Verlauf nach einer Stammzelltransplantation (Brunet et al., 2012). Zunächst wurde angenommen, dass *FLT3*-ITDs ausschließlich innerhalb der JM-Domäne lokalisiert sind. Breitenbuecher et al (2009), Kayser et al. (2009) und Schnittger et al. (2012) konnten zeigen, dass eine beträchtliche Anzahl (ungefähr 30 %) der ITD-Mutationen innerhalb der TKD1 lokalisiert sind, wobei Insertionen innerhalb des Beta 1-Faltblatts am häufigsten auftreten (ungefähr 25 %). In der Nukleotidbindungsschleife konnten bei 2 % und im Beta 2-Faltblatt in 1 % der AML-Patienten ITD-Mutationen nachgewiesen werden (Breitenbuecher et al., 2009, Kayser et al., 2009). Eine Auflistung von Breitenbuecher et al.

Tabelle 1: Zusammenfassung der ITD-Lokalisation bei *FLT3*-ITD-positive AML-Patienten (modifiziert nach Breitenbuecher et al., 2009). Durch Sequenzierungsanalysen von 753 *FLT3*-ITD-positiven AML-Patientenproben konnte gezeigt werden, dass ITDs zu einem beträchtlichen Anteil (~30 %) auch außerhalb der JM-Domäne lokalisiert sein können. Dabei befinden sich ungefähr 25 % der *FLT3*-ITDs im Beta 1-Faltblatt, welches von Aminosäure 610 bis 615 reicht. In der Nukleotidbinde-Domäne konnten 2 %, im Beta 2-Faltblatt 1,3 % und in den nachfolgenden Bereichen knapp 1 % ITD-Mutationen identifiziert werden.

Lokalisation der ITD-Mutation	Total n = 753
JM Domäne (AS 572 - 609)	537 (71.3%)
TKD-Domäne (AS 610 - >630)	216 (28.7%)
Beta1-Faltblatt (AS 610-615)	185 (24.6%)
Nukleotidbinde-Domäne (AS 616-623)	15 (2%)
Beta2-Faltblatt (AS 624-630)	10 (1.3%)
3' des Beta2-Faltblatt (AS >630)	6 (0.8%)

(2009) beschriebenen ITD-Mutationen mit ihrer Lokalisierung ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Eine retrospektive Studie mit 241 ITD-positiven AML-Patienten, welche nach dem Standard-Chemotherapie-Protokoll behandelt wurden, untersuchte den Einfluss auf die Prognose dieser neuen ITD-Lokalisation. Die Ergebnisse multivariater Analysen der Patientendaten führte überraschenderweise zu dem Resultat, dass die Lokalisation einer ITD-Mutation innerhalb des Beta1-Faltblatts das Erreichen der Remission und das Gesamtüberleben von Patienten signifikant verschlechtert (Kayser et al., 2009). Die Studie zeigt, dass Beta1-Faltblatt-ITDs einen negativen prognostischen Faktor für *FLT3*-ITD-positiven Patienten darstellt (siehe Abb. 5). Die Daten deuten daraufhin, dass diese neue ITD-Gruppe im Vergleich zu den übrigen womöglich einen divergenten biologischen Phänotyp ausbildet.

Neben den klinischen Analysen konnten experimentelle Untersuchungen zeigen, dass *FLT3*-ITDs zu einer konstitutiven Aktivierung des *FLT3*-Rezeptors und einer Aktivierung von nachgeschalteten Signaltransduktionswegen wie z.B. MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT5 führen (Brandts et al., 2005; Mizuki et al., 2000). Man geht davon aus, dass die Längenmutation durch ihre Integration die autoinhibitorische Funktion der JM-Domäne aufhebt, dadurch eine unkontrollierte Autophosphorylierung des *FLT3*-Rezeptors ermöglicht (Kiyoi et al., 2002) und somit die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege herbeiführt (Griffith et al., 2004). Neben der Aktivierung der erwähnten Signalwege werden weitere Signalkaskaden wie z.B. proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie durch unterdrückte

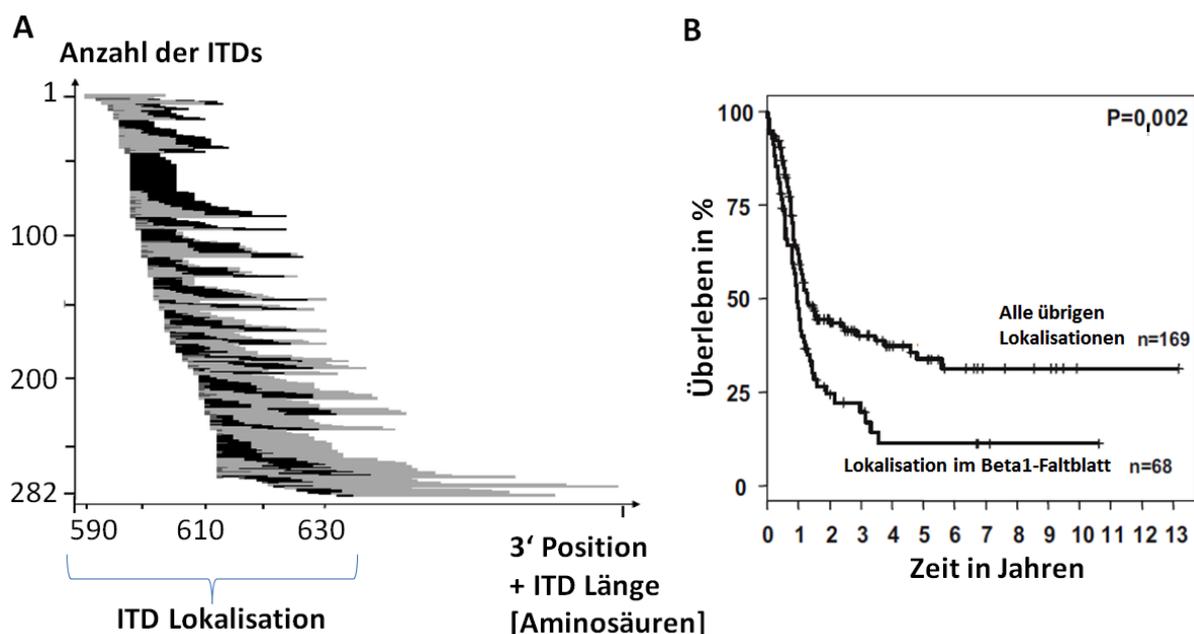


Abbildung 5: ITD-Lokalisation und deren Einfluss auf die Prognose bei *FLT3*-ITD-positiven AML-Patienten (modifiziert nach Kayser et al., 2009). A) Darstellung der Korrelation zwischen Lokalisation und Länge einer ITD-Mutation: Durch Sequenzierungsanalysen von 241 *FLT3*-ITD positiven AML-Patientenproben konnte gezeigt werden, dass ITDs zu einem beträchtlichen Anteil (~30 %) auch außerhalb der JM-Domäne lokalisiert sein können. Hierbei zeigte sich, dass je weiter die ITD-Lokalisation in 3'-Richtung liegt desto länger sind die Mutationen. B) Darstellung der Überlebenszeit-Analyse als Kaplan-Meier-Kurve: chemotherapeutisch behandelte *FLT3*-ITD-positive Patienten mit ITD-Lokalisationen im Beta1-Faltblatt haben eine signifikant schlechtere Prognose im Vergleich zu den übrigen *FLT3*-ITD-Mutationen.

Foxo3a-Transkription oder gesteigerte Pim1-Expression inhibiert (Kim et al., 2005; Scheijen et al., 2004; Minami et al., 2003). Zusätzlich wird aufgrund der aberranten Signaltransduktion der *FLT3*-ITD die myeloide Differenzierung durch Suppression von RGS2, PU.1 und „CCAAT/enhancer-binding protein alpha“ (C/EBPalpha) unterdrückt (Schwäble et al., 2005; Zheng et al., 2004; Mizuki et al., 2003). Gleichzeitig kommt es zu einer gesteigerten Expression der Proteine des kanonischen „Wingless-type“ (Wnt)-Signalwegs einschließlich des Rezeptors Frizzled-4 und beta-Catenin. Experimentelle Untersuchungen deuten auf eine Synergie zwischen der onkogenen *FLT3*-ITD- und der Wnt-Signaltransduktionskaskade bei der Transformation myeloider Zellen hin (Tickenbrock et al., 2005).

Aktuellere Studien konnten zeigen, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) einen starken Einfluss auf die Aktivität von Phosphatasen haben (Östman et al., 2011). So wird zum Beispiel die *FLT3*-WT-Phosphorylierung von der Phosphatase DEP-1 kontrolliert (Arora et al., 2011). Eine veränderte Aktivität durch ein ITD-gesteigertes ROS-Level führt zur Inaktivierung von DEP-1 und resultiert in einer gesteigerten *FLT3*-Phosphorylierung (Godfrey et al., 2012). Trotz der bisherigen Erkenntnisse über die aberrante

Signaltransduktion des mutierten FLT3-Rezeptors ist bis dato unklar, ob die verschiedenen Lokalisationen einer ITD innerhalb einer funktionellen Domäne (JM-Domäne versus TKD-Domäne) unterschiedliche Signaltransduktionswege aktivieren.

1.6. Inhibition von FLT3 durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) und Resistenzen

Durch das häufige Auftreten von mutierten Tyrosinkinasen in verschiedenen onkologischen Erkrankungen stellen diese Moleküle sehr interessante Zielstrukturen für therapeutische Ansätze dar. FLT3-Mutationen treten als eine der häufigsten Aberrationen bei der NK-AML auf und sind aktivierende und transformierende Mutationen (Mizuki et al., 2000), die zu einer myeloproliferativen Erkrankung im Mausmodell führen (Kelly et al., 2002). Aufgrund dessen wuchs die Idee, die konstitutiv aktivierte FLT3-Kinase durch chemische Substanzen zu inhibieren. Dieser Ansatz wurde besonders durch Untersuchungen zur Aktivität des ABL-Kinase-Inhibitors Imatinib Mesylate bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und bei der Blastenkrise von CML-Patienten bestärkt (Sattler et al., 2003; le Coutre et al., 1999; Deiniger et al., 1997; Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996). Darüber hinaus validieren kürzlich publizierte Forschungsergebnisse von Smith et al. (2012) ITD-Mutationen des FLT3-Rezeptors als ein therapeutisches Ziel in der AML und unterstützen daher die Rationale Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) weiterzuentwickeln. Innerhalb der letzten Dekade sind verschiedene sogenannte „small molecules“ zur Inhibition von aktivierten Kinasen entwickelt worden. Das Prinzip dieser Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) basiert auf einer kompetitiven Blockade der Aktivierung der Kinase durch ATP (Shawver et al., 2002). *In vitro* Daten konnten zeigen, dass eine Reduzierung der Kinaseaktivität auf 15 % im Vergleich zum Normallevel einen zytotoxischen Effekt in den Zellen induziert (Levis et al., 2011). Mittlerweile existieren bereits zwei Generationen an vielversprechenden TKIs, welche in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen wirkungsvoll die konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors inhibieren können. Die letztliche Effizienz der TKIs am Patienten wird derzeit in unterschiedlichen klinischen Studien getestet (Swords et al., 2012). Zur ersten TKI-Generation zählen unter anderem Midostaurin (PKC412), Lestaurtinib (CEP-701) und Sorafenib (BAY 43-9006). Sie werden auch als Mehrziel-Kinaseinhibitoren bezeichnet, welche sich durch eine Spezifität gegenüber der FLT3-Kinase auszeichnen, aber auch Effekte gegenüber anderen Kinasen besitzen (Zarrinkar et al., 2009). Erste Untersuchungen mit dem Staurospin-Derivat Midostaurin an Zelllinien, die eine *FLT3*-ITD-Mutation aufweisen, zeigten eine starke Inhibition des FLT3-Rezeptors bei 10 nM und eine Inhibition des Wachstums bei 30 nM (Weisberg et al., 2002). Im Mausmodell führte die Behandlung mit

Midostaurin zu einer Unterdrückung der leukämischen Progression (Weisberg et al., 2002). Auch Sorafenib und Lestaurtinib zeigten starke Inhibition von mutierten FLT3-Rezeptoren *in vitro* und *in vivo* (Zhang et al., 2008; Knapper et al., 2006; Levis et al., 2006). Diese vielversprechenden Daten führten zur Einleitung klinischer Studien. Die Ergebnisse der aktuellsten Studie zu Midostaurin zeigen eine gute Verträglichkeit und eine hohe biologische Aktivität, was in 71 % der Patienten zu einer Reduktion der Blasten im peripheren Blut oder im Knochenmark führte (Fischer et al., 2010). Diese Ergebnisse implizieren, weitere Studien, vor allem in Kombination mit Chemotherapeutika, durchzuführen. Ein erstes Ergebnis einer randomisierten Studie mit dem TKI Lestaurtinib, einem Indolocarbazol-Derivat, an 224 *FLT3*-mutierten AML-Patienten, welche nach Chemotherapie mit dem TKI behandelt wurden, zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede in der Remissionsrate erzielt werden konnten (Levis et al. 2011). Studienergebnisse zu Sorafenib werden in naher Zukunft erwartet.

Zur neuen Generation der FLT3-TKIs zählen AC220 und Tandutinib (MLN-518). Beide Substanzen zeigen hohe Spezifität gegenüber mutierten FLT3-Rezeptoren bei gleichzeitig geringen unspezifischen Effekten auf andere Kinasen *in vitro* und *in vivo* (Zarrinkar et al., 2009; Griswold et al., 2004). Die Studien mit Tandutinib verdeutlichen, dass der Einsatz dieser Substanz bei der AML wegen der schlechten Pharmakokinetik nur sehr eingeschränkt möglich ist (Swords et al., 2012). Dahingegen zeigt AC220 eine hohe Bioaktivität, gute Verträglichkeit und eine lange effektive Halbwertszeit von anderthalb Tagen.

Trotz der vielversprechenden Daten der klinischen Studien können generell Behandlungsmisserfolge auftreten. Diese werden durch Resistenzen verursacht, sodass durch intrinsische Mechanismen das eigentliche Therapieziel ausbleibt (zusammengefasst von Kindler et al., 2010). Hierbei kann zwischen primärer und sekundärer Resistenz unterschieden werden. Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Resistenzmechanismen ist in Abbildung 6 dargestellt. Bei der primären Resistenz handelt es sich um einen bereits bestehenden Mechanismus einer leukämischen Zelle, welcher meist erst durch die Behandlung in den Vordergrund tritt. Stone et al. (2005) gehen davon aus, dass 30 % der AML-Patienten bereits eine primäre Resistenz aufweisen. So zeigten Patientenproben trotz kompletter Inhibition des FLT3-Rezeptors aktivierte Signaltransduktion von STAT5 und ERK1/2 (Knapper et al., 2006), was auf einen, vom mutierten FLT3-Rezeptor unabhängigen Mechanismus hinweist. Demgegenüber stehen primäre Resistenzen die von FLT3 abhängig sind. So scheinen unterschiedliche Mutationstypen (Punktmutationen versus Längenmutationen) unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber TKIs aufzuweisen. Grundler et

al. (2003) führte *in vitro*-Analysen an unterschiedlichen Punktmutationen in der Aktivierungsschleife des FLT3-Rezeptors durch, die verschiedenen TKIs exponiert wurden. Die Daten zeigen, dass unterschiedliche Punktmutationen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber den TKIs aufweisen. Der Einfluss verschiedener *FLT3*-ITD-Mutationen (JM-ITD versus TKD-ITD) ist bis dato weitgehend unbekannt. Einen Hinweis lieferte eine spezifische *FLT3*-ITD-Variante innerhalb des Beta 2-Faltblatts der TKD1-Domäne (ITDA627E). Diese konnte in einer Patientenprobe identifiziert werden und zeigte ein Resistenzverhalten gegenüber FLT3-TKIs (Breitenbuecher et al., 2009b). Die Resistenz wird in dieser speziellen Mutante über eine phosphorylierungs-unabhängige Bindung des Adapter-Moleküls GRB2 am FLT3-Rezeptor vermittelt. Dadurch kommt es zum Anstieg der Mcl-1-Aktivität und zum Schutz der Zelle vor Apoptose durch FLT3-TKI-Inhibition. Im Gegensatz zu dem FLT3-unabhängigen primären Resistenzmechanismus führt eine Suppression der FLT3-Expression zur Apoptose der leukämischen Zelle und zeigt deren onkogene Abhängigkeit (Breitenbuecher et al., 2009b). Diese Daten deuten darauf hin, dass TKD1-ITD-Mutationen generell zu einem primären Resistenzphänotyp führen können. Das lässt die Vermutung zu,

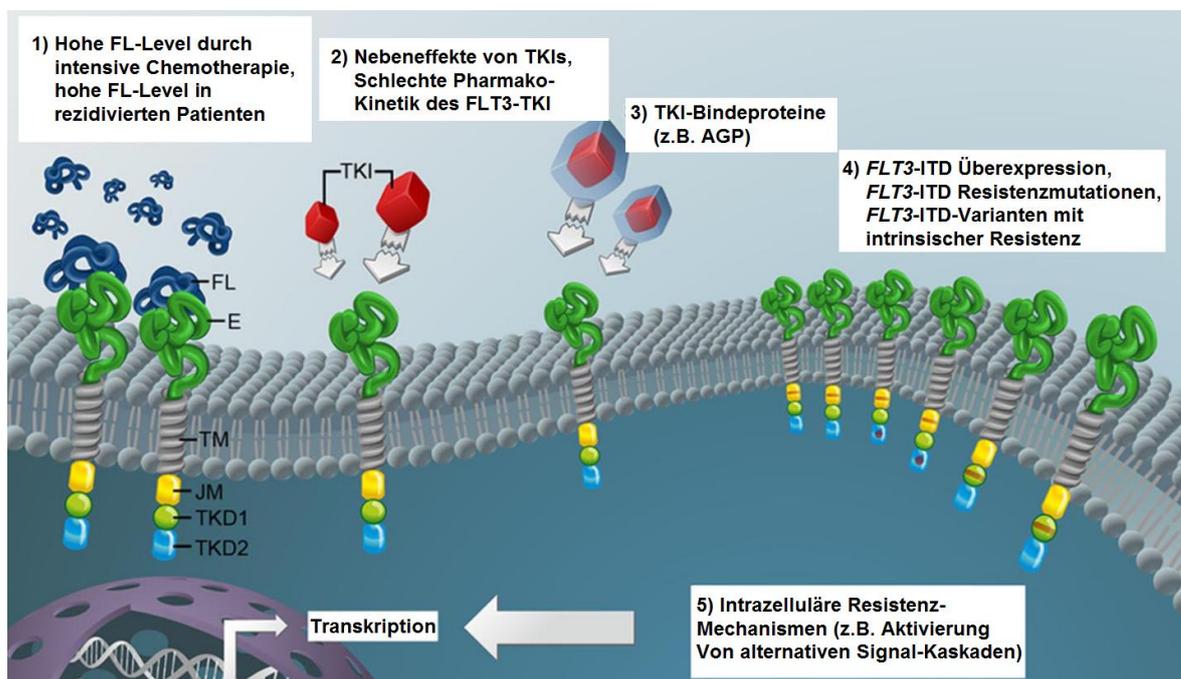


Abbildung 6: Zusammenfassung von möglichen Resistenzmechanismen (modifiziert nach Fischer, 2011). 1. Hohe Level an FLT3-Ligand (FL) hemmen durch Bindung an die extrazelluläre Domäne (E) oder durch Interaktion mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) dessen Bioaktivität. 2. Schwache pharmakokinetischen Eigenschaften des TKI. 3. Blockade des TKI durch Bindeproteine wie z.B. „alpha-1 acid glykoprotein“ (AGP). 4. Überexpression von mutierten FLT3-Rezeptoren oder Resistenzmutationen in der juxtamembranären (JM) Domäne bzw. der Tyrosinkinase-Domäne (TKD). 5. Aktivierung von intrazellulären Resistenzmechanismen.

dass unterschiedliche FLT3-ITD-Mutationen (JM-ITD- versus TKD-ITD-Mutationen) verschiedene biologische Phänotypen durch Aktivierung divergenter Signalkaskaden ausbilden und dadurch unterschiedlich auf Chemotherapie oder TKI-Behandlung reagieren. Den primären Resistenzen stehen die sekundären Resistenzen gegenüber. Ein Großteil der Patienten die FLT3-TKIs als Einzel-Substanz-Therapie erhalten, profitiert nur kurzzeitig von der Therapie. Zumeist konnte in den Patientenproben nur eine transiente Inhibition der FLT3-Kinase beobachtet werden (Knapper et al, 2006; Levis et al., 2006). Es kommt zu einer nicht ausreichenden Zytotoxizität und folglich zu keiner Induktion der Apoptose des leukämischen Klons. Dies ist in vielen Fällen durch die Aneignung einer weiteren Mutation innerhalb des FLT3-Rezeptors bedingt; man spricht hier von einer sekundären Resistenz (Kindler et al., 2010). Darüber hinaus können andere autokrine Mechanismen eine Rolle bei der Resistenzvermittlung spielen: Die systematische Analyse von FL im Plasma von AML-Patienten nach Chemotherapiebehandlung führte zu dem Ergebnis, dass im Vergleich zum Normalplasmalevel von 3 pg/ml diese Patienten eine Erhöhung von über 100 % aufwiesen (Sato et al., 2011). Ein nachgestellter erhöhter FL-Spiegel führte *in vitro* zu dem Resultat, dass AML-Zelllinien eine stark verminderte Antwort auf verschiedene Behandlungsmethoden (Chemotherapie/TKI) aufwiesen (Sato et al., 2011). Daneben haben Studien gezeigt, dass TKI-Behandlung zu einer erhöhten Expression und gleichzeitig einer erhöhten Lokalisation des FLT3-Rezeptors in der Membran der leukämischen Zelle führen kann, was in einer Reduktion der Effizienz des TKIs resultiert (Sato et al., 2011). Einen alternativen Mechanismus stellt die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden wie z.B. die Aktivierung von IKK der NFkappa-B-Kaskade oder konstitutive Aktivierung von ERK1/2 oder AKT dar (Grosjean-Raillard et al., 2008; Piloto et al., 2007).

2. Zielsetzung der Arbeit

Eigene Daten und Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen lassen vermuten, dass die Lokalisationen von ITDs innerhalb der TKD1, im speziellen Fall innerhalb des Beta 1-Faltblatts des FLT3-Rezeptors zu einer differenziellen Biologie *in vitro* und *in vivo* bei der AML führen (Breitenbuecher et. al. 2009, Kayser et. al. 2009). Da die Biologie der TKD1-ITD-Mutationen des FLT3 Rezeptors nur punktuell untersucht sind, wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Breitenbuecher et. al. (2009) beschrieb einen neuen ITD-Mutationstyp innerhalb der TKD1 des FLT3-Rezeptors. In seiner Arbeit charakterisierte er eine spezielle Variante im Beta 2-Faltblatt der TKD1 des FLT3-Rezeptors. Zur Analyse von *FLT3*-TKD1-ITD-Mutationen sollten daher zunächst mehrere unterschiedliche TKD1-ITDs (Nukleotidbinde-Domäne und Beta 1-Faltblatt-Domäne) in *FLT3*-ITD-positiven AML-Patientenproben durch Sequenzierung identifiziert und anschließend in verschiedene Expressionsvektoren (pAL/pMSCV-Puromycin-IRES-GFP) subkloniert werden. Im Anschluss sollte überprüft werden, ob die verschiedenen Expressionsvektoren in hämatopoetischen Zelllinien (32D und Ba/F3) stabil transfiziert bzw. transduziert und die Konstrukte in diesen Zellen exprimiert werden können.

2. Die klinische Prognose für AML-Patienten mit einer ITD-Mutation des FLT3-Rezeptors ist signifikant schlechter im Vergleich zu Patienten, die diese Mutation nicht aufweisen (Schnittger et al., 2002; Thiede et al., 2002; Kottaridis et al., 2001; Meshinchi et al., 2001; Abu-Duhier et al., 2000; Rombouts et al., 2000; Kiyoi et al., 1999). Die Auswertung von Daten aus drei klinischen Studien zeigte, dass Lokalisationen von *FLT3*-ITDs im Beta 1-Faltblatt der TKD1 die Prognose verschlechtert (Kayser et al., 2009). Um die Auswirkung der Expression von *FLT3*-TKD1-ITDs zu charakterisieren, sollten die in Punkt 1 generierten Zelllinien (32D und Ba/F3) im Vergleich zu bisher bekannten *FLT3*-ITDs auf ihr transformierendes Potential, die konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie die Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege untersucht werden.

3. Die Inhibition von konstitutiv aktivierten FLT3-Rezeptoren stellt eine vielversprechende Therapieoption bei der Behandlung von AML dar (Smith et al., 2012; Swords et al., 2012; Kindler et al., 2011). Doch treten bei 30 % der AML-Patienten primäre Resistenzen auf (Stone et al., 2005). Ein primärer Resistenzmechanismus gegenüber TKIs konnte für die

FLT3-TKD1-ITD mit der Lokalisation an der Aminosäureposition 627 beschrieben werden (Breitenbuecher et. al. 2009). Zugleich zeigen die Daten von Kayser et al. (2009), dass ITD-Mutationen im Beta 1-Faltblatt im Vergleich zu den übrigen Mutationen biologisch divergent sind, was zu einem resistenten Phänotyp gegenüber Chemotherapie führt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit das Verhalten verschiedener *FLT3*-ITDs des Beta 1-Faltblatts gegenüber der Behandlungen mit TKIs der ersten und zweiten Generation *in vitro* ermittelt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Suspensionszellen.

Zelllinien	Firma/Herkunft
32D parental (murine Knochenmark-Zelllinie)	DSMZ Braunschweig
Ba/F3 parental (murine pre-B-Zelllinie)	DSMZ Braunschweig
Ba/F3 ITDE611V(32)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITDG613E(33)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITDA620V(28)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITD598/599(12)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITDK602R(7)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITD598/599(22)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 FLT3-WT_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
32D ITDE611V(32)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
32D ITDG613E(33)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
32D ITDA620V(28)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
32D ITD598/599(12)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
32D ITDK602R(7)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
32D ITD598/599(22)_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
32D FLT3-WT_PIG	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITDE611V(32)_pAL	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITDG613E(33)_pAL	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITDA620V(28)_pAL	Erstellt in dieser Arbeit
Ba/F3 ITD598/599(12)_pAL	Mizuki et al., 2000
Ba/F3 FLT3-WT_pAL	Mizuki et al., 2000

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten adhärenzte Zellen.

Zelllinien	Firma
293T (humane embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie)	DSMZ, Braunschweig
WEHI-3B Zellen	DSMZ, Braunschweig

3.1.2. Bakterienstämme

Tabelle 4: Auflistung des verwendeten Bakterienstamm.

Bakterienstamm	Eigenschaft	Firma
One shot Top 10 chemically competent <i>E.coli</i>	F-Φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK-, mK+), phoA, supE44, λ-thi-1, gyrA96, relA1	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3. Oligonukleotide

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Primer	Sequenz (5' →3'-Orientierung)	T _m [Grad]
Seq_FLT3_For1	ATCTGCTTCCATCACACTGC	57,3°C
Seq_FLT3_For2	AACTCCTCAGACCACATTGC	57,3°C
Seq_FLT3_For3	GTGCTGTGCATAACAATTCCC	57,3°C
Seq_FLT3_For4	ACTCAAGATGATGACCCAGC	57,3°C
Seq_FLT3_For5	ATAATGCAATCCTGCTGGGC	57,3°C
Seq_FLT3_Rev1	AAATTAGGGAAGGATGGCCG	57,3°C
Seq_FLT3_Rev2	CTGAGATTTGATCCGAGTCC	57,3°C
Seq_FLT3_Rev3	TCTCTTTCAGAGCTGTCTGC	57,3°C
Seq_FLT3_Rev4	GTGCCAAGGGAATTGTATGC	57,3°C
Seq_FLT3_Rev5	TGAACACTTCTTCCAGGTCC	57,3°C
FLT3_xhoI_fw	GGAATTAGAAAACAAAGCACTCGAGGAGG	69°C
FLT3_xhoI_rev	GGAATCACTACTCATGATATCTCGAGCCAATCC	71°C
MSCV_PIG_for	CCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACC	66°C
MSCV_PIG_rev	CAGCGGGGCTGCTAAAGCGCATGC	69,6°C
FLT3_BamH1rev	CGGGATCCGGCTACGAATCTTCGACCTGAGCCT	72°C
FLT3_for2_HindII	CAAAGCTTCATGCCGGCGTTGGC	72°C

3.1.4. Plasmide

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Größe in kb	Firma/Herkunft
TOPO-pCR4	~4,0 kb	Invitrogen, Karlsruhe

Plasmid	Größe in kb	Firma/Herkunft
pAL FLT3-ITD598/599(12)	~9,6 kb	Mizuki et al., 2000
pMAM/BSD	~7,6 kb	Mizuki et al., 2000
pITDE611V(32)_PIG	~11 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITDG613E(33)_PIG	~11 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITDA620V(28)_PIG	~11 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITD598/599(12)_PIG	~11 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITDK602R(7)_PIG	~11 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITD598/599(22)_PIG	~11 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITDE611V(32)_pAL	~9,6 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITDG613E(33)_pAL	~9,6 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pITDA620V(28)_pAL	~9,6 kb	Erstellt in dieser Arbeit
PIG_empty	~ 8 kb	Addgene
pFLT3-WT_PIG	~11 kb	Erstellt in dieser Arbeit
pFLT3-WT_pAL	~9,6 kb	Mizuki et al., 2000

3.1.5. Inhibitoren

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Inhibitoren.

Inhibitoren	Firma
Midostaurin (PKC412)	Novartis, Basel, Schweiz
Sorafenib (BAY 43-9006)	Bayer, Leverkusen
Quizartinib (AC220)	Ambit Biosciences, San Diego, CA, USA
UO-126 (MEK1/2 Inhibitor)	Cell Signaling, Boston, MA, USA

3.1.6. Enzyme

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Enzyme.

Enzym	Firma
HiFi PCR-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
BamHI	NEB, Ipswich England
HindIII	NEB, Ipswich England
BglII	NEB, Ipswich England
XhoI	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

3.1.7. Chemikalien

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Chemikalien.

Substanz	Firma
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Asparagin	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
BSA, Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Complete	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Gibco® DPBS (1 x)	Invitrogen, Karlsruhe
Gibco® DMEM (1 x)	Invitrogen, Karlsruhe
Gibco® L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe

Substanz	Firma
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessenzielle AS, 10-fach konzentriert	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmocin™ Prophylactic	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Protein G PLUS-Agarose	Santa Cruz, Heidelberg
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)	Serva, Heidelberg
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylrhodamine (TMRE)	Invitrogen, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen

3.1.8. Verwendete Geräte

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Geräte.

Firma	Gerät
Binder	CO ₂ -Inkubator CB210
BD	Durchflusszytometer „Calibur“
	Durchflusszytometer „FACS Canto II“
Invitrogen	Mikroporator
Eppendorf	Mikrozentrifuge 5415R
Heraeus Instruments	Bakterienschüttler
QeqLab	Fusion FX7

Firma	Gerät
Thermo Scientific	Zentrifuge „Multifuge 3SR+“
VWR	Zellkulturbank
Zeiss	Mikroskop „Primo Vert“

3.1.9. Verwendete Antikörper

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Antikörper	Epitop	Firma
Anti-phospho-FLT3	Tyr 591	Cell Signaling
Anti-FLT3	C-Terminus	Santa-Cruz
Anti-phospho STAT5A/B	Tyr 694/ 699	Millipore
Anti-STAT5A	C-Terminus	Cell Signaling
Anti-phospho AKT	Ser473	Cell Signaling
Anti-AKT	C-Terminus	Cell Signaling
Anti-phospho-ERK1/2	Thr202/Tyr204	Cell Signaling
Anti-ERK1/2	C-Terminus	Cell Signaling
Anti-Mcl-1	Interne Region	Rockland
Anti-β-Actin	N-Terminus	Sigma Aldrich
Anti-GAPDH	Interne Region	Meridian Life Science
Anti-α-Maus IgG-HRP	IgG	Santa Cruz
Anti- α-Rabbit IgG-HRP	IgG	Cell Signaling
Anti-Bcl-xL	Interne Region	Cell Signaling
Anti-FIZ1	C-Terminus	ProteinTech Group

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Antikörper	Firma
Muriner anti-humanen CD135-PE Ig κ light chain	BD Biosciences
murinen anti-humanen Ig κ light chain Antikörper	BD Biosciences

3.1.10. Software

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Computerprogramme.

Firma	Software	Applikation
PrimerFox	PrimerFox Analyzing Tool	Primererstellung
IDT integrated Device	IDT Scitools Oligoanalyzer	Primererstellung
MetaBion	OligoCalc Properties Analyzer	Primererstellung
Tree star	FlowJo Software	Analyse von FACS-Daten
GraphPad Software	GraphPad Prism 5	Dokumentationssoftware
ProteinLounge	ProteinLounge Software	Erstellung von Signaltransduktionswegen
Thermo Scientific	ND-1000 Software	Analyse von DNA-Gehalt
Tecan	TECAN Magelan Software	Analyse von Protein-Gehalt
PEQLAB Biotechnologie	FUSION FX-7 Software	Immundetektion
DNASTAR	DNASTAR Lasergene 8	Sequenzauswertung

3.1.11. Standardlösungen und Puffer

Additiva

1x PBS	100 ml
1x PBS mit β -Mercaptoethanol (175 μ l/ 500 ml PBS)	100 ml
Hepespuffer, 1 M, pH 7,2 steril	100 ml
Natriumpyruvat, 100 mM	100 ml
L-Glutamin, 200 mM	100 ml
Nichtessenzielle AS, 10-fach konzentriert	60 ml
Asparagin (10 mg/ml)	20 ml

Die Lösung wurde steril filtriert und 29 ml auf 500 ml RPMI1640 eingesetzt.

5 x TBE Puffer

Tris	27 g
Borsäure	13,9 g
Na ₂ EDTA	1,1625 g
H ₂ O	ad 500 ml

10 x Western Blot Puffer

Tris	30,25 g
Glycin	144 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Japan-Lysepuffer

Hepespuffer, 1 M, pH 7,4 steril	50 mM
Glycerol	10 %
NaCl	150 mM
TritonX100	1 %
MgCl ₂	1,5 mM
EGTA	5 mM
H ₂ O	ad 1000 ml

10x TBST-Puffer

NaCl	150 mM
Tris	50 mM
Tween 20	0,05 %
H ₂ O	ad 500 ml

Transferpuffer

10 x Western Blot Puffer	100 ml
H ₂ O	700 ml
Methanol	200 ml

siRNA Puffer

KCl	60 mM
Hepespuffer, 1 M, pH 7,4 steril	6 mM
MgCl ₂	0,2 mM

SDS-Probenpuffer

Tris, pH 6,8	250 mM
Glycerol	50 %

Material und Methoden

SDS	10 %
β-Mercaptoethanol	25 %
Bromphenol Blau	1 Spatelspitze

Stripping-Puffer

SDS	20 g
Tris	15,14 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Zu 100 ml Lösung werden 700 µl Mercapto-Ethanol

LB-Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
H ₂ O	ad 1000 ml

LB-Agar-Platten

LB-Medium	500ml
Bacterio Agar	7,5 g

Die Lösung wurde autoklaviert, mit Ampicilin (50mg/ml) versetzt und gegossen.

3.2. Methoden

3.2.1. Aufbereitung von humanen mononukleären Zellen

Zur Trennung von mononukleären Zellen und Separation von Leukozyten wird gängigerweise eine physikalische Methode basierend auf Zentrifugation verwendet. Hierbei nutzt man die unterschiedlichen Sedimentationskonstanten von Blutzellen durch ein Saccharosepolymer-Gemisch mit einer Dichte von 1.077 g/ml. Zur Separation wurde Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare, München) verwendet. Peripheres Blut bzw. Knochenmarksproben von AML Patienten wurden nach Zustimmung und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki entnommen und entsprechend gelagert. Die Laborstudie zu *FLT3*-ITD-Mutationen isoliert aus Patientenproben wurde von der lokalen Ethikkommission überprüft und freigegeben. Zur Aufbereitung der Proben wurde heparinisierte Blutproben mit 1 x PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. In ein 50 ml Falcon-Gefäß wurden 10 ml Ficoll-Paque-Lösung vorgelegt, mit 30 ml verdünnter Blutprobe überschichtet und bei 1500 rpm für 30 min zentrifugiert. Der separierte Zellring mit den angereicherten Lymphozyten wurde in ein neues Gefäß überführt, zweimal gewaschen, ausgezählt und für weitere Applikation wie z.B. RNA-Extraktion verwendet oder bei -80 °C weggefroren.

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. Transformation von Bakterienkulturen

Bei einer Transformation nehmen kompetente Bakterienzellen freie DNA-Moleküle auf. Die hier durchgeführten Transformationen wurden mittels Hitzeschock erreicht, wobei die Membran der kompetenten Zellen unter der Einwirkung des Hitzeimpulses permeabel wird und dadurch die DNA-Moleküle in die Zelle aufgenommen werden.

Es wurden jeweils 2 µl des Ligationsansatzes bzw. des Plasmids mit 100 µl kompetenter TOP10-Zellen gemischt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Dieses wurde für 30 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden mit 400 µl vorgewärmtem SOC-Medium gemischt und für eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Von dem Transformationsansatz wurden je 100 µl auf LB-Agarplatten mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht im Inkubator (Heraeus Holding, Hanau) kultiviert. Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin inokkuliert und bei 37 °C im Bakterien-Schüttler (Carl Roth, Karlsruhe) inkubiert.

3.2.2.2. DNA-Präparation

Zur Isolation von geringen Plasmid-Mengen (<20 µg), die in Bakterien vermehrt wurden, wird standardmäßig eine Mini-Präparation durchgeführt. Hierfür wurden 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin mit dem jeweiligen Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Das „QIAprep® SpinMiniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) wurde entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

Werden für spezielle Applikationen, wie z.B. Transfektionen, höhere Mengen an Plasmid (>20 µg) benötigt können diese mit Hilfe des „QIAGEN® Plasmid Maxi Prep Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert werden. Dafür wurde eine Vorkultur (5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) mit dem jeweiligen Klon angeimpft und für 6 h inkubiert. Im Anschluss in 200 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Das „QIAGEN® Plasmid Maxi Prep Kit“ wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die aufgereinigten Plasmide wurden entweder direkt für weitere Reaktionen (Restriktionen, Sequenzierungen oder Transfektionen) verwendet oder bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3. Kryokonservierung

Zur dauerhaften Lagerung von transformierten Bakterienkulturen wurden sogenannte Kryokulturen erstellt. Hierfür wurden von einer Übernachtskultur 800 µl mit 200 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

3.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mittels einer photometrischen Messung der optischen Dichte (OD) bei einem Wellenlängenbereich von 260 nm bis 280 nm lassen sich die Konzentration und die Reinheit einer Nukleinsäurelösung ermitteln. Doppelsträngige DNA erreicht ihr maximales Absorptionsspektrum bei 260 nm (A_{260}), Proteine hingegen bei 280 nm (A_{280}).

Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorptionsmaxima bei 260 nm zu 280 nm kann die Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen ermittelt werden. Das Verhältnis der Absorptionsmaxima von A_{260} zu A_{230} spiegelt Phenol- bzw. Salzverunreinigungen wider. Für reine dsDNA liegt der optimale Wert A_{260}/A_{280} bei 1,8 und für reine RNA bei 2. Der Wert A_{260}/A_{230} liegt bei reinen Nukleinsäurelösungen meist über dem der A_{260}/A_{280} , generell aber bei einem Wert von 1,9 bis 2,3. Für eine Bestimmung wurde das Gerät „NanoDrop 1000“ (Thermo Scientific, Wilmington, USA) mit je einem Mikroliter der Probe beladen. Als

Referenz diente das Lösungsmittel der Probe. Mit der Software „ND1000“ (Thermo Scientific, Wilmington, USA) wurde die Messung analysiert und dokumentiert.

3.2.2.5. Präparation von mRNA

Die Isolierung der RNA wurde entsprechend der Angaben des „RNAeasy Mini Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.6. Synthese von cDNA (Reverse Transkription)

Bei der reversen Transkription werden mit der Reversen Transkriptase RNA-Moleküle in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Startpunkt der Synthese können unspezifische aber auch genspezifische Primer dienen. Das entstehende Produkt ist hierbei ein DNA-RNA-Hybrid.

Für die Erststrangsynthese wurde das vom Hersteller der „OmniScript® Reverse Transcription“ (Qiagen, Hilden) beigefügte Protokoll unter Einsatz eines Oligo-dT-Primers, der aus einer reinen Abfolge von Thymidinen besteht, verwendet. Um den Erfolg der Erststrang-cDNA-Synthese zu überprüfen wurde eine PCR durchgeführt.

3.2.2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

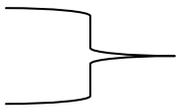
Mit der Methode der Polymerasekettenreaktion können gewünschte Fragmente einer bekannten Sequenz mit Hilfe von Primern in sich wiederholenden Zyklen exponentiell vermehrt werden. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie zwischen 18 und 45 Nukleotiden lang sind, einen GC-Gehalt von 40 bis 60 Prozent besitzen und keine „Hairpin“-struktur ausbilden. Zusätzlich dürfen die Primer keine Dimere bilden. Hierfür wurden die Primer auf ihre Selbstkomplementarität sowie auf Komplementarität gegenüber des zweiten Primers überprüft.

Die oben aufgelisteten Primer wurden mittels der computergestützten Online-Programmen „Primerfox“, „IDT Scitools Oligoanalyzer“ und „Oligo Properties Analyzer“ erstellt und auf die oben erwähnten Eigenschaften kontrolliert.

Für die PCR wurde das „FastStart High Fidelity PCR System“ (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) eingesetzt und ein 50 µl Ansatz mit folgender standardmäßigen Zusammensetzung erstellt:

2 µl	Matrizen DNA (Plasmid-DNA oder cDNA)
1 µl	Forward Primer (10 pmol/µl)
1 µl	Reverse Primer (10 pmol/µl)
1 µl	dNTP Mix (10 pmol je Nukleotid)
5 µl	PCR Reaktionspuffer (10x)
0,3 µl	Hifi-Polymerase-Mix
x µl	Aqua dest. ad 50 µl
50 µl	Gesamtansatz

Eine Amplifikation der DNA-Fragmente besteht aus den sich wiederholenden Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation, die standardisiert nach folgendem Schema ablaufen:

1. Initiationsschritt:	94 °C für 5 min		40 Zyklen
2. Denaturierungsschritt:	94 °C für 30 sec		
Annealingschritt:	x °C für 30-45 sec		
Elongationsschritt:	72 °C für 90 sec		
3. Finalisationsschritt:	72 °C für 12 min		
4. Lagerungsschritt	4 °C für ∞		

Das „x“ des Annealingschritts steht für die spezifische Anlagerungstemperatur der Primer, die sich aus der Schmelztemperatur des Primers abzüglich zwei Grad errechnet. Die Parameter sowie die Zusammensetzung des Ansatzes bei der PCR wurden gemäß der obengenannten Schemata erstellt, durchgeführt und gegebenenfalls optimiert. Für die Durchführung wurde der Thermocycler „PEQSTAR“ (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) verwendet.

3.2.2.8. Restriktion von DNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen werden verwendet um sequenzspezifisch DNA-Moleküle zu schneiden. Das geschnittene DNA-Moleküle kann mit einem zweiten DNA-Molekülen aufgrund von komplementärer Sequenzhomologie mit einander zu einem DNA-Molekülen ligiert werden (vgl. Abschnitt Ligation und Klonierung von DNA-Molekülen). Andererseits können Restriktionen eingesetzt, um zu überprüfen, ob Klone FLT3-Fragmente enthalten. Für den Verdau wurden die Restriktionsendonukleasen entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt. Restriktionsansätze wurden bei 37 °C für 2 h inkubiert und anschließend bei -20 °C zur Inaktivierung der Enzyme eingefroren.

Die Restriktionen wurden anschließend mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft.

3.2.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation werden mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase freie 3'-Hydroxy-Gruppen mit freien 5'-Phosphatgruppen verbunden. In dieser Arbeit wurden zu 100 ng aufgereinigten PCR-Fragments jeweils 2 µl zuvor restringierter pAL-Vektor (50 ng/µl), T4 DNA Ligase Puffer (10x) und T4 DNA Ligase (2 Units/µl) pipettiert und mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz für mindestens 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 2 µl des Ansatzes für eine Transformation verwendet.

3.2.2.10. Agarose Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA

Hinter der Gelelektrophorese verbirgt sich eine analytische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren in einer Gelmatrix mittels eines elektrischen Felds. Die Gelmatrix besteht aus Agarose, welche nach Aufkochen in Elektrophoresepuffer ein engmaschiges Netz bildet.

Da die Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Je nach Größe und Ladung der Nukleinsäure bewegt sich diese unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix, wodurch sich mehrere Nukleinsäurefragmente ihrer Größen nach auftrennen lassen. Dabei ist die Wandergeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer Größe (Takahashi et al., 1969).

Zur Analyse von DNA-Lösungen wurden je nach gewünschtem Trennbereich Agarosegele unterschiedlicher Konzentrationen (ein bis zwei Prozent) hergestellt. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen „Loading-Dye“ versetzt und bei einer Spannung von 80-140 mA für ca. 1 h elektrophoretisiert. Zum Sichtbarmachen der DNA wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung bis zu fünf Minuten inkubiert und auf einer UV-Geldokumentationsanlage (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) dokumentiert. Um DNA Fragmente aus der Agarose wiederzugewinnen, wurden die einzelnen Banden mit einem Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten und unter Verwendung des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) entsprechend der Angaben des Herstellers extrahiert.

3.2.2.11. Subklonierung mittels TOPO-System

Bei den Amplifikationszyklen der PCR werden von der Taq-Polymerase A-Überhänge an die PCR-Fragmente angefügt. Diese werden bei der TOPO-Klonierung genutzt, um die Fragmente in einen mit Topoisomerasen linearisierten Vektor zu ligieren (siehe Anhang Vektorliste). Die Klonierung von *FLT3*-Konstrukten wurde nach dem „pCR®4-TOPO®-

Cloning Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden 2 bis 5 μ l des Klonierungsansatzes für die Transformation verwendet.

3.2.2.12. In-Fusion-Klonierung

Bei der In-Fusion-Klonierung dienen homologe Sequenzabschnitte zweier DNA-Fragmente als Startpunkt für eine Rekombinationsreaktion durch das In-Fusion-Enzym. Hierzu wurden Primer erstellt (vgl. Primerliste), welche eine spezifische Sequenzhomologie zum pMSCV-Puromycin-IRES-GFP-Vektor (siehe Anhang Vektorliste) aufweisen. Nach der Amplifikation der *FLT3*-Gensequenzen mittels Standard-PCR wurde die jeweilige Klonierung entsprechend dem Protokoll des „In-Fusion® HD Cloning Kit“ (Takara Biomedical Technology, Beijing, China) durchgeführt und anschließend 2 bis 5 μ l des Klonierungsansatzes für die Transformation verwendet.

3.2.2.13. Sequenzierung von DNA-Molekülen

Die hier durchgeführten Sequenzierungen beruhen auf der von Sanger (1977) entwickelten Kettenabbruchreaktion. Hierbei dient ein Primer mit bekannter Sequenzabfolge als Startpunkt für die Strangsynthese, welche durch Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) gestoppt wird. Durch das Fehlen einer OH-Gruppe am 3'-Ende des ddNTP kann durch die Polymerase kein weiteres Nukleotid angelagert werden und die Synthese bricht ab. Unter Verwendung je einer der vier doppelt-desoxygenierten Derivate der Nukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in vier parallelen Ansätzen kann die Abfolge einer unbekanntem Sequenz ermittelt werden. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

3.2.2.14. Verwendete Marker

Als Größenvergleich dienten bei der Gelelektrophorese Molekulargewichtsmarker (vgl. Anhang Marker), wovon je ein Mikrogramm als Referenz bei jeder Gelelektrophorese mit aufgetragen wurde.

3.2.3. Zellkultur

3.2.3.1. Kultivierung von Zelllinien

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um murine immortalisierte lymphoide pre-B Zellen (Ba/F3) bzw. myeloide Progenitoren (32D). Die

Zelllinien wurden in RPMI1640-Medium versetzt mit 29 ml Additiva, 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 5 ml Penicillin-Streptomycin-Mix (Endkonzentration jeweils 50 µg/ml) sowie 100 µl Plasmocin™ Prophylactic (2,5mg/ml) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen passagiert (Verhältnis 1:30). Die untransfizierten parentalen Zellen (Ba/F3 und 32D) sowie die mit FLT3 WT transfizierten bzw. infizierten Zellen benötigten murines IL-3 als Wachstumsfaktor. Zur Produktion von Virus-haltigem Medium wurden adhärente 293T-Zellen verwendet (vgl. Abschnitt Infektion von Zelllinien). Diese wurden in Gibco® DMEM-Medium versetzt mit 29 ml Additiva, 10 % FCS, 5 ml Penicillin-Streptomycin-Mix, 5 ml Gibco® L-Glutamin, 500 µl 1 M NaOH, 5 ml 1 M Hespuffer sowie 100 µl Plasmocin™ Prophylactic (2,5mg/ml) kultiviert. Die Zelllinie wurde zum Passagieren mit 5 ml Trypsin/EDTA Solution für 10 min bei 37 °C inkubiert. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden jeweils 1 ml der Suspension mit 9 ml Zellkultur-Medium versetzt.

Zum Waschen von Zellen wurde folgende Prozedur angewandt: Die Zellen wurden in 50 ml 1 x Gibco® DPBS resuspendiert und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach 3 Waschschritten wurden die Zellen im passenden Medium aufgenommen.

3.2.3.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Zur dauerhaften Lagerung wurden 2 bis 5 Millionen Zellen in 800 µl Medium, 100 µl FCS und 100 µl DMSO aufgenommen, bei -80 °C über einen Temperaturgradienten eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Für das Auftauen von Zellen wurden die Zellen bei 37 °C kurz (<5 min) inkubiert und in 50 ml RPMI-Medium aufgenommen, um das zelltoxische DMSO zu entfernen, anschließend für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und in Medium resuspendiert.

3.2.3.3. Ermittlung der Zellzahl

Um die Zellzahl aus einer Zellsuspension zu ermitteln, wurden 10 µl der Suspension mit 90 µl Trypan-Blau-Lösung (0,4%) verdünnt. Daraus wurden 10 µl entnommen und mit Hilfe einer 0,0025 mm² Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl lebender Zellen in vier Großquadranten ausgezählt. Hierbei färbt das Trypan-Blau die toten Zellen an, da es die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann. Die Zellzahl pro Milliliter wurde anhand folgender Formel bestimmt:

Lebende Zellen/ml = Anzahl gezählter Zellen/Anzahl gezählter Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10.000.

3.2.3.4. Transfektion von Zelllinien mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Möglichkeit durch elektrische Impulse die Zellmembran von Zellen kurzzeitig permeabel zu machen genutzt, um DNA in Zellen einzubringen. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen dreimal mit OptiMEM®-Medium gewaschen, um das toxische Phenolrot aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden 2 Millionen Zellen mittels dem BioRad Elektroporator GenePulser XCell (BioRad Laboratories, Hercules, Californien, USA) mit folgenden Einstellungen transfiziert: 300 V, 975 mFarad, 2 µg Vektor-DNA und 200 ng Blasticidin-Resistenzplasmid.

Anschließend wurden die Zellen in Zellkultur-Medium überführt und für 48 h zur Rekonstitution inkubiert. Im Anschluss folgte eine Selektion mit 1 µg/ml Blasticidin gefolgt von einem IL-3-Entzug im Falle der FLT3-ITDs.

3.2.3.5. Infektionen von Zelllinien

Zur Produktion von viralen Überständen wurden 293T Zelllinien mit retroviralen Verpackungsplasmiden (10 µg gag-pol und 3 µg eco-env) sowie dem pMSCV-Puromycin-IRES-GFP (PIG) Vektor (10 µg) entsprechend des liposomalen Transfektionsprotokoll „FuGENE® HD Transfection“ (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) transfiziert. Der Virus-haltige Überstand wurde nach 48 h gesammelt, gefiltert (45 micron Filter) und direkt für eine Infektion verwendet. Für die Infektion wurden 1 Millionen Zellen (Ba/F3 oder 32D) in 4 ml Virusmedium resuspendiert, bei 33 °C für 1,5 h bei 2000 rpm zentrifugiert und für 24 h mit IL-3-haltigem Medium inkubiert. Darauf folgte eine zweite Infektionsrunde. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml Puromycin selektioniert und in den folgenden Tagen auf die Expression von GFP untersucht (vgl. Abschnitt FACS Analysen).

3.2.3.6. Analyse des klonalen Wachstums von Zellen

Zur Messung von klonalem Wachstum wurde ein sogenannter „Colony count Assay“ durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Messung von Proliferation und Zellteilung ausgehend von einer Mutterzelle im viskosen Methylcellulose-Medium durch Bildung einer mikroskopisch sichtbaren Zellkolonie. Hierfür wurden 9.000 Zellen in 900 µl Zellkultur-

Medium resuspendiert, mit 2,4 ml MethoCult™ M3231-Medium ohne Zytokine durch vortexen gemischt und 15 min inkubiert. Jeweils 1,2 ml wurden in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und für 10 Tage im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.2.4. Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1. Erstellung von Zellysaten

Zur Analyse von zellulären Proteinen müssen die Membranen von Zellen zerstört werden. Hierfür werden starke Detergenzien wie z.B. SDS verwendet. Zur Erstellung von Zellysaten wurden die Zellen mit 1 x Gibco® DPBS dreimal gewaschen und das Zellpellet nach dem Japan-Lyseprotokoll mit Proteaseinhibitoren (860 µl Japan-Lysepuffer + 40 µl Complete + 100 µl PhosphoSTOP) resuspendiert. Die Suspension wurde unter gelegentlichem Schütteln auf Eis für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat zentrifugiert, der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt und direkt für eine Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

3.2.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford

Durch die Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an hydrophobe Ketten von Proteinen verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Dieser Anstieg kann mittels einer photometrischen Messeinheit gemessen werden. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Coomassie-Brilliant-Blau G-250-enthaltende „BIORAD Protein Assay-Lösung“ 1:5 mit H₂O verdünnt. Von dieser Lösung wurden 200 µl mit 2 µl Zellysat vermischt und anschließend die Absorption bei 595 nm im TECAN Sunrise Plattenleser (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) gemessen und mit der „TECAN Magelan Software“ (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) dokumentiert. Um die Konzentration ermitteln zu können wurde jeweils eine bekannte BSA-Standardkonzentrationsreihe mitgeführt.

3.2.4.3. „Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid“-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE macht man sich die physikalische Eigenschaft zu Nutze, dass das negativ-geladene SDS an die hydrophoben Proteinbereiche bindet und sich diese Proteine dadurch in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode entsprechend ihrer Größe auftrennen

lassen. Hierbei kann die Eigenladung des Proteins vernachlässigt werden. Das SDS-Polyacrylamid-Gel besteht dabei aus einem Trenn- und einem Sammelgel, wobei erstes für die Größenauftrennung verantwortlich ist. Dieses kann unterschiedliche Prozentigkeiten aufweisen, um unterschiedliche Proteingrößen besser auftrennen zu können. Folgende Konzentrationen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Gele für Western Blot:

<u>Trenngel (10 ml = 2Gele)</u>	<u>8 %</u>	<u>10 %</u>	<u>15 %</u>
H ₂ O	4,6 ml	3,4 ml	2,3 ml
Acrylamid	2,7 ml	3,3 ml	5,0 ml
Tris, 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Sammelgel (5 ml = 2 Gele) 5 %

H ₂ O	3,4 ml
Acrylamid	830 µl
Tris 1 M, pH 6,8	630 µl
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Nach Herstellung wurde das Gel in eine Gelelektrophorese-Apparatur gespannt und mit 1 x WB-Laufpuffer gefüllt. Die Proteine wurden mit „Loading-Dye“ versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Die Proben wurden bei 100 V ungefähr 1,5 h elektrophoretisiert. Als Größenvergleich diente ein Proteingrößenmarker (siehe Anhang Marker).

3.2.4.4. Immunchemischer Nachweis von Proteinen („Westernblotting“)

Bei der Immundetektion handelt es sich um eine Methode zum Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran, um spezifische Proteine anschließend immunologisch nachzuweisen. Zur Durchführung wurde das elektrophoretisierte SDS-Gel in einer horizontalen Transferkammer gespannt und die aufgetrennten Proteine aus

dem Gel mittels eines angelegten elektrischen Feldes (30 V) auf eine Nitrocellulosemembran bei 4 °C über Nacht transferiert. Die Membran wurde dreimal mit 1 x TBST gewaschen und anschließend mit Milchlösung (5 % Milchpulver in 1 x TBST) geblockt. Das „Blocking“ vermindert eine unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktion durch Sättigung von unspezifischen Bindestellen. Es folgten erneut drei Waschschrte mit 1 x TBST. Die Membran wurde anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer inkubiert. Der Antikörper erkennt ein spezifisches Epitop des Antigens und bindet an dieses reversibel. Am Folgetag wurde die Membran dreimal gewaschen, um ungebunden Antikörper zu entfernen. Zur Detektion des primären Antikörper wurde ein sekundärer Antikörper, welcher zum einen gegen den primären Antikörper gerichtet und zum anderen an eine Peroxidase gekoppelt ist. Nach einer einstündigen Inkubation mit der sekundären Antikörperlösung bei Raumtemperatur und dreimaligen waschen wurde SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat (Pierce, Rockford, USA) zu der Membran gegeben. Das chemilumineszierende Produkt der Peroxidase-Substrat-Reaktion wurde mit dem „Fusion FX7“ (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) dokumentiert.

Da die Antikörper-Antigen-Bindung reversibel sind, lassen sich weitere Proteine auf der gleichen Membran detektieren. Dies ist vor allem sinnvoll, wenn Änderungen bei Phosphosignalen analysieren möchte, da man hier das phosphorylierte als auch das unphosphorylierte Protein nachweisen muss. Um die Antikörper-Antigen-Bindung zu lösen wurde die Membran für 20 min bei 50 °C in Stripping-Puffer inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und entsprechend der zuvor beschriebenen Prozedur behandelt.

3.2.4.5. Immunpräzipitation

Immunopräzipitation wird verwendet, um aus einem Zelllysate ein spezifisches Protein zu isolieren und zu konzentrieren. Dabei wurde zu 5 mg Proteinlysate 5 µg Antikörper bzw. 5 µg der unspezifischen Isotyp-Kontrolle zupipettiert und bei 4 °C über Nacht auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils 50 µl A/G Sepharose Beads (100mg/ml) zugegeben und für 2 h bei 4 °C geschüttelt. Das Antikörper-Beads-Gemisch wurde mit dem 5-fachen Volumen mit Japan-Lysepuffer und Proteinaseinhibitoren dreimal gewaschen, um ungebundenen Antikörper bzw. ungewünschte Proteine auszuwaschen. Anschließend wurden 50 µl „LoadingDye“ zugegeben, das Gemisch bei 95 °C für 5 min inkubiert und entweder direkt für die SDS-PAGE eingesetzt oder bei -80 °C weggefroren.

3.2.5. Durchflusszytometrische „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) Analysen

Beim FACS macht man sich die physikalischen Eigenschaften von Zellen zu Nutze, dass sie abhängig von ihrer Größe und von ihrer Granularität den Strahl einer Lichtquelle brechen. Diese Lichtbrechung und -beugung können mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen werden. Darüber hinaus können Zellen mit Antikörpern mit konjugierten Fluorochromen markiert werden. Werden die Fluorochrome mit einem spezifischen Laser angeregt so werden die Elektronen des Fluorochromes in ein höheres Energieniveau gehoben (Absorption). Diese Elektronen fallen unter Abgabe von Licht mit einer spezifischen Wellenlänge auf ihr Ursprüngliches energetisches Level zurück (Emission). Das abgegebene Licht wird auch als emittiertes Licht bezeichnet und kann mittels eines Detektors gemessen werden. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei proportional zu der Menge des Fluorochroms. In der vorliegenden Arbeit wurde für FACS Analysen das Gerät FACS CantoII (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und die „DIVA™ Software“ (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Die Daten wurden anschließend mit FlowJo™ (Tree star, Ashland, Oregon, USA) analysiert und dokumentiert.

3.2.5.1. Messung der Apoptose

Zur Messung des Zelltods wurden drei verschiedene Assays verwendet: Propidiumiodid (PI), Tetramethylrhodamine (TMRE) und SYTOX® Blue „Dead Cell Stain“ (Invitrogen, Karlsruhe). Da PI mit der DNA interkaliert, kann der Zellzyklus einer Zelle analysiert und der Anteil der Zellen in der subG1-Phase bestimmt werden (Nicoletti et al., 1996). Im Zellzyklus variiert der DNA-Gehalt zwischen einer lebenden diploiden Zelle ($2n$) in der G_0/G_1 -Phase oder einer in der G_2/S -Phase befindlichen Zelle ($4n$). Stirbt die Zelle, so wird unter anderem die DNA abgebaut, was bedeutet, dass der DNA-Gehalt weniger als ($2n$) beträgt. Bei der Messung wurde der DNA-Anteil ($< 2n$) als subG1-Phase definiert und der Anteil der Zellen in dieser Phase bestimmt.

Mit der zweiten Methode wurde das mitochondriale Potential von Zellen mittels TMRE bestimmt. In einer lebenden Zelle findet in den Mitochondrien ein Großteil der Energieproduktion statt, wobei ein Spannungspotential an der Membran aufgebaut wird. Wenn eine Zelle in Apoptose geht, kann in der frühen Phase ein Abfall des mitochondrialen Potentials gemessen werden, da die Zelle keine weiteren Energiemoleküle für Stoffwechselprozesse benötigt. TMRE nutzt das Potential und bindet in den Mitochondrien. Fällt das Potential ab so verschiebt sich das Absorptionsmaximum von TMRE. Bei der

Messung wurde diese Verschiebung gemessen, wobei die TMRE negativen Zellen als Anteil apoptotischer Zellen definiert wurde. Dadurch misst TMRE einen Zeitpunkt früher Apoptose. Als dritte Methode wurde „SYTOX® Blue Dead Cell Stain“ (SB) verwendet. Dieser Stoff bindet an die DNA, kann aber nicht durch die Membran einer lebenden Zelle diffundieren, sondern nur in tote Zellen deren Membran bereits permeabel ist. Die Verwendung von SB stellt daher die Messung eines späten Apoptosezeitpunktes dar. SB-negative Zellen wurden als lebende Zellen definiert und die SB-positiven Zellen als tote Zellen bestimmt. TMRE und SB wurden auch in Kombination verwendet. Alle drei Substanzen wurden jeweils kurz vor der Messung zugegeben und entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt.

3.2.5.2. Messung von Oberflächenproteinen

Bei der Messung von Proteinen in der peripheren Membran einer Zelle werden Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und in einem Durchflusszytometer analysiert. Zur Messung von Oberflächenproteinen einer Zelle wurden 1 Millionen Zellen in 100 µl 1 x Gibco® DPBS mit 0,1 % FCS aufgenommen und anschließend mit dem jeweils mit 10 µl murinen PE-gekoppelten anti-humaner CD135 (FLT3) Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Parallel wurde jeweils ein Kontroll-Ansatz mit 10 µl der Isotyp-Kontrolle (murinen PE-gekoppelten anti-humanen Ig κ light chain Antikörper) angesetzt. Die Zellen anschließend gewaschen, in 300 µl 1 x Gibco® DPBS resuspendiert und umgehend gemessen.

3.2.5.3. Messung von intrazellulären Proteinen

Bei der Bestimmung intrazellulärer Proteine werden die Zellen zunächst fixiert und anschließend für die Färbung mit dem Antikörper permeabilisiert. Für die Fixierung und die Permeabilisierung wurde das „FIX & PERM® cell fixation and cell permeabilization kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 10 µl murinen PE-gekoppelter anti-humanen CD135 (FLT3) Antikörper bzw. mit 10 µl der Isotyp-Kontrolle (murinen PE-gekoppelten anti-humanen Ig κ light chain Antikörper) für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend gemessen.

3.2.5.4. Behandlung von FLT3-ITD-transformierten Zellen mit Inhibitoren

Um die Signaltransduktion von FLT3 oder nachfolgenden Molekülen zu unterdrücken wurden in dem vergangenen Jahrzehnt verschiedene chemische Substanzen entwickelt, die kompetitiv an der ATP-Binde-Tasche einer Kinase binden und diese somit inhibieren. Einige dieser sogenannten „small molecules“ werden derzeit in klinischen Studien getestet (Kindler et al., 2010; Zhu et al., 2010). Für die Inhibition der FLT3-Kinase wurden die folgenden Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) verwendet: Midostaurin (PKC412), Sorafenib (BAY 43-9006) und Quizartinib (AC220). Die TKIs wurden entsprechend der Angaben der Hersteller in Lösungsmittel aufgenommen, um eine Stammlösung von 10 mM bzw. 5 mM zu erhalten. Diese wurden zur Lagerung bei -20 °C eingefroren und gegebenenfalls für die jeweiligen Endkonzentrationen weiter verdünnt.

Zur Behandlung von *FLT3*-ITD-mutierten Zellen wurden je 30.000 Zellen/ml in 24-Well-Platten mit einem Endvolumen von 2 ml ausgesät und über Nacht vorinkubiert. Am folgenden Tag wurden unterschiedliche TKI-Konzentrationen zugegeben, für weitere 24 h bzw. 48 h inkubiert und nach dem jeweiligen Zeitpunkt der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Als Negativkontrolle wurde die äquivalente Menge an DMSO oder H₂O pipettiert. Zur Inhibition der „Ras-Raf-MEK-Erk“-Signaltransduktionskaskade wurden 30.000 Zellen/ml mit 10 µM des spezifischen MEK-Inhibitor „U0126“ für 30 min behandelt, gewaschen und anschließend für 1 h ohne Inhibitor vorinkubiert. Danach wurden unterschiedliche Konzentrationen PKC412 zugegeben und zusammen mit 10 µM U0126-Inhibitor für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Parallel wurden 1 Millionen Zellen mit der gleichen Konzentration des jeweiligen Inhibitors für 4 h inkubiert und anschließend für Westernblot-Analysen lysiert (vgl. Abschnitt Immunchemischer Nachweis von Proteinen).

3.2.6. siRNA-Oligo-Behandlung

Zur transienten Suppression von Genexpression kann RNA Interferenz Technologie eingesetzt werden. Hierfür werden kurze RNA Fragmente, sogenannte siRNA-Oligos, in die Zelle transfiziert. Nach der Aktivierung durch den „Dicer“-Komplex bildet der einzelsträngige RNA-Strang mit der Ziel-mRNA den „RNA-induced silencing complex“ (RISC), wodurch die Expression von Genen auf zwei Wege inhibiert wird: Abbau der Ziel-mRNA und Unterdrückung der Translation durch simple Blockade der Translationsinitiationsfaktoren. Das hier verwendete siRNA-Oligo ist spezifisch gegen die

FLT3-Genexpression. Für die siRNA-Transfektion wurden das „Neon® MicroPorator System“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Es wurden 1 Millionen Zellen dreimal mit OptiMEM®-Medium gewaschen, in 100 µl Puffer T resuspendiert und mit 10 µl *FLT3* siRNA bzw. Kontroll-siRNA (je 20 µM) gemischt und anschließend transfiziert (1700 V, 30 ms, 1 Puls). Die Zellen wurden nach der Transfektion in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und im Inkubator inkubiert. Nach 24 h wurden Westernblot-Lysate erstellt und parallel nach 24 h sowie 48 h der Anteil apoptotischer Zellen gemessen.

3.2.7. Statistik

Zur statistischen Analyse der Daten wurden die Experimente mindestens in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Daraus wurde mit Hilfe der „GraphPad Prism Software“ (GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA) der Mittelwert, Standardabweichung und das Signifikanzniveau errechnet.

Die Standardabweichung errechnet sich nach folgender Formel (Romanovsky 1925):

$$\text{Standardabweichung SN} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Zur Berechnung des Signifikanzniveaus zwischen den zu vergleichenden Gruppen wurde ein „two-way ANOVA“-Test durchgeführt (Smith 1951). Hierbei wurden jeweils TKD1-ITDs als eine Gruppe mit JM-ITD als zweite Gruppe verglichen. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: Signifikant (*) für ($p \leq 0,05$), sehr signifikant (**) für ($p \leq 0,01$) oder hoch signifikant (***) für ($p \leq 0,001$).

4. Ergebnisse

4.1. Identifikation und Charakterisierung von ITD-Mutationen innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne 1 (TKD1) von FLT3

4.1.1. Identifikation von TKD1-Mutationen in *FLT3*-ITD-positive AML Patienten

Verschiedene Gruppen konnten unabhängig voneinander in retrospektiven Analysen durch Sequenzierung von Blutproben *FLT3*-ITD positiver AML-Patienten zeigen, dass ein beachtlicher Anteil an ITD-Mutationen (bis zu 30 %) innerhalb der TKD1 des FLT3-Rezeptors lokalisiert sind (Schnittger et al., 2012; Breitenbuecher et al., 2009; Kayser et al., 2009). Um neue TKD1-ITDs zu identifizieren, wurde aus Proben von *FLT3*-ITD-positiven AML-Patienten RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mittels Sequenz-spezifischer FLT3-Primer die gesamte FLT3-Sequenz amplifiziert und nach Aufreinigung in den Vektor pCR4 zwischenkloniert. Nach Isolation der Plasmid-DNA wurde eine Sequenzierung durchgeführt (Firma GATC, Konstanz). Die erhaltenen DNA-Sequenzierungsdaten wurden mit der DNASTAR Lasergene 8 Software analysiert und mit den annotierten NCBI-Datenbank Einträgen abgeglichen. In verschiedenen Patientenproben konnten mehrere Mutationen innerhalb der JM-Domäne als auch in der TKD1-Domäne des FLT3-Rezeptors identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Da die ITD-Mutationen einen hohen Grad an Heterogenität aufweisen, wurde die folgende Nomenklatur postuliert: Eine *FLT3*-ITD wird entsprechend ihrer Lokalisationsstelle gefolgt von der Länge des Einschubs in Aminosäuren (AS) benannt. Hierbei müssen die folgenden möglichen Varianten unterschieden werden: 1) Der Start der Duplikation liegt zwischen zwei Codons, so lautet die Bezeichnung z.B. *FLT3*-ITD598/599(12). 2) die Lokalisationsstelle innerhalb eines Codons führt zu einer Punktmutation mit einem AS-Austausch, so steht die ursprüngliche AS vor dem Start der ITD gefolgt durch die Punktmutation, z.B. *FLT3*-ITDE611V(28). 3) die Lokalisationsstelle innerhalb eines Codons führt zu einer Punktmutation wobei kein AS-Austausch stattfindet, so wird die Mutation z.B. als *FLT3*-ITDE611E(28) bezeichnet. 4) Für den Fall, dass zusätzliche AS auftreten, so wird das zusätzliche Füllmaterial hinter der ITD-Lokalisation angeführt, z.B. *FLT3*-ITDF612LGS(17). Entsprechend dieser Nomenklatur wurden die in primären Patientenproben identifizierten ITD-Mutationen innerhalb der TKD1 wie folgt betitelt: *FLT3*-ITDE611V(32), *FLT3*-ITDG613E(33) und *FLT3*-ITDA620V(28) (siehe Abb. 7). Die Mutationen konnten noch weiter klassifiziert werden; so liegt die Integrationsstelle der *FLT3*-ITDE611V(32) sowie der *FLT3*-ITDG613E im Beta 1-Faltblatt,

während der Startpunkt der *FLT3-ITDA620V*(28) in der Nukleotid-Bindeschleife der TKD1 des FLT3-Rezeptors lokalisiert ist. Die *FLT3-ITDE611V*(32) hat eine Länge von 96 Nukleotiden bzw. 32AS, während die *FLT3-ITDG613E* eine Länge von 99 Nukleotiden (33AS) und die *FLT3-ITDA620V*(28) eine Länge von 84 Nukleotiden (28AS) besitzt. Alle drei Mutationen zeigen eine Punktmutation an der jeweiligen Integrationsstelle, da sie innerhalb eines Codons lokalisiert sind. So kommt es bei der *FLT3-ITDE611V*(32) zu einem Austausch von Glutamat zu Valin. Bei der *FLT3-ITDG613E* wird Glycin zu Glutamat und

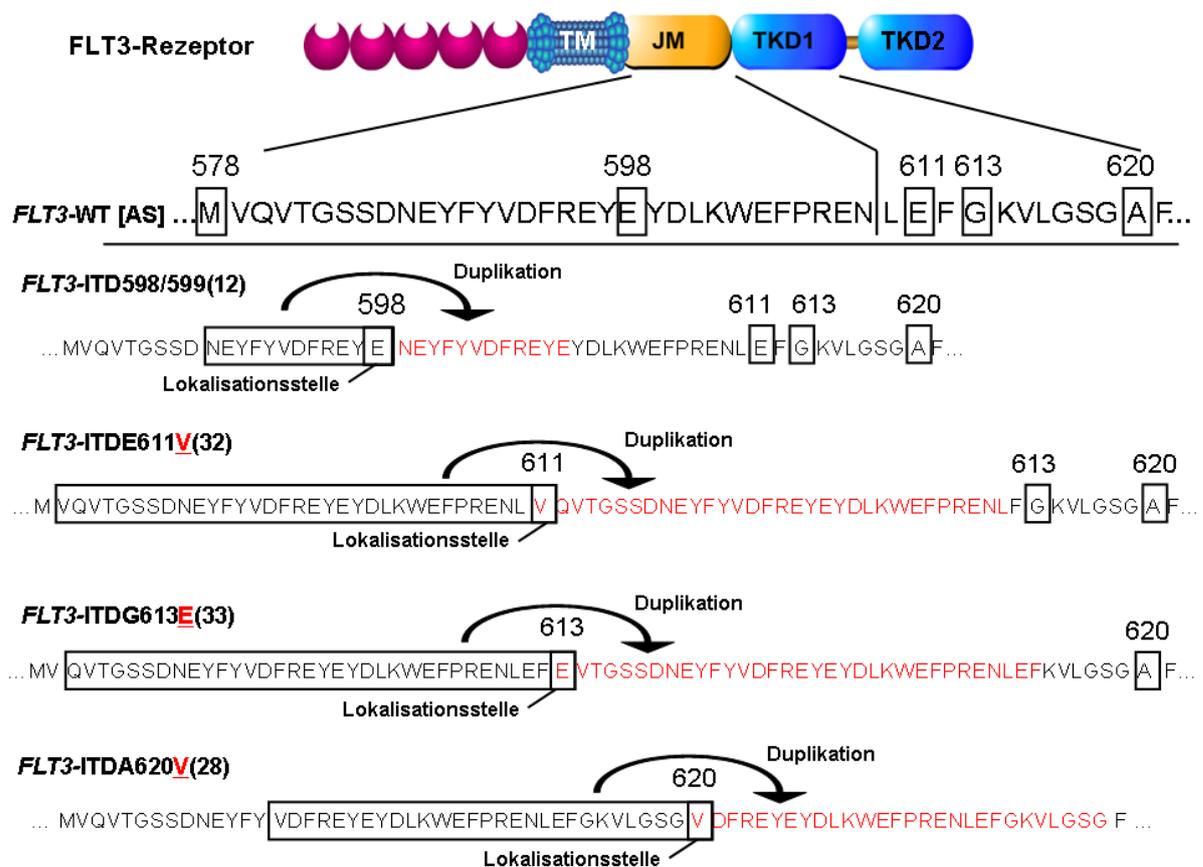


Abbildung 7: Darstellung der Lokalisation der in AML-Patienten identifizierten ITD-Mutationen in der JM- und TKD1-Domäne. Die schematische Abbildung des FLT3-Rezeptors zeigt die aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen bestehende extrazelluläre Domäne in rot, die transmembranäre Domäne (TM), die juxtamembranäre Domäne (JM) und die beiden Tyrosinkinase-Domänen (TKD1 und TKD2). Die Zeile darunter zeigt die FLT3-WT-Aminosäuresequenz von AS 578 bis 621. Darunter sind eine JM-ITD und drei TKD1-ITDs dargestellt. Aufgezeigt sind jeweils die ursprüngliche AS-Sequenzen (eingerahmt), welche in der Duplikation auftreten (rote AS-Sequenz), sowie die Integrationsstelle der ITD durch Angabe der speziellen AS. Für den Fall einer Punktmutation durch Integration der ITD innerhalb eines DNA-Codons ist die AS der Lokalisationsstelle rot markiert. Zusätzlich ist in der Bezeichnung der *FLT3-ITD* die resultierende AS durch einen Unterstrich hervorgehoben. Bei der *FLT3-ITD598/599*(12) kommt es zu keiner Punktmutation an der Stelle 598, da die ITD nach dem Codon lokalisiert ist. Dahingegen liegen die identifizierten TKD1-ITDs jeweils innerhalb der Codons, was zu Punktmutationen führt, wie z.B. *FLT3-ITDE611V*(32).

und bei der *FLT3*-ITDA620V(28) Alanin zu Valin ausgetauscht. Als Kontrolle für alle folgenden Experimente diene in dieser Arbeit die bereits beschriebene JM-Mutation *FLT3*-ITD598/599(12) (Mizuki et al., 2002). Diese Mutation weist eine Länge von 36 Nukleotiden (12AS) auf und führt aufgrund ihrer Lokalisation nicht zu einer Punktmutation, da die ITD-Mutation zwischen den beiden Codons der AS598 und AS599 liegt. Alle TKD1-ITD-Mutationen wurden in den pAL-Expressionsvektor (Mizuki et al., 2000) kloniert. Hierbei wurde die Mutation *FLT3*-ITDG613E von der Doktorandin Ann-Kathrin Borrmann in den pAL-Vektor subkloniert. Im Anschluss wurden positive Klonierungen durch erneute Sequenzierung verifiziert.

4.1.2. Stabile Expression der verschiedenen *FLT3*-TKD1-ITD in murinen hämatopoetischen Ba/F3-Zellen

Der pAL-Vektor ist ein gängiges System zur Expression von *FLT3* in hämatopoetischen Zelllinien (Brandts et al., 2005; Tickenbrock et al., 2005; Mizuki et al., 2000). Eine adäquate konstitutive Expression des jeweiligen „gene of interest“ wird dabei durch den starken Cytomegalievirus (CMV)-Promotor gewährleistet. Die Konstrukte wurden in die murine IL-3-abhängige lymphoide pro-B-Zelllinie Ba/F3 mittels Transfektion eingebracht. Diese Zellen stellen für die Analyse von Onkogenen ein geeignetes Modellsystem dar, da sie ihre IL-3-Abhängigkeit durch die Expression transformierender Gene verlieren (Hayakawa et al., 2000). Nachdem die unterschiedlichen TKD1-ITD-Mutationen (*FLT3*-ITDE611V(32), *FLT3*-ITDG613E(33) und *FLT3*-ITDA620V(28)) sowie die JM-Mutation (*FLT3*-ITD598/599(12)) transfiziert worden waren, wurden zur Überprüfung der Expression des FLT3-Rezeptors die Zellen mit spezifischen PE-gekoppelten CD135 (FLT3)-Antikörpern markiert und anschließend die Oberflächenexpression der FLT3-Rezeptoren im Durchflusszytometer analysiert (siehe Abb. 8A). Hierbei zeigte sich, dass der FLT3-Rezeptor in allen generierten Zelllinien (Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32), Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33), Ba/F3 *FLT3*-ITDA620V(28) und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)) exprimiert wurde. In der Negativkontrolle (Ba/F3 parental) konnte hingegen keine Expression nachgewiesen werden.

Schmidt-Arras et al. (2005) beschrieben im Vergleich zum *FLT3*-WT eine verstärkte Retention der *FLT3*-ITD-Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum. Um eine divergente Lokalisation innerhalb der Zelle auszuschließen, wurden die Zellen parallel auf ihre intrazelluläre FLT3-Rezeptor-Expression untersucht. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit spezifischen PE-gekoppelten CD135 (FLT3)-Antikörpern markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Bezüglich der intrazellulären FLT3-

Rezeptor-Expression konnte kein signifikanter Unterschied in den verschiedenen Zelllinien festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Neben den durchflusszytometrischen Analysen wurden Zelllysate von Ba/F3 *FLT3*-TKD-ITD-exprimierenden Zellen sowie von der Ba/F3 *FLT3*-JM-ITD-Zelllinie hergestellt. Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt und mit Westernblot-Analysen die *FLT3*-Expression bestimmt. Das Ergebnis des Immunblots sowie der densitometrischen Auswertung zeigte ein ähnliches Expressionslevel der unterschiedlichen *FLT3*-ITD-Mutationen der TKD1- bzw. der JM-Domäne (siehe Abb. 8B).

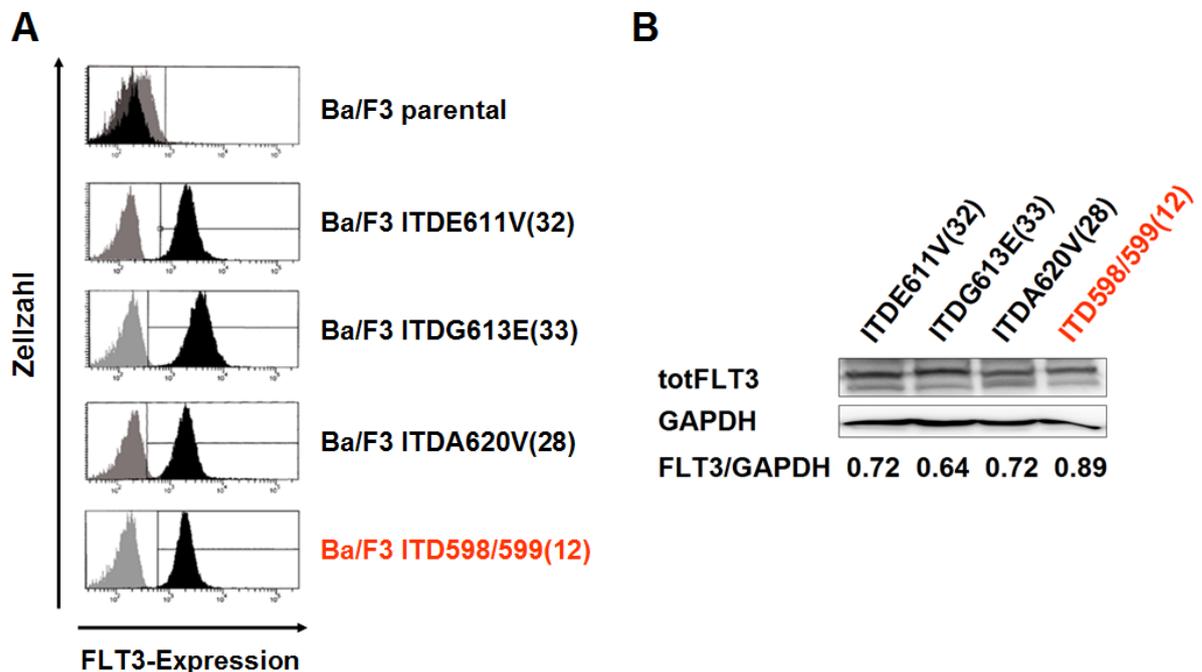


Abbildung 8: Expression der unterschiedlichen *FLT3*-ITD-Rezeptoren (TKD1- und JM-ITD) in der murinen IL3-abhängigen Ba/F3-Zelllinie. A) In den Histogrammen ist die Zellzahl gegen die PE-Fluoreszenz (*FLT3*-Expression) aufgetragen. Dargestellt ist eine Überlagerung der beiden Messungen mit dem IgG1-PE-Antikörper (graue Schattierung) und dem CD135-PE-Antikörper (schwarze Schattierung). Die Histogramme zeigen die *FLT3*-Expression im Vergleich zu Ba/F3 parental Zellen für die TKD1-ITD-exprimierenden Ba/F3 Zellen (schwarze Schrift) sowie für die JM-ITD-exprimierende Ba/F3 Zellen (rote Schrift). B) Dargestellt ist die Immundetektion von *FLT3* und GAPDH von zellulären Lysaten der verschiedenen ITD-exprimierenden Zellen (TKD1-ITDs und JM-ITD) nach SDS-PAGE und Westernblot. Zusätzlich wurde eine densitometrische Bestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen die *FLT3*-Expression in der JM-ITD598/599(12) (rote Schrift) und den TKD1-ITDs (schwarze Schrift).

4.1.3. *FLT3*-TKD1-ITD-exprimierende Zellen zeigen ein IL-3-unabhängiges Wachstum

Die Expression eines Onkogens bewirkt im Ba/F3 Modellsystem eine Liganden-unabhängigen Proliferation der Zellen (Hayakawa et al., 2000). Es wurde beschrieben, dass die Expression von JM-ITD-Mutationen im *FLT3*-Rezeptor zur Transformation von Ba/F3 Zellen führt (Kelly et al., 2002; Mizuki et al., 2000). Bisher konnte auch für eine ITD mit Lokalisationsstelle an AS627 im Beta 2-Faltblatt der TKD1 des *FLT3*-Rezeptors ein transformierendes Potential beobachtet werden (Breitenbuecher et al., 2006). Die in dieser Arbeit hergestellten *FLT3*-ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen (TKD1-ITD und JM-ITD) sowie *FLT3*-WT-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden zur Analyse des transformierenden Potentials mehrmals gewaschen, um IL-3 zu entfernen. Eine definierte Zellzahl (3000 Zellen/ml) wurde jeweils in Methylcellulose in Abwesenheit von IL-3 für 10 Tage kultiviert und im Anschluss die Anzahl der gewachsenen Kolonien ausgezählt. Hierbei steht die Bildung von Kolonien für wachstumsfaktorunabhängige Proliferation und klonales Wachstum der entsprechenden Zelle. Im Gegensatz zum *FLT3*-WT führte die Expression von TKD1-ITD- und JM-ITD-Mutationen in Ba/F3-Zellen zur Bildung von Kolonien und somit zu einer IL-3-unabhängigen Proliferation und klonalem Wachstum (siehe Abb. 9). Es konnte hierbei ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Anzahl der Kolonien der ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen (TKD1-ITD und JM-ITD) im Vergleich zu *FLT3*-WT-exprimierenden Ba/F3-Zellen festgestellt werden. Hierbei war eine leicht erhöhte Anzahl an Kolonien in den Ba/F3-Zellen, die eine TKD1-Mutation exprimieren, im Vergleich zu Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12) zu beobachten, was aber nicht signifikant war ($p = 0,09$).

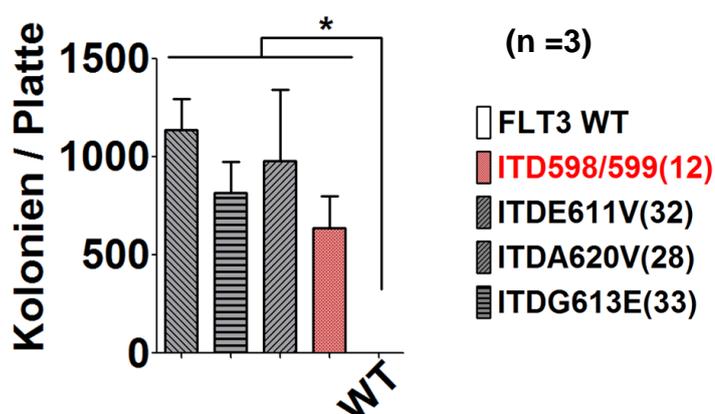


Abbildung 9: IL-3-unabhängige Wachstum der *FLT3*-TKD1-ITD exprimierenden Ba/F3-Zellen. Ba/F3 Zellen, transfiziert mit den jeweiligen *FLT3*-Rezeptoren (*FLT3*-WT (weiss), JM-ITD598/599(12) (rot) und TKD1-ITDs(grau)), wurde IL-3 entzogen, die Zellen in Methylcellulose ausplattiert (3000 Zellen/ml) und für 10 Tage kultiviert. Gezeigt sind die gebildeten Kolonien pro Platte (Kolonien/Platte) für die jeweiligen angegeben Ba/F3-Zellen. (p-Wert: * = $p < 0,05$)

4.1.4. *FLT3*-TKD1-ITDs weisen Apoptoseresistenz nach IL-3-Entzug auf

Aktivierende Mutationen im *FLT3*-Rezeptor führen zu Aktivierung von anti-apoptotischen und gleichzeitiger Inhibition von pro-apoptotischen Signalwegen, was zu einer wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation führt (Kim et al., 2005; Scheijen et al., 2004; Minami et al., 2003). Daher wurde zur weiteren Charakterisierung von den etablierten TKD1-ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen der Anteil apoptotischer Zellen nach Wachstumsfaktorentzug bestimmt. Hierfür wurden die Zellen (Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32), Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33), Ba/F3 *FLT3*-ITDA620V(28) und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)) mehrmals gewaschen, um überschüssiges IL-3 zu entfernen. Die gewaschenen Zellen wurden in IL-3-freies Medium überführt und für 72 Stunden inkubiert. Nach 24 und 72 Stunden wurde der Anteil apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrolle wurden *FLT3*-WT-exprimierende Ba/F3-Zellen verwendet. Dabei wurden zwei Methoden angewandt, um den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen: Propidium-Iodid (PI), zur Färbung des DNA-Gehalts der Zellnuclei, wobei alle Zellen mit einem DNA-Gehalt ($< 2n$) als tote Zellen definiert wurden. Als zweite Methode wurde die Färbung toter Zellen mittels „SYTOX® Blue Dead Cell Stain“ (SB) verwendet. Bei beiden Ansätzen konnte in den Zellen, welche den WT-Rezeptor exprimierten, im Vergleich zu den Ba/F3 *FLT3*-ITD-Zellen nach 24 und 72 Stunden ein signifikanter Unterschied (jeweils $p < 0,05$) festgestellt werden. Der PI-Ansatz zeigte, dass der gemessene Anteil an apoptotischen Zellen 24 Stunden nach IL-3-Entzug für die *FLT3*-WT-exprimierenden Zellen etwa bei 25 % lag, wobei alle ITD-Mutationen (Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32), Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33), Ba/F3 *FLT3*-ITDA620V(28) und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)) lediglich einen Anteil an apoptotischen Zellen von ca. 10 % zeigten. Die ITD-Zellen zeigten auch nach 72 Stunden keine Erhöhung der Apoptoserate, dagegen lag der Anteil bei den Ba/F3 *FLT3*-WT Zellen bei über 85 % (siehe Abb. 10A). Es konnte weiter kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe der ITD-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Im zweiten Ansatz wurde SB verwendet. Hierbei wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, behandelt und über 72 Stunden unter der Verwendung von SB als „Dead Cell Stain“ der Anteil toter Zellen im Durchflusszytometer bestimmt (siehe Abb. 10B). Die SB-positiven Zellen wurden als tote Zellen definiert. Die Messung zeigte für die *FLT3*-WT-Zellen nach 24 Stunden mehr als 25 % und nach 72 Stunden mehr als 75 % tote Zellen. Dem gegenüber konnte für die *FLT3*-ITD-exprimierenden Zellen (TKD1-ITD und JM-ITD) kein signifikanter Anstieg der Apoptose nach 24 bzw. 72 Stunden beobachtet werden. Der SB-Ansatz konnte damit das Ergebnis der PI-Messung bestätigen (siehe Abb. 10).

Die Daten zeigten zusammenfassend, dass die Expression von JM- als auch TKD1-ITD-mutierten FLT3-Rezeptoren in Ba/F3 Zellen eine Resistenz gegenüber Apoptose-Induktion nach Wachstumsfaktorentzug vermitteln.

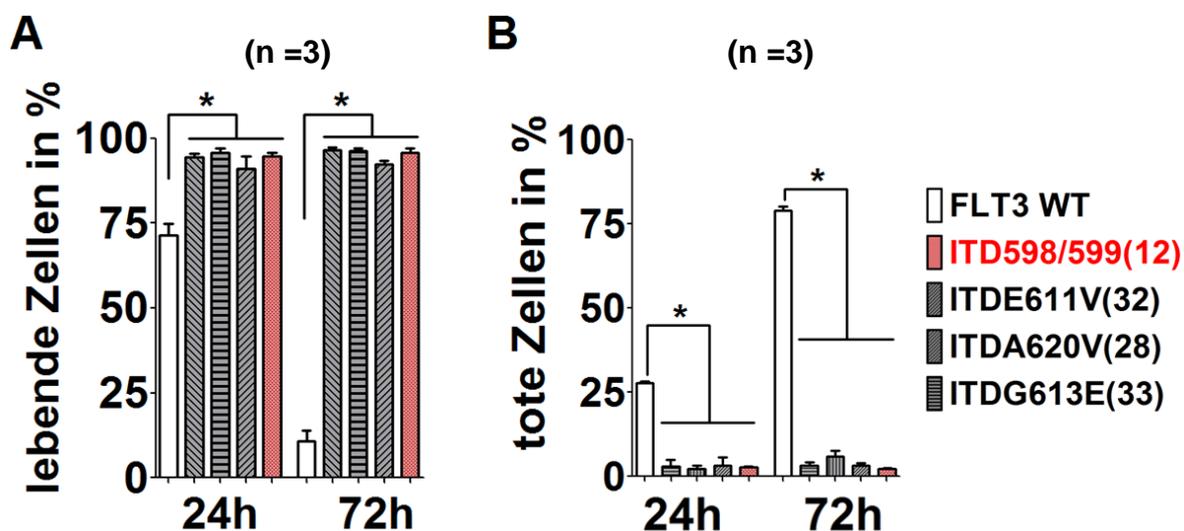


Abbildung 10: Apoptoseresistenz der mit FLT3-ITD-transfizierten Ba/F3-Zellen nach IL-3-Entzug. A) Gezeigt ist der Anteil an lebenden Zellen in Prozent gemessen 24 und 72 Stunden nach IL-3-Entzug mit Propidium-Iodid, wobei alle Zellen mit einem DNA-Gehalt ($\geq 2n$) als lebend definiert wurden. Dargestellt ist der Anteil lebender Zellen nach IL-3-Entzug von FLT3-WT im Vergleich zu den ITD-exprimierenden Zellen. (p-Wert: $*= p < 0,05$). B) Gezeigt ist der Anteil an toten Zellen in Prozent gemessen 24 und 72 Stunden nach IL-3-Entzug. Verwendet wurde „SYTOX® Blue (SB) Dead Cell Stain“, wobei SB-positive Zellen als tote Zellen definiert wurden. (p-Wert: $*= p < 0,05$).

4.1.5. TKD1-ITD-exprimierende Zellen zeigen konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie nachgeschalteter Signalwege

Die wachstumsfaktorunabhängige Proliferation von hämatopoetischen Zellen wird durch konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors und Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden vermittelt. Die bisher wichtigsten beschriebenen Kaskaden sind der STAT5 und der MAPK (ERK1/2)-Signalweg. Eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors und dieser beiden Signalwege wurde für FLT3-JM-ITD-Mutationen bereits beschrieben (Spiekermann et al., 2003; Kiyoi et al., 2002; Mizuki et al., 2000). Um die Frage zu beantworten, ob die in dieser Arbeit identifizierten TKD1-ITDs des FLT3-Rezeptors aktivierende Mutationen sind, wurden FLT3-TKD1-ITD-exprimierende Ba/F3 Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, um den Zellen IL-3 zu entziehen, und anschließend in IL-3-freies Kulturmedium überführt. Sechs Stunden nach dem IL-3-Entzug wurden Zelllysate erstellt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden Westernblot-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 11). Als Kontrolle wurden Lysate aus Ba/F3-Zelllinien hergestellt, die die bereits beschriebene FLT3-

JM-ITD598/599 (Mizuki et al., 2000) sowie *FLT3*-WT exprimieren. Zur Detektion wurden spezifische Antikörper für phosphorylierte *FLT3*-Rezeptoren an der Stelle Tyrosin 591 (Y591) sowie phosphospezifische Antikörper gegen *STAT5* an der Stelle Tyrosin 694 und 699 (Y694/699) und gegen *ERK1/2* an der Stelle Threonin 202 und Tyrosin 204 (T202/Y204) verwendet. Im Anschluss wurde die Membran mit Antikörpern der unphosphorylierten Proteine und einer Beladungskontrolle (*FLT3*, *STAT5*, *ERK1/2* und *GAPDH*) inkubiert (siehe Abb. 11A). Wie erwartet zeigte der WT-Rezeptor sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von IL-3 keine Autophosphorylierung des Rezeptors. Da die *FLT3*- und die IL-3-Signalkaskade Ähnlichkeiten aufweist, waren in Anwesenheit von IL-3 die nachgeschalteten Signalwege *STAT5* und *ERK1/2* aktiviert. Unter IL-3-Entzug konnte auch keine Phosphorylierung von *STAT5* und *ERK1/2* detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die ITD-Mutationen nach IL-3-Entzug eine konstitutive Aktivierung des *FLT3*-Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege (*STAT5* und *ERK1/2*). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass JM-ITD-Mutationen den AKT-Signalweg aktivieren und zusammen mit *STAT5* die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL regulieren (Brandts et al., 2005; Socolovsky et al., 1999; Lisovsky et al., 1996b). Die zuvor verwendeten Zelllysate wurden erneut für eine SDS-PAGE und anschließende Immundetektion verwendet. Die Membran wurde mit einem spezifischen Phospho-AKT-Antikörper gegen die AS-Stelle Serin 473 inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran gestrippt und mit spezifischen Antikörpern die Expression der Proteine AKT, Bcl-xL und *GAPDH* detektiert (Siehe Abb. 11B). Es konnte eine Aktivierung von AKT für die ITD-exprimierenden Zellen detektiert werden. Dabei war die Aktivierung in den Ba/F3-Zellen, welche die *FLT3*-ITD598/599(12) exprimieren, leicht erhöht im Gegensatz zu den TKD1-ITD-transfizierten Zellen. Darüber hinaus konnte eine Expression von Bcl-xL in allen ITD-mutierten Zellen nach IL-3-Entzug detektiert werden. Für die *FLT3*-WT-exprimierenden Zellen konnte in Anwesenheit von IL-3 ein Signal für phosphoryliertes AKT und Bcl-xL nachgewiesen, in Abwesenheit von IL-3 weder eine Phosphorylierung von AKT noch eine Expression von Bcl-xL festgestellt werden. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl die JM-ITD als auch die hier untersuchten TKD1-ITDs zu einer konstitutiven Autophosphorylierung des *FLT3*-Rezeptors sowie zu einer Aktivierung nachgeschalteter Signalwege (AKT, *STAT5* und *ERK1/2*) führen. Außerdem kommt es zu einer veränderten Regulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL.

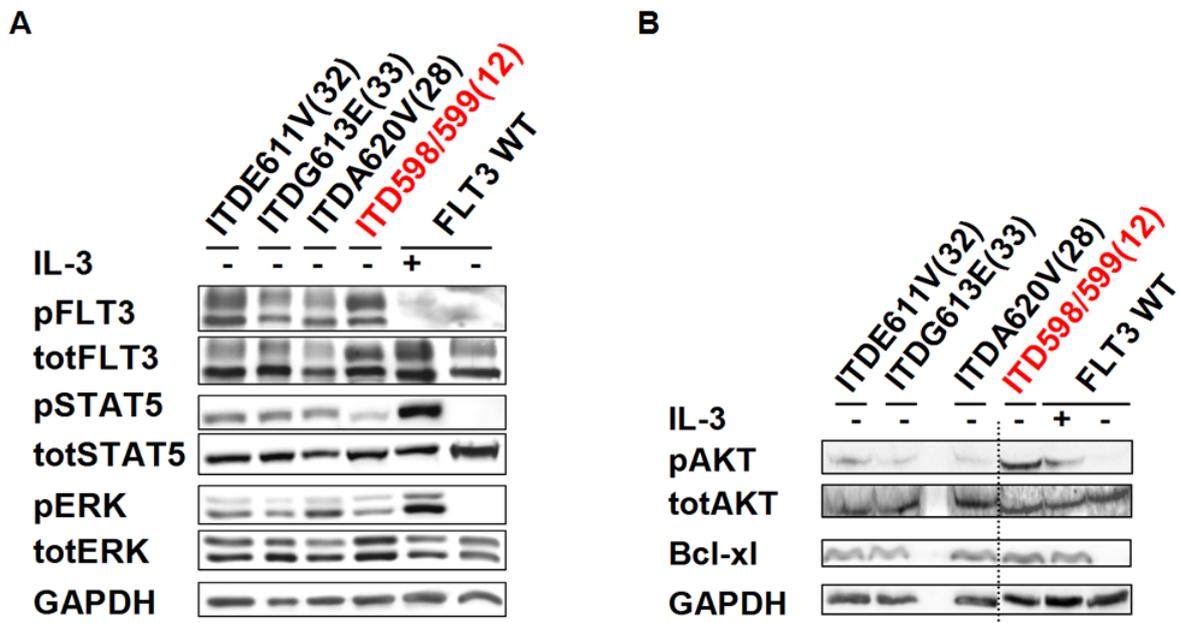


Abbildung 11: TKD1-ITD-Mutationen zeigen nach IL-3-Entzug eine konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors sowie eine Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. A) Gezeigt ist das Ergebnis der Immundetektion nach SDS-PAGE von Lysaten transfizierter Ba/F3-Zellen (*FLT3*-JM-ITD, *FLT3*-TKD1-ITDs und *FLT3*-WT) mit phosphospezifischen Antikörpern gegen den FLT3-Rezeptor (pFLT3) sowie den nachgeschalteten Signalmolekülen STAT5 und ERK1/2 (pSTAT5 und pERK). Die Membran wurde gestrippt und anschließend mit totalen FLT3-, STAT5- und ERK1/2-Antikörpern inkubiert (totFLT3, totSTAT5 und totERK). B) Die in A) verwendeten Lysate wurden erneut für eine Auftrennung der Proteine und eine Immundetektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers zur Detektion der Phosphorylierung von AKT (pAKT) durchgeführt. Die Membran wurde gestrippt und mit Antikörpern für AKT, Bcl-xL und GAPDH inkubiert.

4.1.6. Transformierte hämatopoetische Zellen sind abhängig von der *FLT3*-ITD-Mutation

Weinstein (2002) beschrieb, dass transformierte Zellen von ihrem Onkogen abhängig sind und die Inhibition des Onkogens zum Zelltod führt. Um die onkogene Abhängigkeit für die in dieser Arbeit mit unterschiedlichen *FLT3*-ITD transfizierten Ba/F3-Zellen zu testen, wurde die Methode der RNA-Interferenz angewendet. Hierbei werden kurze RNA-Moleküle, sogenannte „small interfering RNA“ (siRNA) in die Zielzellen transfiziert. Zusammen mit speziellen Proteinkomponenten bilden sie den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) und führen damit zur Translationsinhibition bestimmter Moleküle. Die siRNA-Strategie zur spezifischen FLT3-Inhibition wurde gewählt, um zum einen die onkogene Abhängigkeit der Zellen vom mutierten FLT3-Rezeptor zu überprüfen und zum anderen die Anwesenheit zusätzlicher transformierender Mutationen auszuschließen. Hierfür wurde die spezifische FLT3-siRNA sowie eine Kontroll-siRNA in die ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen (TKD1-ITDs und JM-ITD) transfiziert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde über 48 Stunden

mittels PI-Messung bestimmt (siehe Abbildung 12A). Die mit FLT3-siRNA transfizierten Zellen zeigten nach 48 Stunden einen drastischen Anstieg im Anteil apoptotischer Zellen, wobei zwischen den einzelnen Mutationen kein signifikanter Unterschied zu erkennen war.

Die Inhibition der FLT3-Expression durch die siRNA-Behandlung wurde parallel mittels Westernblot überprüft (siehe Abbildung 12B). Hierfür wurden 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion Zellysate erstellt und im Anschluss die Expression von FLT3 im Immunblot mit FLT3-Antikörpern detektiert. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Immundetektion zeigte eine Expression von FLT3-Rezeptoren für alle Ba/F3-Zelllinien, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Gleichzeitig konnte eine effiziente Unterdrückung der *FLT3*-Expression in den mit FLT3-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die mit *FLT3*-ITDs transfizierten Zellen (Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32), Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33), Ba/F3 *FLT3*-ITDA620V(28) und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)) eine Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation aufweisen. Darüber hinaus zeigte dieses Ergebnis, dass keine anderen transformierenden Mutationen erworben wurden.

4.2. Inhibition der konstitutiv aktivierten FLT3-Rezeptoren durch Verwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren

Der Prototyp der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) stellt Imatinib Mesylat (STI571) dar. Die guten Forschungsergebnisse zur Inhibition der konstitutiv aktivierten Bcr-Abl-Kinase bei der CML förderte die Idee, die autophosphorylierte FLT3-Kinase als therapeutisches Ziel in der AML zu inhibieren (Sattler et al., 2003; Kelly et al., 2002; Kiyoi et al., 2002; Mizuki et al., 2000; le Coutre et al., 1999; Deiniger et al., 1997; Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996). Schon frühe Untersuchungen mit FLT3-Inhibitoren zeigten, dass TKIs durch Inhibition der Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors die *FLT3*-ITD-vermittelte Proliferation sowohl in Zelllinien als auch in primären AML-Blasten unterbinden und den Zelltod vermitteln (Levis et al., 2002; Weisberg et al., 2002). In kürzlich publizierten Forschungsergebnissen konnten Smith et al. (2012) die ITD-Mutation des FLT3-Rezeptors als ein therapeutisches Ziel in der AML validieren.

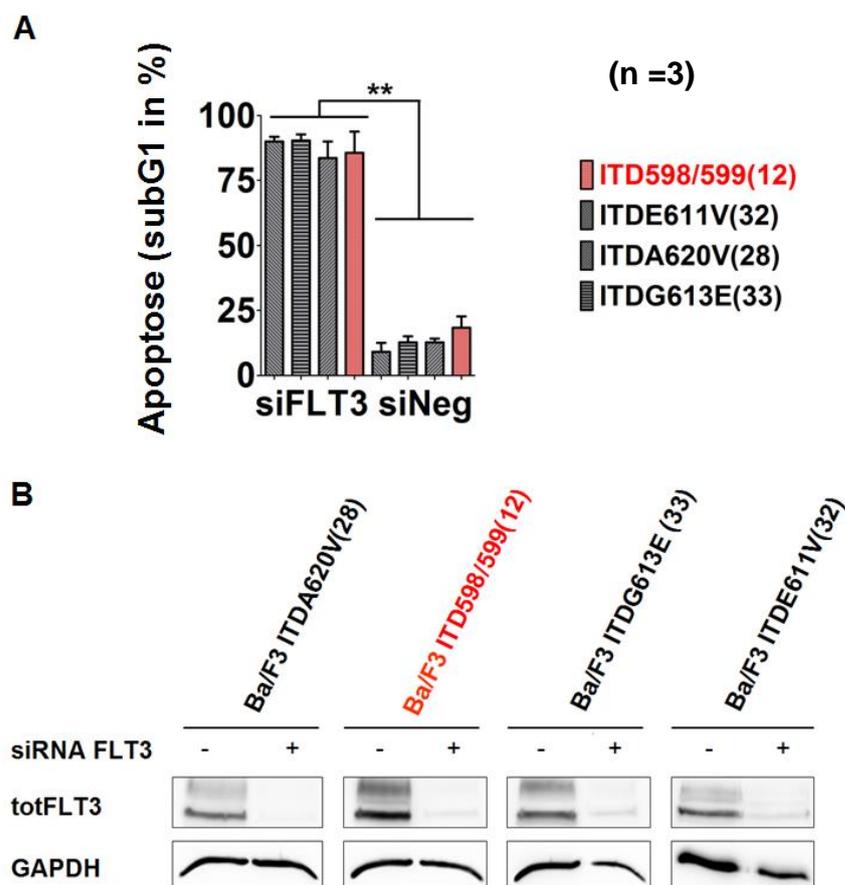


Abbildung 12: Ba/F3-ITD-exprimierende Zellen sind abhängig vom onkogenen FLT3-Rezeptor.
 A) Darstellung des Resultats der durchflusszytometrischen PI-Färbung 48 Stunden nach siRNA Transfektion, wobei der Prozentsatz der Zellen in subG1-Phase den Anteil apoptotischer Zellen angibt (Apoptose (subG1 in %)). Ba/F3-Zellen, welche die unterschiedlichen ITD-Mutationen exprimieren, wurden mit FLT3-spezifischer siRNA (siFLT3) bzw. mit Kontroll-siRNA (siNeg) transfiziert. (p-Wert: ** = $p < 0,01$). B) Dargestellt ist der Immunblot der lysierten Ba/F3-Zellen 24 Stunden nach siRNA-Transfektion unter Verwendung von FLT3- und GAPDH-Antikörpern.

4.2.1. FLT3-ITDs in der TKD1-Domäne zeigen eine differentielle Apoptose-Induktion nach Tyrosinkinase-Inhibitoren-Behandlung

Die Effektivität der TKIs kann durch Resistenzen, welche unterschiedliche Gründe und Mechanismen haben können, unterbunden werden (Fischer, 2011). So konnten Breitenbuecher et al. (2009) eine primäre Resistenz gegenüber TKIs aufgrund einer TKD1-ITD im Beta 2-Faltblatt mit der spezifischen Lokalisationsstelle AS627 des FLT3-Rezeptors beschreiben. Die Studie von Kayser et al. (2009) zeigte, dass ITDs im Beta 1-Faltblatt der TKD1 des FLT3-Rezeptors eine Resistenz gegenüber Chemotherapie in FLT3-ITD-positiven Patienten vermitteln. Die Daten deuten daraufhin, dass die ITD-Gruppe im Beta 1-Faltblatt des FLT3-Rezeptors im Vergleich zu den JM-ITD-Mutationen einen anderen biologischen Phänotyp ausbildet. Es stellte sich daher die Frage, ob die Beta 1-Faltblatt-ITDs des FLT3-Rezeptors auch gegenüber TKI-Behandlungen einen differentiellen Phänotyp ausbilden. Um

diese Frage zu beantworten, wurden die unterschiedlichen *FLT3*-ITD-exprimierenden Zelllinien (Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32), Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33) und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)) mit einzelnen TKIs (Midostaurin, Sorafenib und Quizartinib; siehe Abbildung 13) behandelt und der Anteil an apoptotischen Zellen nach 24 und 48 Stunden bestimmt. In diesen Experimenten wurde immer die JM-ITD598/599(12) als Vergleich zu Beta 1-Faltblatt-Mutationen mitgeführt. Für die Experimente wurden Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32), Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33) und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12) zu je 30.000 Zellen/ml ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Inhibitoren über 48 Stunden inkubiert. Bei den Messungen wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometer nach PI-Färbung bestimmt. Hierbei wurden alle Zellen mit einem DNA-Gehalt ($< 2n$) als apoptotisch definiert.

Zunächst wurden unterschiedliche Konzentrationen (10 nM, 50 nM und 100 nM) von Midostaurin (PKC412) verwendet. Bei PKC412 handelt es sich ursprünglich um einen Proteinkinase-C-Inhibitor, doch verschiedene Untersuchungen zeigten, dass das Staurosporin-Derivat eine hohe Wirksamkeit ($IC(50) < 15nM$) auf Zellen mit mutiertem *FLT3*-Rezeptor hat (Armstrong et al., 2003; Grundler et al., 2003; Weisberg et al., 2002; Fabbro et al., 2000; Ozaki et al., 2000). Als zweiter Inhibitor wurde Sorafenib (BAY-439006) mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM, 50 nM und 100 nM) für die Behandlung der Zellen verwendet. Dieser TKI wurde ursprünglich zur Behandlung von soliden Tumoren mit gesteigertem Raf1-Signal eingesetzt, um das Tumorwachstum zu inhibieren (Hotte et al., 2002). Auclair et al. (2007) konnten zeigen, dass Sorafenib ebenfalls spezifisch mit einer $IC(50) < 10 nM$ auf die Autophosphorylierung von *FLT3*-ITD-mutierten Rezeptoren in leukämischen Zelllinien wirkt. Als dritter Inhibitor wurde Quizartinib (AC220) mit verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (10 nM, 50 nM und 100 nM) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen TKI der zweiten Generation, weil er spezifisch für die Inhibition von *FLT3* entwickelt wurde und dieser im Vergleich zu den übrigen in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren eine höhere Spezifität in Bezug auf die Inhibition des *FLT3*-Rezeptors aufweisen soll (Zarrinkar et al., 2009). Die jeweiligen Messungen nach 24 Stunden zeigten, dass die Beta 1-Faltblatt-ITD-Zellen unter TKI-Behandlung eine verzögerte Induktion von Apoptose vermitteln im Gegensatz zu der *FLT3*-JM-ITD598/599(12)-exprimierenden Ba/F3-Zellen. Dieser Effekt war bei allen verwendeten Konzentrationen und allen verwendeten TKIs hinweg zu beobachten (siehe Abb. 14A-C).

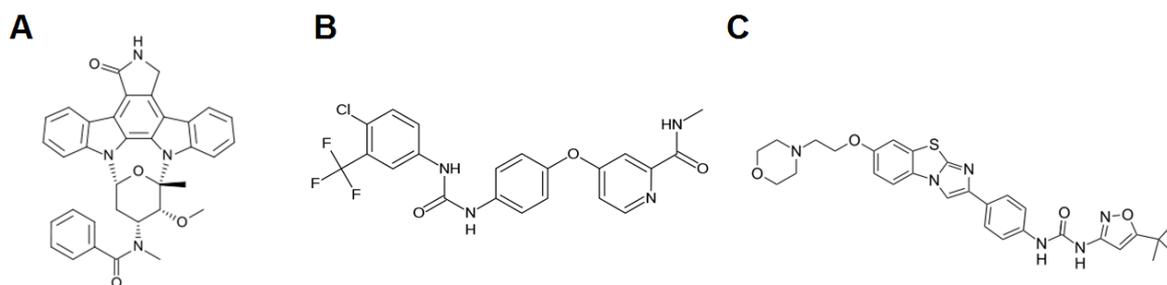


Abbildung 13: Strukturformeln der verwendeten TKI. A) Midostaurin (PKC412). B) Sorafenib (BAY-439006). C) Quizartinib (AC220).

Der Unterschied im Anteil apoptotischer Zellen zwischen den Beta 1-Faltblatt-ITDs (Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32) und Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33)) sowie der *FLT3*-JM-ITD598/599(12)-Mutante konnte nicht mehr detektiert werden, sobald die Zellen über einen längeren Zeitpunkt (48 Stunden) behandelt wurden (siehe Abb. 14D-F). Zusammengefasst zeigen die IC(50)-Werte in dem hier verwendeten Modellsystem eine verminderte Aktivität der TKIs gegenüber der Kontroll-ITD *FLT3*-JM-ITD598/599 nach 24 Stunden. Für die *FLT3*-ITD598/599(12) konnte für PKC412 eine IC(50) von weniger als 30 nM, für Sorafenib von 10 nM und für AC220 von 25 nM bestimmt werden. Dagegen lag die IC(50) der Ba/F3 Zellen mit der *FLT3*-ITDE611V(32) für PKC412 und Sorafenib bei über 100 nM, und bei ungefähr 75 nM für AC220. Für die Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33)-Zellen konnte ein IC(50) für PKC412 und Sorafenib von über 100 nM beobachtet werden. Für AC220 lag die IC(50) bei ungefähr 100 nM. Ähnliche Ergebnisse konnten unter Verwendung von SB als Apoptose-Marker beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich durch die Ergebnisse feststellen, dass die Expression von *FLT3*-ITD-Mutationen im Beta 1-Faltblatt in Ba/F3-Zellen ein differentielles Verhalten gegenüber TKIs vermittelt.

4.2.2. *FLT3*-TKIs inhibieren die Tyrosin-Phosphorylierung von *FLT3*-ITDs sowie die nachgeschalteten Signalkaskaden

Die beobachtete Resistenz kann aufgrund einer veränderten Inhibition der Tyrosinkinase des *FLT3*-Rezeptors auftreten, was bereits für verschiedene Punktmutationen beschrieben wurde (Grundler et al., 2003). Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen TKIs zu einer veränderten Inhibition der unterschiedlichen konstitutiv aktivierten ITD-Mutationen (Beta 1-Faltblatt- und JM-ITD) führen, wurden Zellen ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib und Quizartinib für vier Stunden behandelt und lysiert. Nach SDS-PAGE wurde anschließend eine Immundetektion mit phosphospezifischen Antikörpern gegen den *FLT3*-Rezeptor (Y591) und gegen die nachgeschalteten Signalwege STAT5 (Y694/699) und

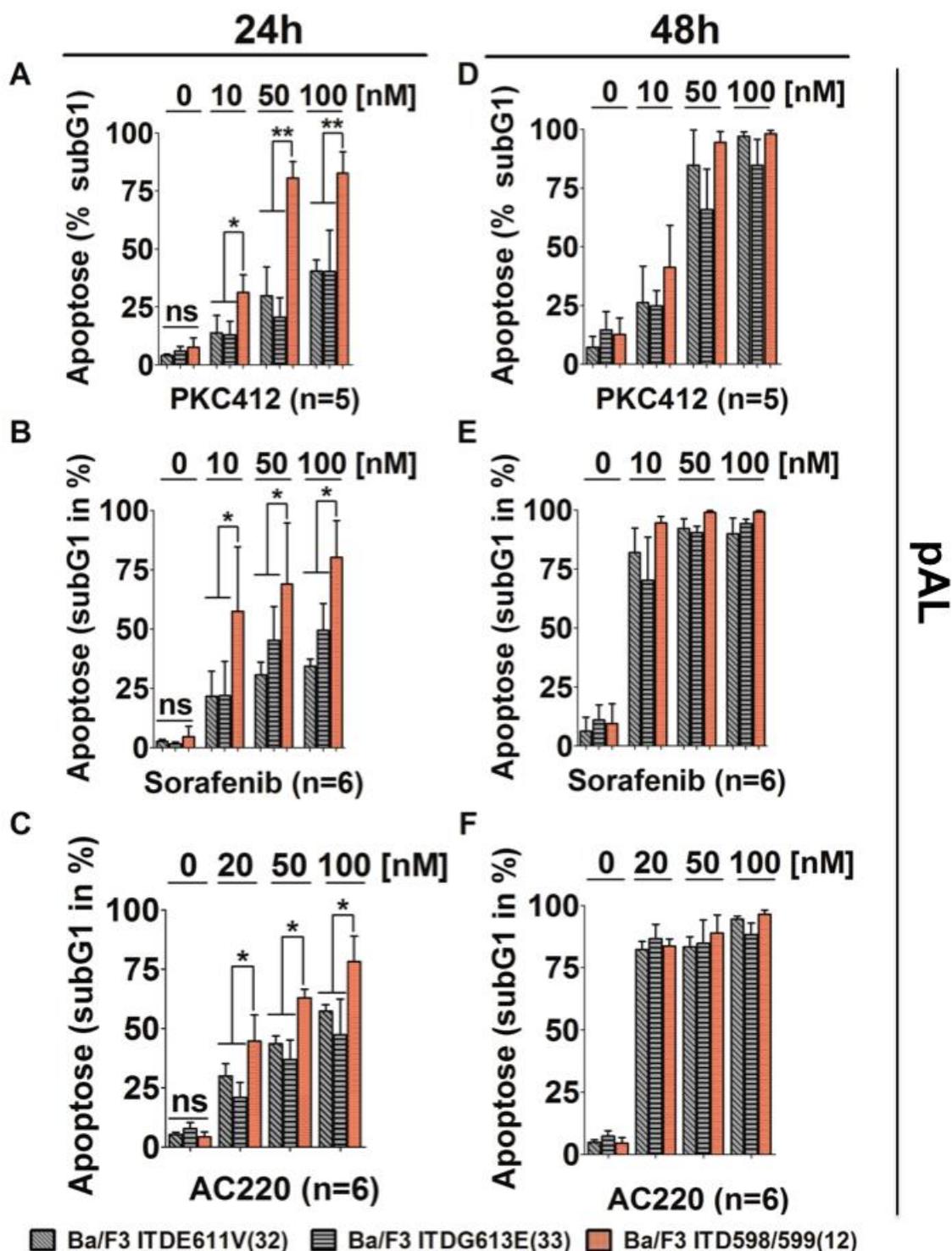


Abbildung 14: ITDs im Beta 1-Faltblatt des FLT3-Rezeptors zeigen eine verzögerte Apoptose-Induktion nach TKI-Behandlung in Ba/F3-Zellen. A-C) Darstellung der PI-Färbung nach 24-stündiger Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen des jeweiligen TKI. Alle Zellen mit einem DNA-Gehalt ($<2n$) wurden hier als apoptotische Zellen definiert. Der Anteil an apoptotischen Zellen (Apoptose (subG1 in %)) ist für Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12) (rote Balken) im Vergleich zu Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32) und Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32) gezeigt. (p-Wert: * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$). D-F) Darstellung der Ergebnisse nach 48-stündiger Behandlung analog zu A-C. Im Anteil der apoptotischen Zellen wurde zwischen den einzelnen Mutationen kein signifikanter Unterschied beobachtet.

ERK1/2 (T202/Y204) durchgeführt. Danach wurden die Membranen mit Antikörpern der unphosphorylierten Proteine sowie einer Beladungskontrolle (FLT3, STAT5, ERK1/2 und GAPDH) erneut inkubiert (siehe Abb. 15). Die Analyse der unterschiedlichen *FLT3*-ITD-Mutationen nach Sorafenib- und AC220-Behandlung zeigte, dass die unterschiedlichen TKIs die Autophosphorylierung der mutierten FLT3-Rezeptoren (JM-ITD598/599(12), ITDE611V(32) und ITDG613E(33)) an der essentiellen Phosphorylierungsstelle Y591 inhibieren. Für alle Mutationen konnte gezeigt werden, dass schon geringe Konzentrationen (10 nM bei Sorafenib sowie 20 nM bei AC220) für eine starke Inhibition der

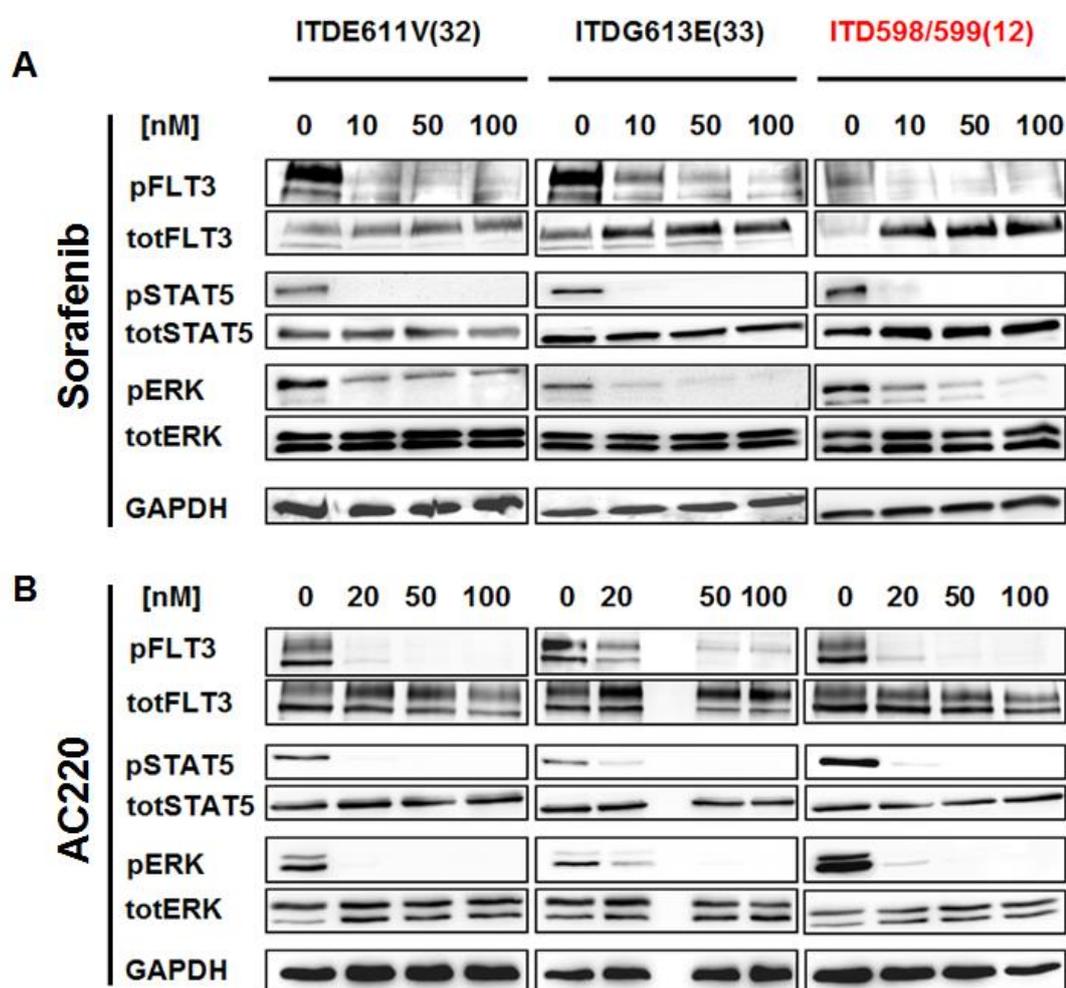


Abbildung 15: Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch Sorafenib und AC220. Die mit unterschiedlichen Beta 1-Faltblatt-ITDs (*FLT3*-ITDE611V(32) und *FLT3*-ITDG613E(33); schwarze Schrift) bzw. mit der JM-ITD598/599(12) (rote Schrift) transfizierten Ba/F3-Zellen wurden für vier Stunden mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen TKIs behandelt. Im Anschluss folgten Westernblot-Analysen mit Phospho-Antikörpern gegen Tyr591 des FLT3-Rezeptors (pFLT3) und Tyr694/699 des STAT5-Proteins (pSTAT5). Für die Analyse der Aktivität von ERK1/2 wurde ein Antikörper gegen die AS T202 und Y204 verwendet (pERK). Um eine mögliche Veränderung des Phosphosignals durch Proteindegradation auszuschließen, wurden die entsprechenden totalen Antikörper (FLT3, ERK1/2 und STAT5) bzw. GAPDH als Beladungskontrolle verwendet.

Autophosphorylierung der FLT3-Rezeptoren an der Stelle Y591 ausreichen. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung unter Verwendung spezifischer Phospho-Antikörper für STAT5 (Y694/699), dass die Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung gleichzeitig zu einer starken Reduktion der Phosphorylierung von STAT5 führte. Weiterhin konnten keine Veränderungen der totalen Proteinlevel von FLT3 und STAT5 nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen ergaben sich für ERK1/2. Die Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers zur Detektion der Phosphorylierung der AS T202 bzw. Y204 der ERK1/2 Proteine zeigte eine starke Reduktion des Signals nach Inhibition der FLT3-Kinase-Aktivität durch Sorafenib als auch durch AC220. Da eine unterschiedliche IC(50) für AC220 in den PI-Ansätzen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 14C), sollte nun überprüft werden, ob die unterschiedlichen mutierten FLT3-Kinasen bei geringeren Konzentrationen bereits inhibiert sind. Hierfür wurden die *FLT3*-ITD-exprimierenden Zellen (JM-ITD598/599(12), ITDE611V(32) und ITDG613E(33)) mit den von Zarrinkar et al. (2009) publizierten Konzentrationen von AC220 für vier Stunden behandelt, lysiert und mittels Westernblot die Autophosphorylierung der FLT3-Kinasen und die nachgeschalteten Signalwege STAT5 und ERK analysiert (siehe Abb. 16).

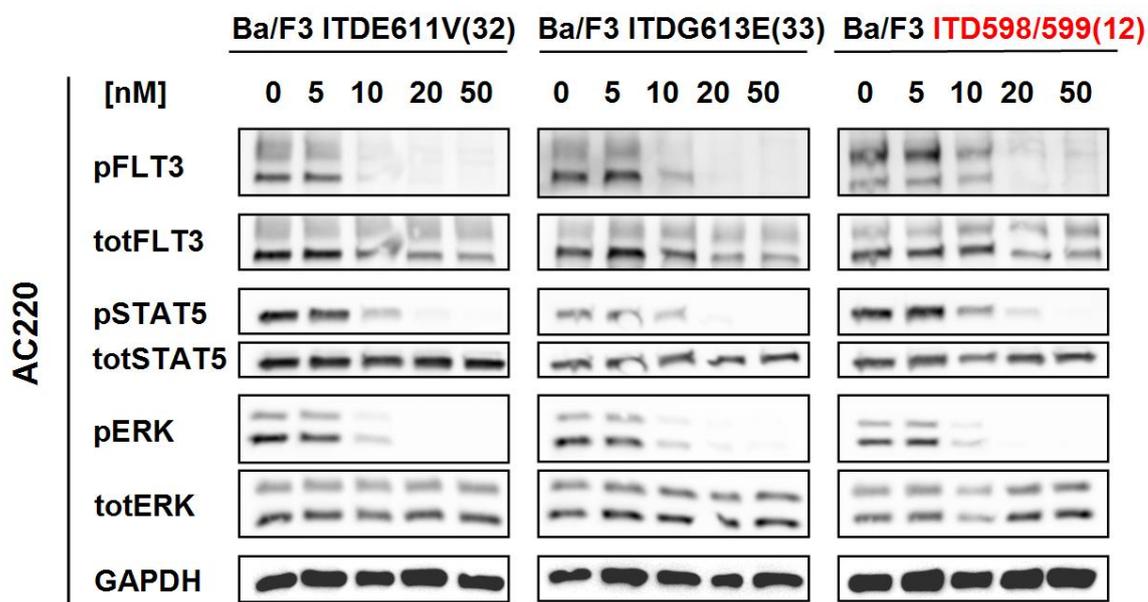


Abbildung 16: Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch AC220. Die mit unterschiedlichen Beta 1-Faltblatt-ITDs ((Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32) und Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33); schwarze Schrift) bzw. der JM-ITD598/599(12) (rote Schrift) transfizierten Ba/F3-Zellen wurden für vier Stunden mit den angegebenen Konzentrationen AC220 behandelt. Im Anschluss folgten Immunblot-Analysen mit Phospho-Antikörpern gegen Tyr591 des FLT3-Rezeptors (pFLT3) und Tyr694/699 des STAT5-Proteins (pSTAT5). Für die Analyse der Aktivität von ERK1/2 wurde ein Antikörper gegen die AS T202 und Y204 verwendet (pERK). Nach dem Strippen wurden die entsprechenden totalen Antikörper (FLT3, ERK1/2 und STAT5) bzw. GAPDH als Beladungskontrolle zur Inkubation der Membran verwendet.

Die Untersuchung zeigte, dass zwischen den Konzentrationen von 10 nM und 20 nM eine komplette Inhibition der FLT3-Kinasen als auch der nachgeschalteten Signale (STAT5/ERK) erfolgte. Dies lässt vermuten, dass im Vergleich zu von Zarrinkar et al. (2009) publizierten Daten die Aufnahme von AC220 in dem hier verwendeten Zellkulturmodell verändert ist.

Der gleiche Ansatz wie für Sorafenib wurde unter Verwendung von PKC412 durchgeführt. Die mit Beta 1-Faltblatt-ITDs bzw. JM-ITD-transfizierten Zellen wurden ausplattiert, mit unterschiedlichen Konzentrationen PKC412 behandelt und lysiert. Die Immundetektion der Phosphorylierung von FLT3, STAT5, ERK1/2 wurde analog zu den AC220- und Sorafenib-Experimenten durchgeführt. Um eine mögliche Veränderung des Phosphosignals durch Proteindegradation auszuschließen, wurden die entsprechenden Antikörper (FLT3, ERK1/2 und STAT5) bzw. GAPDH als Beladungskontrolle verwendet (siehe Abb. 17). Unter PKC412 Behandlung konnte sowohl bei dem Rezeptor mit der JM-ITD598/599(12) als auch bei den Rezeptoren mit

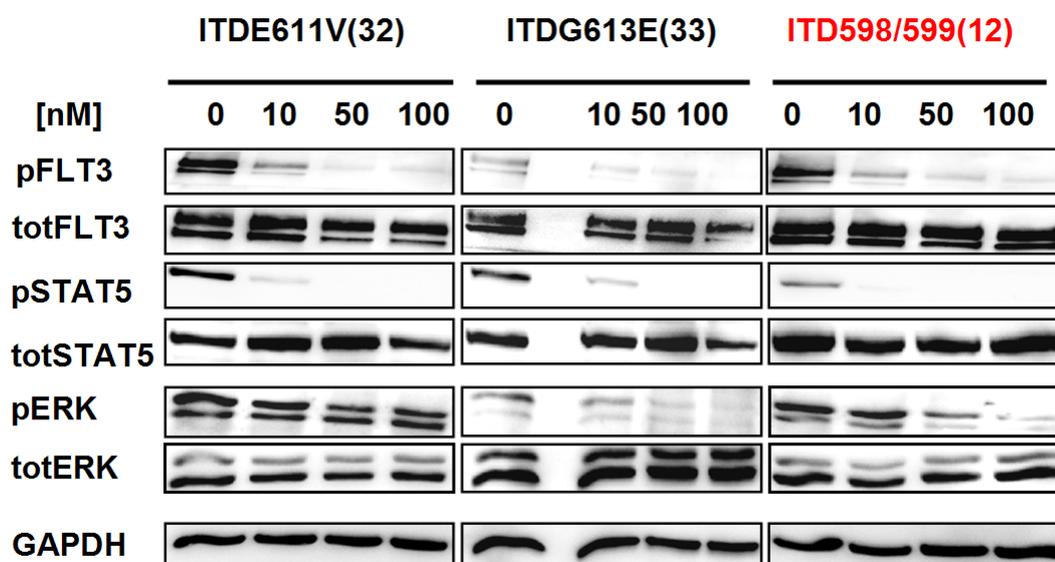


Abbildung 17: Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch PKC412. Die mit unterschiedlichen Beta 1-Faltblatt-ITDs ((Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32) und Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33); schwarze Schrift) bzw. der JM-ITD598/599(12) (rote Schrift) transfizierten Ba/F3-Zellen wurden für vier Stunden mit den angegebenen Konzentrationen PKC412 behandelt. Im Anschluss folgten Immunblot-Analysen mit Phospho-Antikörpern gegen Tyr591 des FLT3-Rezeptors (pFLT3) und Tyr694/699 des STAT5-Proteins (pSTAT5). Für die Analyse der Aktivität von ERK1/2 wurde ein Antikörper gegen die AS T202 und Y204 verwendet (pERK). Nach dem Strippen wurden die entsprechenden totalen Antikörper (FLT3, ERK1/2 und STAT5) bzw. GAPDH als Beladungskontrolle zur Inkubation der Membran verwendet.

den Beta 1-Faltblatt-ITDs, ITDE611V(32) und ITDG613E(33) eine Inhibition der konstitutiv aktivierten FLT3-Kinase an Y591 schon bei einer Konzentration von 10 nM festgestellt werden. Die Aktivität von STAT5 sank mit Inhibition der Autophosphorylierung der FLT3-Kinase für alle *FLT3*-ITD-exprimierenden Zellen. Für die JM-ITD598/599(12) konnte eine Reduktion von ERK1/2 mit steigender TKI-Konzentration beobachtet werden. Dieser Effekt konnte ebenso für die *FLT3*-ITDG613E(33) detektiert werden. Interessanterweise zeigte die zweite ITD mit Lage im Beta 1-Faltblatt, ITDE611V(32), keine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 an den spezifischen AS T202 und Y204. Der Immunblot zeigte, dass eine aberrante Phosphorylierung von ERK1/2 unter PKC412 auftrat und ließ vermuten, dass die Resistenz in Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)-Zellen durch ERK1/2 vermittelt wird. Um diese differentielle Signalaktivierung von ERK1/2 weiter zu analysieren, wurden weitere Versuche durchgeführt, wobei die Signalweiterleitung der „Ras-Raf-MEK-Erk“-Signaltransduktionskaskade mit dem spezifischen MEK-Inhibitor U0126 gehemmt werden sollte. Hierfür wurden Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)- und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)-Zellen mit 10 µM U0126-Inhibitor für vier Stunden inkubiert, lysiert und anschließend für Westernblot-Analysen eingesetzt. Unter Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern wurde die Aktivierung von ERK1/2 analysiert (siehe Abb. 18A). Der Immunblot zeigte, dass unter Verwendung des Inhibitors U0126 die Phosphorylierung von ERK1/2 inhibiert wird. Parallel wurden die Zellen mit und ohne 10 nM PKC412 sowie in Kombination mit 10 µM U0126-Inhibitor für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Anteil an apoptotischen Zellen unter Verwendung von PI-Färbung bestimmt (siehe Abb. 18B). In diesem Experiment konnte unter Zugabe von PKC412 ein erhöhter Anteil an Apoptose in den Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)-Zellen im Vergleich zu Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)-Zellen beobachtet werden. Eine Kombinationsbehandlung der Zellen führte in beiden Zelllinien zu erhöhter Apoptose. Bei den Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)-Zellen lag die Apoptoserate nach PKC412- und MEK-Inhibitor-Behandlung bei lediglich 45 %, wohingegen für die Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)-Zellen knapp 80 % Apoptose detektiert werden konnte. Die Experimente zeigten, dass ERK1/2-Inhibition in Kombination mit PKC412-Behandlung zu einer Erhöhung der Apoptose von Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)-Zellen führte. Doch konnte die Resistenz der Beta 1-Faltblatt-ITD gegenüber PKC412 durch die Kombinationsbehandlung mit U0126 nicht überwunden werden, was vermuten lässt, dass ERK1/2 nur eine geringe Rolle bei der Resistenzvermittlung spielt.

Zur weiteren Analyse der Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung durch TKIs, wurden *FLT3*-ITDE611V(32)-, *FLT3*-ITDG613E(33)- und *FLT3*-ITD598/599(12)-exprimierende

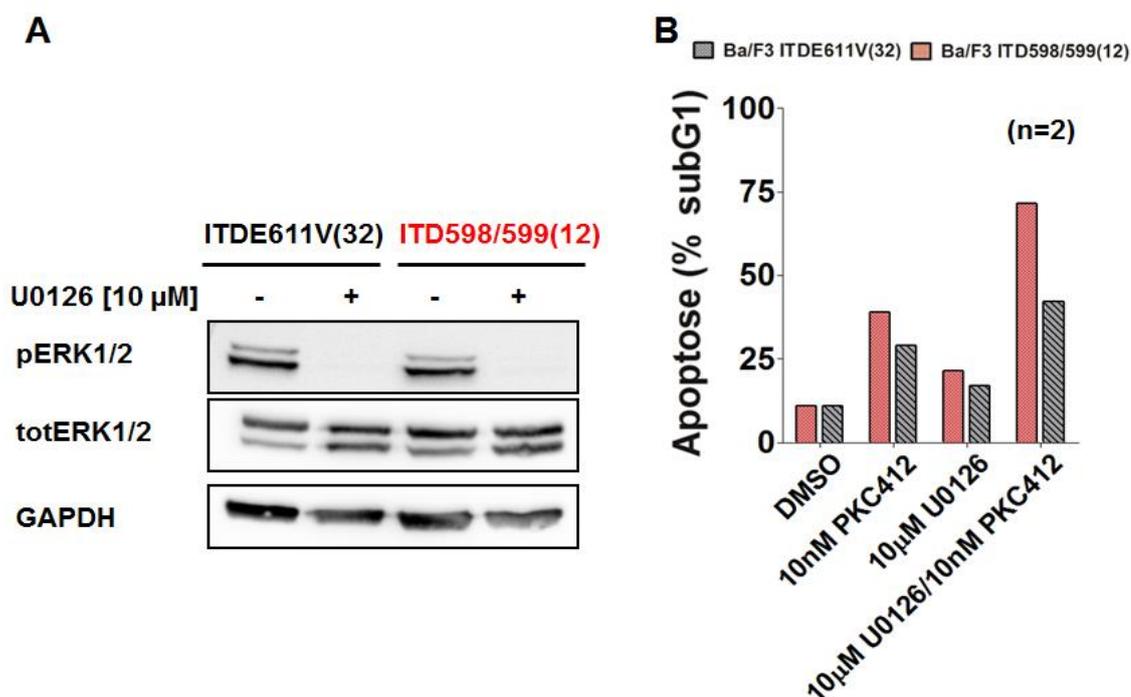


Abbildung 18: Inhibition von ERK1/2 und Sensitivität gegenüber PKC412 in Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)-Zellen. A) Gezeigt ist die Westernblot-Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2 in *FLT3*-ITDE611V(32)-transfizierten Ba/F3-Zellen. Die Zellen wurden für vier Stunden mit und ohne MEK-Inhibitor U0126 (10 μ M) behandelt und lysiert. Im Anschluss folgte eine Immunblot-Analyse mit Phospho-Antikörpern für ERK1/2 gegen die AS T202 und Y204 (pERK). Nach dem Strippen wurden Antikörper für totales ERK1/2 und GAPDH als Beladungskontrolle zur Inkubation der Membran verwendet. Als Kontrolle wurden *FLT3*-ITD598/599(12)-exprimierende Ba/F3-Zellen verwendet. B) Gezeigt ist ein repräsentativer Graph zur Induktion von Apoptose, die durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung 24 Stunden nach Behandlung mit PKC412 (10nM), U0126 (10 μ M), oder einer Kombination ermittelt wurde. Hierbei wurden alle Zellen mit einem DNA-Gehalt (< 2n) als apoptotische Zellen definiert. Der Anteil an apoptotischen Zellen (Apoptose (subG1 in %)) ist für Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12) (rote Balken) im Vergleich zu Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32) (graugestreifte Balken) gezeigt.

Ba/F3-Zellen für eine Stunde mit 50 nM PKC412 behandelt, lysiert und für eine Immunopräzipitation gegen den *FLT3*-Rezeptor eingesetzt. Die *FLT3*-Präzipitate wurden zunächst mittels Immunblot unter Verwendung eines allgemeinen Phospho-Tyrosin-Antikörpers (Y100) auf die Phosphorylierung des *FLT3*-Rezeptors untersucht (siehe Abb. 19). Zusätzlich wurde eine densitometrische Analyse der Signale durchgeführt, um den Grad der Inhibition der *FLT3*-Autophosphorylierung durch PKC412 genauer bestimmen zu können. Das Ergebnis zeigte, dass die mutierten *FLT3*-Rezeptoren durch 50 nM PKC412 innerhalb einer Stunde stark inhibiert sind. Dabei war die Autophosphorylierung des *FLT3*-ITDE611V(32)-Rezeptors am stärksten mit 87 % im Vergleich zu der DMSO-behandelten Kontrolle inhibiert. Der *FLT3*-ITDG613E(33)-Rezeptor zeigte eine Inhibition von 64 % und der Rezeptor mit der *FLT3*-ITD598/599(12) eine inhibierte Autophosphorylierung von 72 % gegenüber der DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 19).

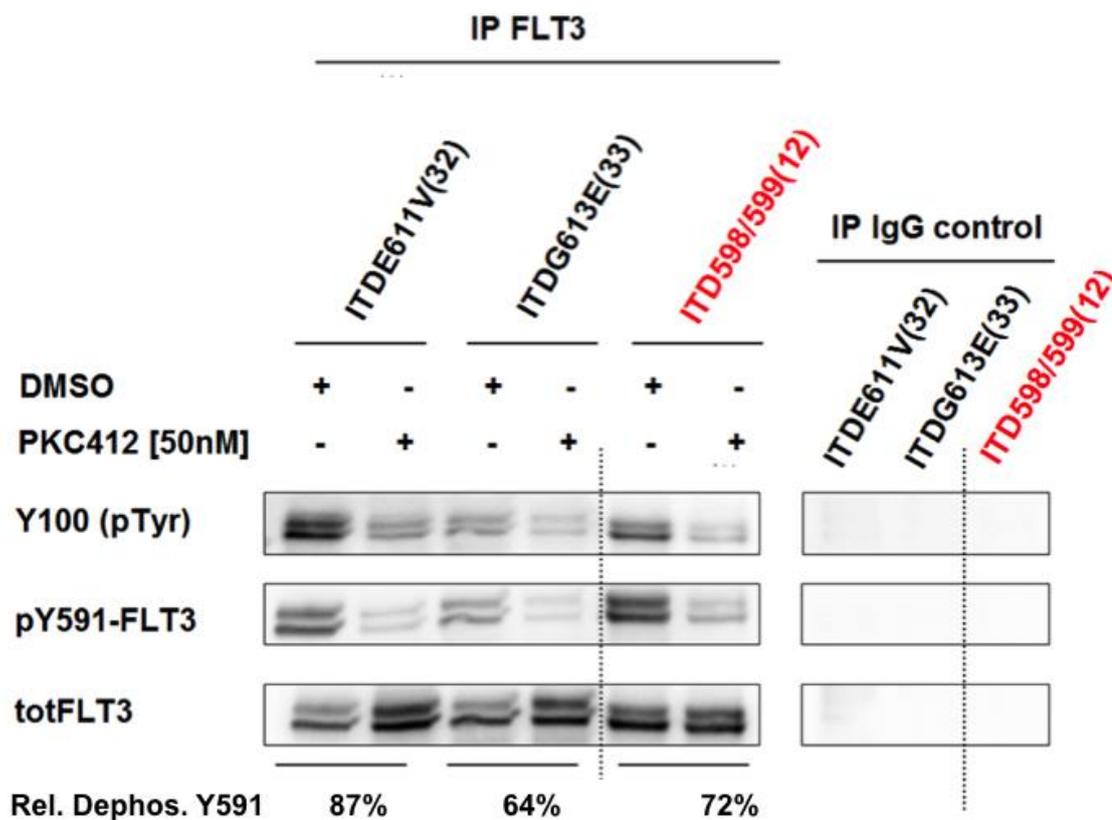


Abbildung 19: PKC412 inhibiert die unterschiedlichen konstitutiv aktivierten FLT3-ITD-Rezeptoren. Ba/F3-Zellen, die ITD-Mutationen im Beta 1-Faltblatt (schwarze Schrift) bzw. in der JM-Domäne (rote Schrift) des FLT3-Rezeptors exprimieren, wurden nach einstündiger Behandlung mit und ohne PKC412 lysiert und die FLT3-Rezeptoren immunopräzipitiert. Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt und die Phosphorylierung mit einem Phospho-Tyrosin-Antikörper (Y100) und anschließend mit dem Phospho-FLT3-Antikörper (Y591) detektiert (pY591-FLT3). Im Anschluss wurden die Membranen gestrippt und mit totalem FLT3-Antikörper inkubiert. Zusätzlich wurden die Signale densitometrisch bestimmt, wobei Y591 mit totalem FLT3-Level verglichen wurde (Rel. Dephos. Y591).

Zusammenfassend lässt sich durch die Experimente feststellen, dass die unterschiedlichen konstitutiv aktiven FLT3-Rezeptoren (Beta 1-Faltblatt-ITD und JM-ITD) in Ba/F3 Zellen durch unterschiedliche TKIs ohne signifikanten Unterschied inhibiert wurden. Dies lässt vermuten, dass die differentielle Verzögerung der Beta 1-Faltblatt-ITDs durch TKIs über einen phosphorylierungsunabhängigen Mechanismus verläuft.

4.2.3. Analyse alternativer Signalwege nach Inhibition der konstitutiven Aktivierung der FLT3-Rezeptoren mit einer Beta 1-Faltblatt-ITD

Die beobachtete signifikante Verzögerung der Apoptose-Induktion bei Beta 1-Faltblatt-ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen durch TKI-Behandlung (vgl. Abb 14) kann durch verschiedene Mechanismen entstehen. Bagrintseva et al. (2005) beschrieben einen Resistenzmechanismus

durch gesteigerte Bcl-xL-Expression. Darüber hinaus zeigten Breitenbuecher et al. (2009), dass eine TKD1-ITD mit der Lokalisation im Beta 2-Faltblatt *in vitro* und *in vivo* eine Resistenz gegenüber TKIs vermittelt. Diese spezielle Mutation führt zu einer phosphorylierungsunabhängigen Bindung von dem Adapterprotein GRB2 mit dem FLT3-Rezeptor. Diese Bindung vermittelt eine Expression von Mcl-1 und einem anti-apoptotischen Effekt im Zellkulturmodell. Um die Beta 1-Faltblatt-ITD-exprimierenden Zellen auf eine veränderte Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie (z.B. Bcl-xL und Mcl-1) zu analysieren, wurden die Zellen für zwei Stunden mit und ohne 100 nM PKC412 behandelt, lysiert und direkt für die SDS-PAGE eingesetzt. In der Westernblot-Analyse wurden mittels spezifischer Antikörper die Expression von Bcl-xL und von Mcl-1 detektiert (siehe Abb. 20). Das Ergebnis der Analyse zeigte, dass in verschiedenen Ba/F3-Zellen mit den unterschiedlichen *FLT3*-ITD-Varianten weder Mcl-1 noch Bcl-xL eine differentielle Expression aufweisen. Die Inhibition der verschiedenen mutierten FLT3-Rezeptoren führte lediglich zu einer geringen Reduktion der Proteinlevel von Mcl-1, jedoch zu keiner Veränderung der Bcl-xL-Level. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 und Bcl-xL nicht differentiell in den unterschiedlichen FLT3-Mutanten reguliert waren.

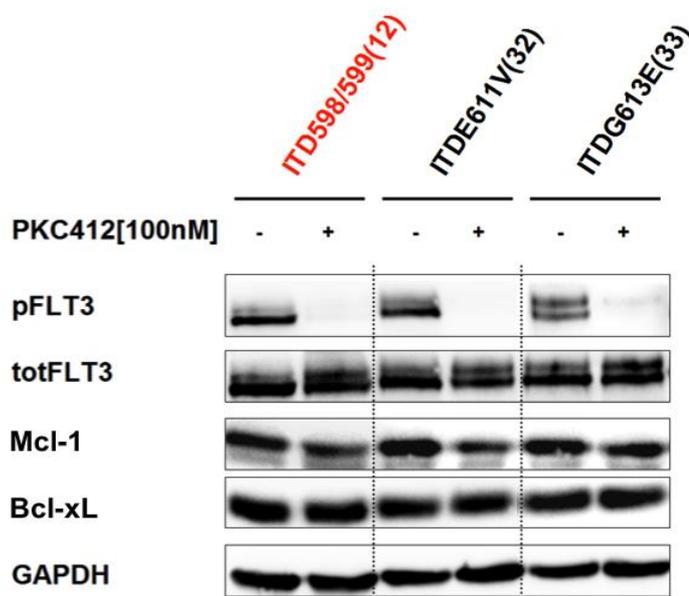


Abbildung 20: TKI-Behandlung führt nicht zu einer unterschiedlichen Expression von Bcl-xL und Mcl-1 in den unterschiedlichen Ba/F3 *FLT3*-ITD Zellen. Nach zweistündiger Behandlung mit PKC412 wurden die Beta 1-Faltblatt-ITD- (schwarze Schrift) und die JM-ITD-exprimierenden (rote Schrift) Ba/F3 Zellen lysiert. Mittels Immunblot wurde nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE die Expression von Mcl-1 und Bcl-xL überprüft.

4.3. Stabile Transduktion von hämatopoetischen Vorläuferzelllinien mit *FLT3*-TKD1-ITDs und *FLT3*-JM-ITDs

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen divergenten biologischen Phänotyp der ITD-Mutationen im Beta 1-Faltblatt des FLT3-Rezeptors hin. Bisher wurden die Experimente im Vergleich zu einer einzelnen ITD-Mutation in der JM-Domäne (*FLT3*-ITD598/599(12)) durchgeführt. Um die bisherigen Ergebnisse zu validieren, wurden die untersuchten TKD1-Mutationen und JM-ITD-Mutation sowie zwei weitere JM-ITD-Mutationen (siehe Abb. 21) mittels „In-Fusion“-Klonierung in ein zweites Vektorsystem pMSCV-Puromycin-IRES-GFP-(PIG)-Expressionsvektor (Mayr et al., 2009) kloniert. Bei dem Vektor handelt es sich um ein retrovirales Vektorsystem mit einem CMV-Promotor zur konstitutiven Genexpression des Zielgens. Zusätzlich enthält der Vektor eine Puromycin-Resistenzkassette und das Gen, welches für das „green fluorescent protein“ (GFP) kodiert. Beide können für eine positive Selektion in eukaryotischen Zellen genutzt werden. Die beiden neuen JM-ITD-Mutationen waren in Patienten identifiziert und bereits beschrieben worden (Kelly et al., 2002), lagen aber in einem anderen Vektorsystem vor. Eine positive Klonierung wurde mittels Sequenzierung validiert. Die neuen Mutationen wurden entsprechend der bereits beschriebenen Nomenklatur wie folgt benannt: *FLT3*-ITD598/599GL(22) und *FLT3*-ITDK602R(7). Die erste JM-ITD hat eine Länge von 66 Nukleotiden bzw. 22AS. Durch die Lokalisation zwischen den beiden Codons der AS598 und 599 kommt es zu keiner Punktmutation. Es tritt der Einschub von zwei zusätzlichen Aminosäuren (Glycin (G) und Leucin (L)) auf, welcher angezeigt ist mit GL nach der Integrationsstelle. Im Rest dieser Arbeit wird der Einfachheit halber diese Mutation als *FLT3*-ITD598/599(22) bezeichnet. Dahingegen weist die zweite JM-ITD eine Lokalisation im Codon der AS602 auf, was zu einer Punktmutation und einem Austausch von Lysin durch Arginin führt. Diese ITD ist 21 Nukleotide bzw. 7AS lang. Die unterschiedlichen Konstrukte wurden parallel für Infektionen von Ba/F3- und 32D-Zellen verwendet. Ähnlich wie die Ba/F3-Zellen handelt es sich bei 32D-Zellen um eine immortalisierte Vorläuferzelllinie isoliert aus murinem Knochenmark, welche streng wachstumsfaktorabhängig (IL-3) ist. Ein Hauptmerkmal, welches 32D-Zellen von Ba/F3-Zellen unterscheidet ist ihr Ursprung. So sind 32D Zellen myeloide Vorläufer, wohingegen Ba/F3-Zellen lymphoiden Ursprungs sind. So eignen sich die 32D-Zellen ebenso wie die Ba/F3-Zellen als ideales Modellsystem zur Analyse des transformierenden Potentials eines Onkogens (Cleveland et al., 1989). Zur besseren Abtrennung und Unterscheidung gegenüber dem zuvor verwendeten pAL-Vektor-Systems erhalten die mit dem PIG-Vektor-infizierten Zellen jeweils den Anhang „_PIG“.

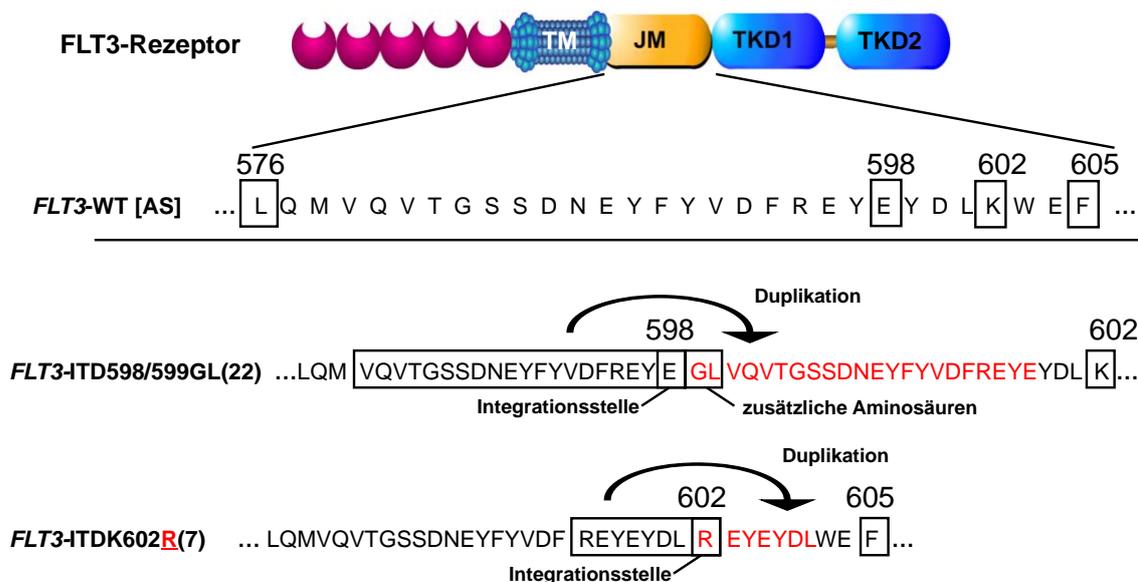


Abbildung 21: Darstellung der Lokalisation der in AML-Patienten identifizierten ITD-Mutationen in der JM-Domäne. Die schematische Abbildung des FLT3-Rezeptors zeigt die aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen bestehende extrazelluläre Domäne in rot, die transmembranäre Domäne (TM), die juxtamembranäre Domäne (JM) und die beiden Tyrosinkinase-Domänen (TKD1 und TKD2). Die Zeile darunter zeigt die FLT3-WT-Aminosäuresequenz von AS 576 bis 605. Darunter sind zwei JM-ITD dargestellt. Gezeigt sind jeweils die ursprüngliche AS-Sequenzen (eingerahmt), welche in der Duplikation auftreten (rote AS-Sequenz), sowie die Lokalisationsstelle durch Angabe der speziellen AS. Für den Fall einer Punktmutation durch Integration der ITD innerhalb eines DNA-Codons ist die AS der Lokalisationsstelle rot markiert. Zusätzlich ist in der Bezeichnung der *FLT3*-ITD die resultierende AS durch einen Unterstrich hervorgehoben. So kommt es bei der *FLT3*-ITD598/599GL(22) zu keiner Punktmutation an der Stelle 598, da die ITD nach dem Codon lokalisiert ist. Es tritt der Einschub von zwei zusätzlichen Aminosäuren (Glycin (G) und Leucin (L)) auf, welcher angezeigt ist mit GL nach der Integrationsstelle. Dahingegen liegt die zweite JM-ITD innerhalb des Codons für AS602, was zu Punktmutation führt. Ihre Bezeichnung lautet *FLT3*-ITDK602R(7).

4.3.1. *FLT3*-TKD1-ITDs sind aktivierende und transformierende Mutationen

Aktivierende Mutationen im FLT3-Rezeptor führen zu einer wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation (Kim et al., 2005; Scheijen et al., 2004; Minami et al., 2003). Um zu überprüfen, ob TKD1-ITDs, welche mittels PIG-Vektorsystem in Ba/F3- bzw. 32D-Zellen exprimiert werden, zu einer wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation führen, wurde nach Puromycin-Selektion zunächst die Expression des jeweiligen FLT3-Rezeptors (*FLT3*-ITD598/599(22), *FLT3*-ITDK602R(7), *FLT3*-ITD598/599(12), *FLT3*-ITDE611V(32), *FLT3*-ITDG613E(33), *FLT3*-ITDA620V(28) und *FLT3*-WT) anhand der Koexpression von GFP ermittelt (siehe Abb. 22A+B). Als Negativkontrolle wurden die parental Ba/F3- bzw. 32D-Zellen verwendet. Alle infizierten Zellpopulationen waren nach der Selektionsphase zu einem hohen Grad GFP-positiv (> 90%). Zur weiteren Charakterisierung wurde von den etablierten TKD1-

ITD-exprimierenden Ba/F3- bzw. 32D-Zellen der Anteil lebender Zellen nach Wachstumsfaktorentzug bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mehrmals gewaschen, um überschüssiges IL-3 zu entfernen. Die gewaschenen Zellen wurden in IL-3-freies Medium überführt und für 72 Stunden inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Anteil lebender Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass *FLT3*-WT_PIG infizierte Ba/F3-Zellen nach 72 Stunden weniger als 5 % lebende Zellen aufwies (siehe Abb. 22C). Dagegen wiesen alle ITD_PIG transduzierten Zellen (Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33)_PIG und Ba/F3 *FLT3*-ITDA620V(28)_PIG) einen hohen Anteil lebender Zellen auf (>95%). Das Ergebnis zum IL-3-Entzug konnte unter Verwendung von SB-Färbung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Zusammen zeigten die Experimente, dass alle untersuchten ITD-Mutationen des FLT3-Rezeptors eine Resistenz gegenüber Induktion von Apoptose durch Wachstumsfaktorentzug vermitteln. Der gleiche Versuchsaufbau wurde analog für die infizierten 32D-Zellen durchgeführt. Hierbei konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden (siehe Abb. 22D). So konnte zunächst ebenfalls für die Zellen nach Pyromycin-Selektion eine hohe GFP-Expression (> 90 %) gezeigt werden (siehe Abb. 22B). Wurde im Anschluss den Zellen IL3 entzogen, für 72 Stunden inkubiert und der Anteil lebender Zellen nach PI-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt so zeigte sich, dass der Anteil lebender Zellen für die WT-exprimierenden Zellen in Abwesenheit von IL-3 drastisch sinkt und nach 72 Stunden Inkubationszeit keine lebende WT-Zelle mehr nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 22D). Im Vergleich dazu konnte für die ITD-exprimierenden 32D-Zellen (JM-ITDs und TKD1-ITDs) nach 72 Stunden ein hoher Anteil an lebenden Zellen detektiert werden. Der Unterschied zu WT-exprimierenden Zellen war hierbei hoch signifikant ($p < 0,01$). Innerhalb der Gruppe der ITD-Mutationen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten unter Verwendung von SB als Apoptose-Marker erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden Zelllysate der Zellen (32D und Ba/F3), die mit den unterschiedlichen FLT3-Konstrukten infiziert worden waren, nach IL-3-Entzug erstellt. Nach SDS- PAGE und Westernblotting wurden Immundetektionen unter Verwendung der Phosphorylierungs-Antikörper Phospho-FLT3 (Y591) und Phospho-STAT5 (Y694/Y699) durchgeführt. Nach dem Strippen wurden FLT3- und STAT5-Antikörper zur Analyse der Proteinlevel eingesetzt und als Beladungskontrolle GAPDH verwendet (siehe Abb. 23).

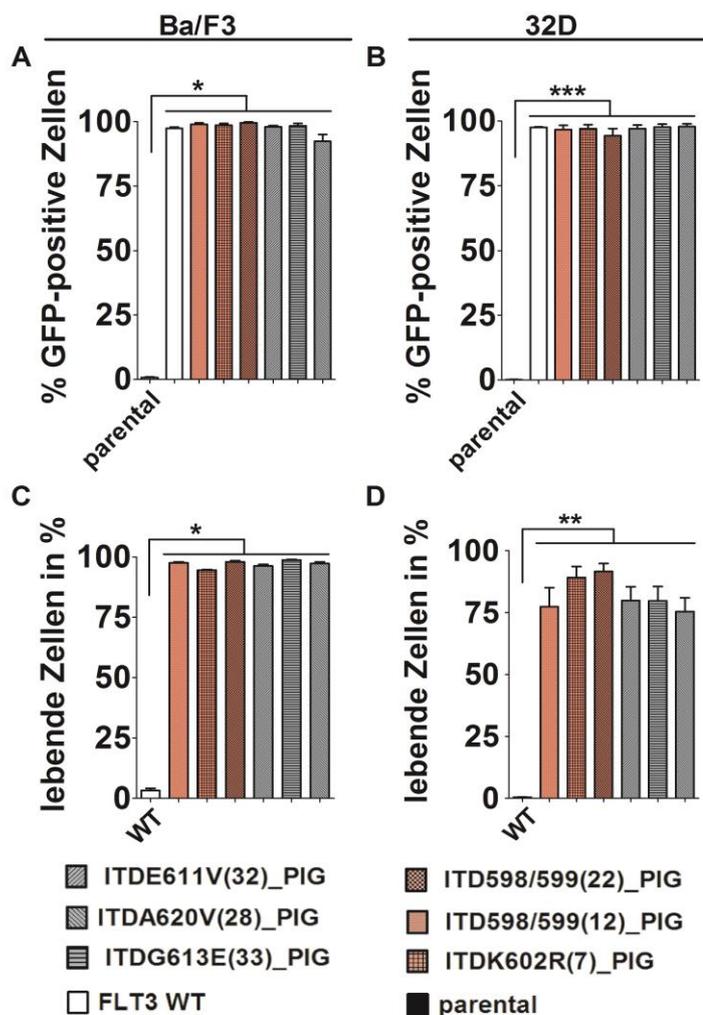


Abbildung 22: GFP-Expression vor IL-3-Entzug und Apoptoserate nach IL-3-Entzug der mit unterschiedlichen FLT3-Konstrukten transduzierten Ba/F3- und 32D-Zellen. A-B) Ergebnisse der GFP-Expression vor IL-3-Entzug und der Apoptoserate nach IL-3-Entzug in infizierten Ba/F3-Zellen. A) Gezeigt ist die gemessene GFP-Expression (% der GFP positiven Zellen) in den unterschiedlichen Ba/F3-Zelllinien. Als Kontrolle wurden die parentalen Ba/F3-Zellen verwendet. B) Gezeigt ist der Anteil an lebenden Zellen (lebende Zellen in %) gemessen 72 Stunden nach IL-3-Entzug mittels PI-Färbung, wobei alle Zellen mit einem DNA-Gehalt ($\geq 2n$) als lebend definiert wurden. Hier ist der Anteil lebender Zellen nach IL-3-Entzug von FLT3-WT im Vergleich zu den ITD-exprimierenden Zellen dargestellt. (p-Wert: *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,001$). C-D) Ergebnisse der GFP-Expression vor IL3-Entzug und der Apoptoserate nach IL-3-Entzug in infizierten 32D-Zellen. Der Versuchsablauf war analog zu den in (A+B) gezeigten Experimenten. (p-Wert: **= $p < 0,01$).

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass wie erwartet, der wildtypische FLT3-Rezeptor in Ba/F3-Zellen in An- und Abwesenheit von IL-3 keine Aktivierung der FLT3-Kinase durch Phosphorylierung der Stelle Y591 bewirkt (siehe Abb. 23A). Da die FLT3- und die IL-3-Signalkaskade Ähnlichkeiten aufweisen, war in Anwesenheit von IL-3 der STAT5-Signalweg aktiviert, während in Abwesenheit des Wachstumsfaktors keine Aktivierung von STAT5 detektiert werden konnte. Dagegen zeigte die Expression von FLT3-JM-ITDs oder TKD1-ITDs in Ba/F3-Zellen eine konstitutive Autophosphorylierung der FLT3-Kinase an der

Stelle Y591 nach IL-3-Entzug. Darüber hinaus wurde eine Aktivierung des STAT5-Signalweges durch Detektion einer Phosphorylierung der Stellen Y694 und Y699 nach Wachstumsfaktorentzug beobachtet. Diese Ergebnisse konnten auch in Experimenten mit den erstellten 32D-Zellen (32D *FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, 32D *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG, 32D *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG, 32D *FLT3*-ITDE611V(32)_PIG, 32D *FLT3*-ITDG613E(33)_PIG, 32D *FLT3*-ITDA620V(28)_PIG und 32D *FLT3*-WT_PIG) erzielt werden (siehe Abb. 23B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in hämatopoetischen Zelllinien mit lymphoidem als auch mit myeloidem Ursprung (Ba/F3 und 32D) nach der Infektion mit den in dieser Arbeit erstellten *FLT3*-ITD-Konstrukten (*FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG, *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG, *FLT3*-ITDE611V(32)_PIG, *FLT3*-ITDG613E(33)_PIG, *FLT3*-ITDA620V(28)_PIG und *FLT3*-WT_PIG) der jeweilige *FLT3*-Rezeptor stabil exprimiert wird. Die Expression der einzelnen Mutanten, sowohl JM-ITD-Mutationen als auch TKD1-ITD-Mutationen des *FLT3*-Rezeptors, führte nach IL-3-Entzug zu einer Resistenz gegenüber Apoptose-Induktion. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Mutationsvarianten der JM und der TKD1 zu einer konstitutiven Autophosphorylierung des *FLT3*-Rezeptors und zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie STAT5 führen. Diese Daten bestätigten im Ba/F3- und im 32D-Modell, die zuvor mit dem pAL-Expressionsvektorsystem produzierten Ergebnisse.

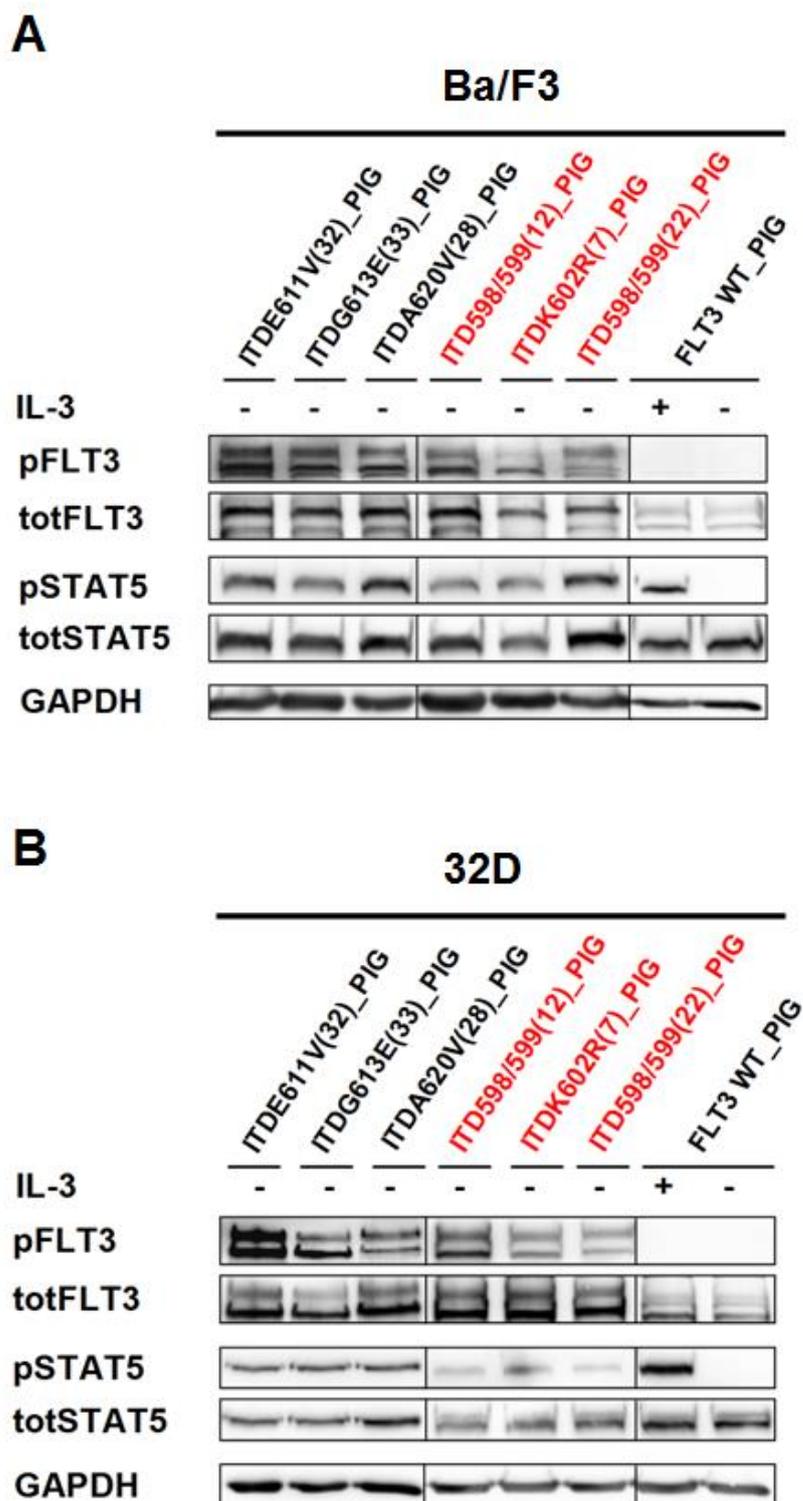


Abbildung 23: TKD1-ITD- und JM-ITD-Mutationen zeigen nach IL-3-Enzug eine konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors und eine Aktivierung von STAT5. A) Gezeigt ist das Ergebnis der Immundetektion nach SDS-PAGE von Lysaten infizierter Ba/F3-Zellen (*FLT3*-JM-ITD, *FLT3*-TKD1-ITDs und *FLT3*-WT) mit phosphospezifischen Antikörpern für den FLT3-Rezeptor (pFLT3) sowie STAT5 (pSTAT5). Die Membran wurde im Anschluss gestriipt und mit totalen FLT3- und STAT5-Antikörpern inkubiert (totFLT3 und totSTAT5). Als Beladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. B) Dargestellt ist das Immunblot-Ergebnis analog zu A) mit Lysaten infizierter 32D Zellen (*FLT3*-JM-ITD, *FLT3*-TKD1-ITDs und *FLT3*-WT).

4.3.2. *FLT3*-TKD1-ITDs vermitteln eine differentielle Apoptose-Induktion nach Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung

Die Versuche zur Überexpression von pAL-*FLT3*-Konstrukten im Ba/F3-Modellsystem zeigten, dass eine Lokalisation der *FLT3*-ITDs innerhalb des Beta 1-Faltblatts der Kinase eine Resistenz gegenüber *FLT3*-TKI-Behandlung vermittelt (siehe Abschnitt 4.2.1.). Um zu überprüfen, ob die Expression von Beta 1-Faltblatt-ITDs des *FLT3*-Rezeptors mittels eines zweiten Vektorsystems in den beiden hämatopoetischen Zelllinien Ba/F3 und 32D ebenfalls einen resistenten Phänotyp unter TKI-Behandlungen ausbildet, wurden zunächst die unterschiedlichen *FLT3*-ITD-exprimierenden Zelllinien Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)_PIG und Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33)_PIG mit verschiedenen TKIs (Midostaurin und Quizartinib) für 24 Stunden behandelt. Anschliessend wurde der Anteil an apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In diesen Experimenten wurden die JM-ITDs (*FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG und *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG) gegenüber den Beta 1-Faltblatt-Mutationen (ITDE611V(32)_PIG und ITDG613E(33)_PIG) verglichen. Für die Experimente wurden je 30.000 Zellen/ml ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Midostaurin (PKC412) und Quizartinib (AC220) behandelt. Nach 24 Stunden wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie nach PI-Färbung bestimmt (siehe Abb. 24). Dabei wurden alle Zellen mit einem DNA-Gehalt ($< 2n$) als apoptotisch definiert. Zunächst wurden unterschiedliche Konzentrationen (10 nM, 50 nM, 100 nM) von Midostaurin (PKC412) verwendet. Anschließend wurde Quizartinib (AC220) mit verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (10 nM, 50 nM, 100 nM). Die jeweiligen Messungen nach 24 Stunden zeigten, dass die Beta 1-Faltblatt-ITD-Zellen unter TKI-Behandlung einen geringeren Anteil an apoptotischen Zellen gegenüber den *FLT3*-JM-ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen über alle verwendeten Konzentrationen der beiden verwendeten TKIs aufwiesen (siehe Abb. 24B+D). Der Unterschied zwischen den Beta 1-Faltblatt-ITDs (Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)_PIG und Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33)_PIG) zu den JM-ITD-Mutanten (Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, Ba/F3 *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG und Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG) im Anteil apoptotischer Zellen war dabei signifikant (*= $p < 0,05$). Bei der DMSO-Kontrolle konnte bei keinem Ansatz ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Vergleichbare Resultate konnten unter Verwendung von SB als Apoptose-Marker erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

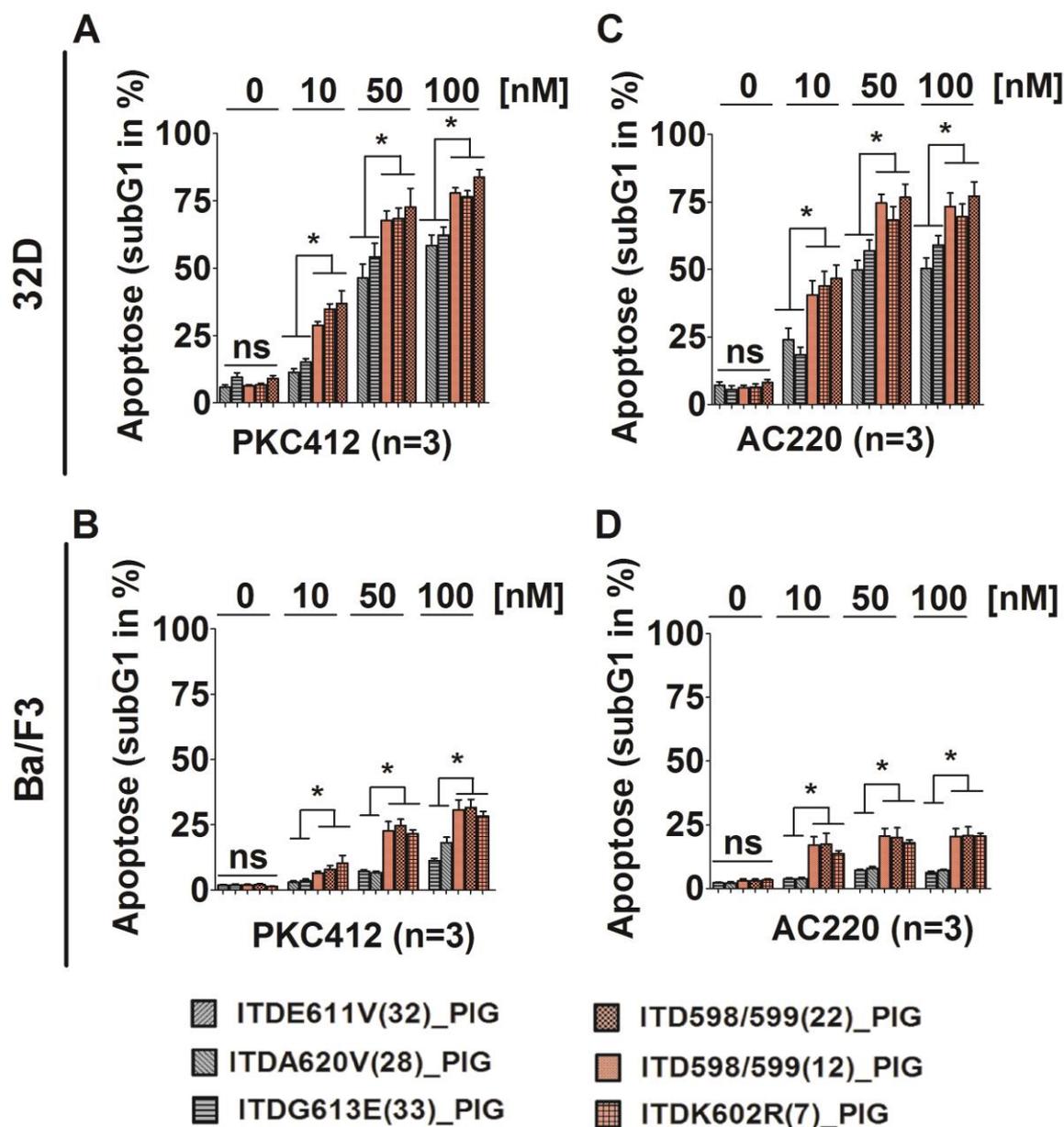


Abbildung 24: Expression von ITDs im Beta 1-Faltblatt des FLT3-Rezeptors in Ba/F3- und 32D-Zellen zeigen eine verzögerte Apoptose-Induktion nach TKI-Behandlung. A-D) Darstellung der PI-Färbung nach 24-stündiger Behandlung mit den angegebenen Konzentration des jeweiligen TKI. Alle Zellen mit einem DNA-Gehalt ($<2n$) wurden hier als apoptotische Zellen definiert. Der Anteil an apoptotischen Zellen (Apoptose (subG1 in %)) ist für JM-ITD-exprimierende Zellen (rote Balken) im Vergleich zu den Beta 1-Faltblatt-ITDs, *FLT3*-ITDE611V(32) und *FLT3*-ITDE611V(32) (graue Balken), gezeigt. Drei unabhängige Experimente wurden jeweils mit Triplikaten durchgeführt. (p-Wert: * = $p < 0,05$).

Ähnliche Ergebnisse konnten bei den analogen Experimenten mit den unterschiedlichen *FLT3*-ITD-exprimierenden 32D-Zellen beobachtet werden. Die jeweiligen Messungen unter Verwendung von PI nach 24 Stunden zeigten, dass die 32D *FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, 32D *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG und 32D *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG Zellen unter TKI-Behandlung mit PKC412 und AC220 einen höheren Anteil an apoptotischen Zellen

gegenüber den Beta 1-Faltblatt-ITD-Zellen bei allen verwendeten Konzentrationen aufwiesen (siehe Abb. 24A+C). Der Unterschied zwischen den ITD-Mutanten im Beta 1-Faltblatt und der JM-Domäne war dabei signifikant bei allen verwendeten Konzentrationen von PKC412 und AC220. Die Färbung mit SB als Apoptose-Marker konnte die Beobachtung bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression von *FLT3*-ITD-Mutationen im Beta 1-Faltblatt in zwei unterschiedlichen hämatopoetischen Zellkulturmodellen (32D und Ba/F3) eine veränderte Apoptose-Induktion gegenüber TKI-Behandlung im Vergleich zu JM-ITD-Mutationen vermittelt.

4.3.3. FLT3-TKIs inhibieren die Tyrosin-Phosphorylierung von FLT3 und STAT5 in Beta 1-Faltblatt-ITDs und JM-ITDs

Die beobachtete Resistenz könnte durch veränderte Inhibition der Tyrosinkinase des FLT3-Rezeptors herrühren. Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit AC220 oder PKC412 zu einer veränderten Inhibition der unterschiedlichen konstitutiv aktivierten ITD-Mutationen (Beta 1-Faltblatt- und JM-ITDs) führen, wurden Ba/F3-Zellen ausplattiert und mit 50 nM AC220 für vier Stunden behandelt und umgehend lysiert. Nach SDS-PAGE wurde eine Immundetektion mit phosphospezifischen Antikörpern gegen den FLT3-Rezeptor (Y591) und gegen das nachgeschaltete Signalmolekül STAT5 (Y694/699) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Membran mit Antikörpern der unphosphorylierten Proteine und einer Beladungskontrolle (FLT3, STAT5 und GAPDH) inkubiert (siehe Abb. 25A). Die Analyse der unterschiedlichen *FLT3*-ITD-Mutationen nach AC220-Behandlung zeigte, dass der TKI die Autophosphorylierung des Rezeptors mit einer JM-ITD als auch die Rezeptoren mit den Beta 1-Faltblatt-ITDs an der essentiellen Stelle Y591 der FLT3-Kinase inhibiert. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung unter Verwendung spezifischer Phospho-Antikörper für STAT5 (Y694/699), dass die Inhibition der Autophosphorylierung zu einer starken Reduktion der Phosphorylierung von STAT5 führte. Gleichzeitig konnten keine Veränderungen der totalen Proteinlevel von FLT3 und STAT5 nachgewiesen werden. Die Experimente wurden analog in unterschiedlichen *FLT3*-ITD-exprimierenden 32D-Zelllinien durchgeführt (siehe Abb. 25B). So wurden für die Zellen 32D *FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, 32D *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG, 32D *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG, 32D *FLT3*-ITDE611V(32)_PIG und 32D *FLT3*-ITDG613E(33)_PIG nach vierstündiger Behandlung mit 50 nM AC220 Gesamtzelllysate erstellt. Nach SDS-PAGE erfolgte eine Immundetektion mit phospho-

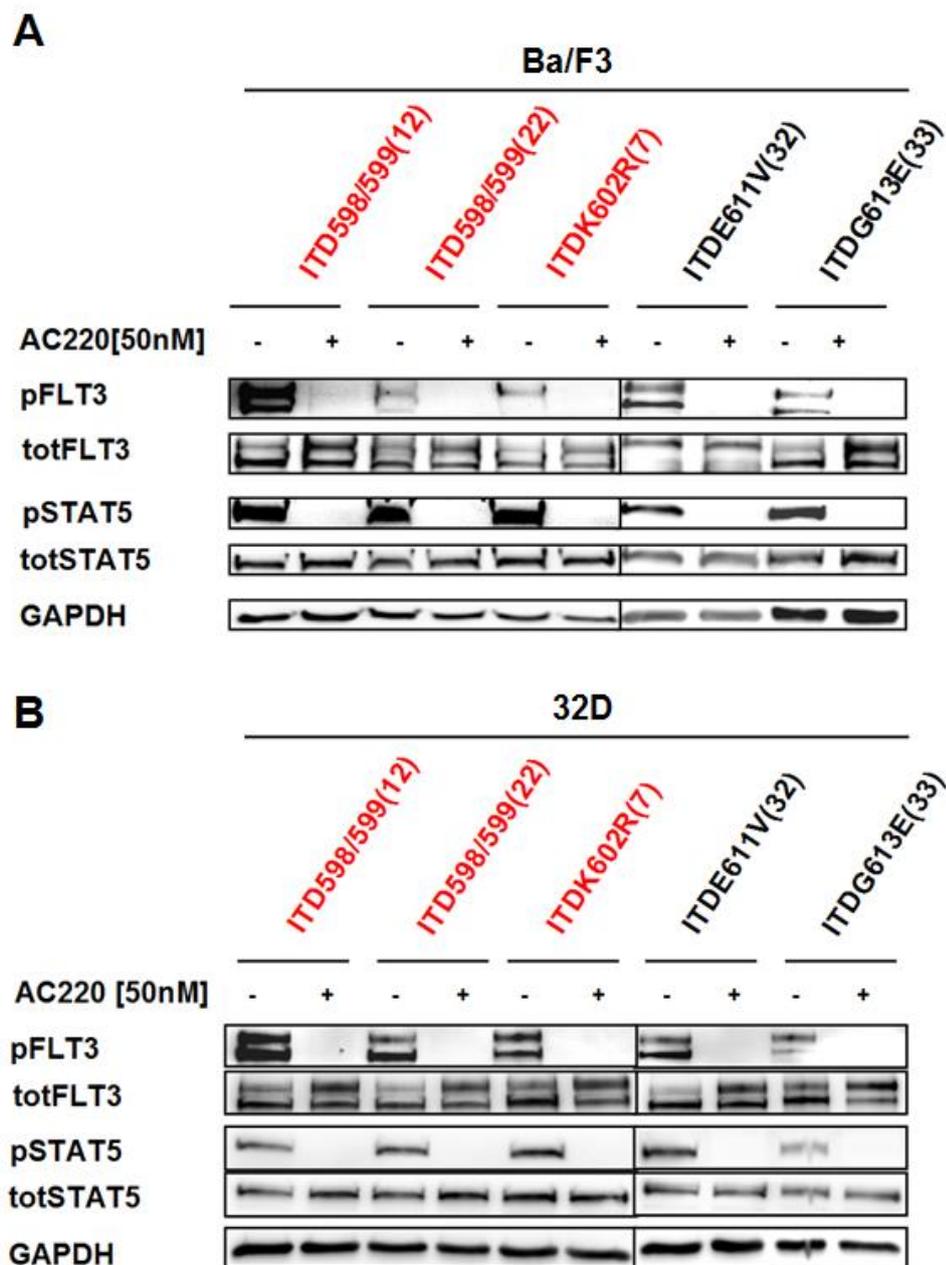


Abbildung 25: Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung von unterschiedlichen ITD-Varianten durch AC220. A) Die mit unterschiedlichen Beta 1-Faltblatt-ITDs (*FLT3*-ITDE611V(32)_{PIG} und *FLT3*-ITDG613E(33)_{PIG}; schwarze Schrift) bzw. der JM-ITDs (*FLT3*-ITD598/599(22)_{PIG}, *FLT3*-ITDK602R(7)_{PIG}, *FLT3*-ITD598/599(12)_{PIG}) (rote Schrift) transduzierten Ba/F3 Zellen wurden für vier Stunden mit 50 nM AC220 behandelt. Im Anschluss folgten Immunblot-Analysen mit Phospho-Antikörpern gegen Tyr591 des FLT3-Rezeptors (pFLT3) und Tyr694/699 des STAT5-Proteins (pSTAT5). Um eine mögliche Veränderung des Phosphosignals durch Proteindegradation auszuschließen wurden die entsprechenden totalen Antikörper (FLT3, STAT5 und GAPDH) als Beladungskontrolle verwendet. B) Gezeigt ist das Ergebnis des Experiments in 32D-Zellen analog zu A.

spezifischen Antikörpern gegen den FLT3-Rezeptor (Y591) und gegen den nachgeschalteten Signalweg STAT5 (Y694/699). Es konnte bei allen Mutanten nach der TKI-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein Phosphosignal des FLT3-Rezeptors an der Stelle

Y591 mehr detektiert werden. Auch das Phosphosignal an den Stellen Y694 und Y699 von STAT5 wurde nicht mehr beobachtet. Dies bestätigt die zuvor in Ba/F3-Zellen erzielten Resultate.

Zusammenfassend lässt sich durch diese Experimente feststellen, dass die unterschiedlich konstitutiv aktivierten FLT3-Rezeptoren (Beta 1-Faltblatt-ITDs und JM-ITDs) in Ba/F3- als auch in 32D-Zellen durch AC220 ohne signifikanten Unterschied inhibiert wurden. Dies lässt vermuten, dass die differentielle Verzögerung der Beta 1-Faltblatt-ITDs durch TKIs über einen phosphorylierungsunabhängigen Mechanismus verläuft.

5. Diskussion

Identifikation, Klonierung und Expression von *FLT3*-TKD1-ITDs

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, unterschiedliche ITDs aus unterschiedlichen Domänen der TKD1 des *FLT3*-Rezeptors aus AML Patienten funktionell zu charakterisieren. Hierfür wurde zunächst an *FLT3*-ITD-positiv diagnostizierten Patientenproben eine Sequenzanalyse durchgeführt. Hierbei konnten folgende ITDs aus zwei unterschiedlichen funktionellen Domänen der TKD1 des *FLT3*-Rezeptors identifiziert werden: 1) Die Beta 1-Faltblatt-ITDs *FLT3*-ITDE611V(32) und *FLT3*-ITDG613E(33) und 2) die ITD in der Nukleotidbindeschleife *FLT3*-ITDA620V(28) (siehe Abb. 7). Parallel standen die folgenden ITD-Mutationen in der JM-Domäne des *FLT3*-Rezeptors zur Verfügung, welche zuvor in AML-Patientenproben detektiert und beschrieben worden waren (Weisberg et al., 2002; Fenski et al., 2000; Mizuki et al., 2000): *FLT3*-ITD598/599(22), *FLT3*-ITDK602R(7) und *FLT3*-ITD598/599(12) (siehe Abb 7 und Abb. 21). Bei den JM-ITDs handelte sich in allen drei Fällen um Mutationen im C-terminale Zippermotiv (JM-Z) des *FLT3*-Rezeptors entsprechend der strukturellen Einteilung nach Griffith et al. (2004). *FLT3*-ITD-Mutationen sind per se Längenmutationen, die auf Duplikationen der *FLT3*-Gensequenz beruhen und zu einer direkten Wiederholung innerhalb der kodierenden Sequenz, einem sogenannten „inframe Tandemrepeat“, führen (Gililand und Griffin, 2002). Die bisher beschriebene Länge variierte dabei von drei bis zu mehr als hundert Nukleotiden (Yokota et al., 1997). Daneben konnten auch Einschübe von Nukleotiden beschrieben werden, die nicht in der ursprünglichen *FLT3*-Sequenz vorhanden waren (Yokota et al., 1997). Kayser et al. (2009) zeigten zusätzlich, dass die Länge der ITD stark mit der Lokalisation korreliert, d.h. je weiter die ITD am C-terminalen Ende des *FLT3*-Rezeptors lokalisiert ist, desto länger ist die Mutation. Die in dieser Arbeit beschriebenen ITD-Mutationen in der TKD1- und der JM-Domäne zeigten eine Länge von 21 bis 99 Nukleotiden bzw. 7 bis 33AS. Die durchschnittliche Länge betrug 67 Nukleotide oder 22,3AS. Dieser Wert wurde als Grenze für die Bezeichnung „kurze ITD“ für Mutationen unter diesem Wert bzw. „lange ITD“ für Mutationen oberhalb davon verwendet. So befanden sich die kurzen ITD-Varianten *FLT3*-ITDK602R(7), *FLT3*-ITD598/599(12) und *FLT3*-ITD598/599(22) näher am N-terminalen Ende und zugleich alle in der JM-Domäne. Dagegen lagen die langen ITD-Mutationen *FLT3*-ITDE611V(32), *FLT3*-ITDG613E(33) und *FLT3*-ITDA620V(28) näher am C-terminalen Ende und waren gleichzeitig in der TKD1-Domäne lokalisiert. Daneben konnten in dieser Arbeit bei keiner Mutation in der TKD1-Domäne zusätzliche Einschübe detektiert

werden. Die identifizierten Längenmutationen im Beta 1-Faltblatt und in der Nukleotidbindeschleife der TKD1 des FLT3-Rezeptor wurden zunächst in den pAL-Expressionsvektor kloniert. Die JM-ITD *FLT3*-ITD598/599(12) war bereits vorhanden und charakterisiert (Fenski et al., 2000; Mizuki et al., 2000). Diese wurde daher als Kontrolle mitgeführt. Die durchgeführten Messungen der Oberflächenexpression und Westernblot-Analysen nach Transfektion in wachstumsfaktorabhängige hämatopoetische Ba/F3-Zelllinien zeigten, dass die in AML-Patienten identifizierten ITDs mit einer Lokalisation innerhalb der TKD1 des FLT3-Rezeptors (siehe Abb. 7) stabil exprimiert wurden (siehe Abb. 8). Zusätzlich wurden alle ITD-Varianten (*FLT3*-ITD598/599(22), *FLT3*-ITDK602R(7), *FLT3*-ITD598/599(12), *FLT3*-ITDE611V(32), *FLT3*-ITDG613E(33), *FLT3*-ITDA620V(28) und *FLT3*-WT) in den pMSCV-Puromycin-IRES-GFP (PIG) Vektor subkloniert und über einen retroviralen Ansatz in IL-3-abhängige hämatopoetische 32D- bzw. Ba/F3-Zelllinien transduziert. Westernblot-Untersuchungen und Analysen der Ko-Expression von GFP konnten eine stabile Expression des jeweiligen Konstrukts zeigen (siehe Abb. 21 und Abb. 22). Hierbei stehen die Konstrukte sowohl im pAL- als auch PIG-Vektor unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors und daher erfolgt eine konstante Überexpression des jeweiligen FLT3-Rezeptors. Da *FLT3*-ITD homozygote Mäuse (FLT3ITD/ITD) eine schwerere myeloproliferative Erkrankung als hemizygoten Mäuse (FLT3-/ITD) entwickeln, kann vermutet werden, dass ein Gendosisseffekt über die Schwere der myeloproliferativen Erkrankung entscheidet (Kharazi et al. 2011; Lee et al., 2005). Aufgrund dessen wurde die Expression der unterschiedlichen ITDs densitometrisch analysiert (siehe Abb. 8B). Es konnte aber kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

FLT3*-TKD1-ITDs transformieren hämatopoetischen Zellen *in vitro

Nach stabiler Expression der unterschiedlichen ITD-Mutationen in den Ba/F3- und 32D-Zelllinien sollte anschließend ihre aktivierende und transformierende Eigenschaft untersucht werden. Bei der malignen Transformation handelt es sich um einen Prozess, bei welchem das kontrollierte Wachstum normaler Zellen in eine unkontrollierte Vermehrung durch einen zellintrinsischen Mechanismus ausgehebelt wird. Dies geschieht unter anderem durch Mutationen im FLT3-Rezeptor. Zur physiologischen Aktivierung wird der Rezeptor durch seinen Liganden FL stimuliert, was zur Dimerisierung, Transphosphorylierung und Aktivierung von unterschiedlichen intrazellulären Signalwegen wie MAPK und AKT/PI3K führt (Meshinchi, Soheil und Appelbaum, 2009). Bei der Analyse des aktivierenden und transformierenden Potentials stellte sich aufgrund der Daten von Kayser et al. (2009) die

Frage nach signifikanten Unterschieden zwischen den TKD1-ITDs im Vergleich zu den JM-ITDs. Es wurde beschrieben, dass ITD-Mutationen, lokalisiert in der JM-Domäne des FLT3-Rezeptors, aufgrund konstitutiver Aktivierung der FLT3-Kinase zu einer wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation *in vitro* und einer myeloproliferativen Erkrankung *in vivo* führen (Kelly et al., 2002; Mizuki et al., 2000). Um das transformierende Potential der TKD1-ITD zu untersuchen, wurde zunächst ein Versuch mit Methylcellulose („Colony Count Assay“) durchgeführt. Dieser eignet sich ausgezeichnet zur Untersuchung der transformierenden Eigenschaften eines Proteins, da das Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen durch vorherigen Wachstumsfaktor nicht stimuliert wird. Daher wachsen nur transformierte Zellen und bilden Kolonien (Miller und Lai, 2005). Wurden nun die Ba/F3-Zellen, welche die verschiedenen TKD1-ITDs (*FLT3-ITDE611V*(32), *FLT3-ITDG613E*(33) und *FLT3-ITDA620V*(28)) exprimieren, zunächst nach IL-3-Entzug in Methylcellulose für zehn Tage inkubiert, so zeigte sich, dass die Expression von *FLT3*-ITDs mit Lokalisationen innerhalb der JM-Domäne, aber auch in der TKD1-Domäne, zu einer Bildung von Kolonien durch wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation und klonalem Wachstum führte (siehe Abb. 9). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Expression der TKD1-ITDs eine höhere Kolonienzahl im Vergleich zu den JM-ITDs bedingen, doch der beobachtete Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,09$). Parallel wurde der Effekt des IL-3-Entzugs durchflusszytometrisch über 72 Stunden hinweg mittels Propidium-Iodid (PI)- als auch mit SYTOX® Blue „Dead Cell Stain“ (SB)-Färbung analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl 32D- als auch Ba/F3-Zellen durch Transfektion bzw. Infektion mit unterschiedlichen *FLT3*-ITD-Varianten mit Lokalisationen in der JM- als auch in der TKD1-Domäne resistent gegenüber Apoptose-Induktion durch Wachstumsfaktorentzug waren (siehe Abb. 10 und Abb. 22C-D). Wesentliche Unterschiede zwischen den ITD-Mutationen ergaben sich nicht.

Die Daten aus den Versuchen mit Methylcellulose und der Apoptose-Induktion nach IL-3-Entzug zeigten zusammenfassend, dass die Expression von *FLT3*-ITDs unabhängig von der Lokalisation im Allgemeinen eine Transformation von hämatopoetischen Zellen induziert.

***FLT3*-TKD1-ITDs sind aktivierende Mutationen**

Frühe Entdeckungen von *FLT3*-ITDs bei Patienten mit myelodysplastischen Syndrom (MDS), die innerhalb weniger Wochen zu einer offenkundigen AML umschlugen, ließen den Schluss zu, dass *FLT3*-ITD-Mutationen an der leukämischen Transformation beteiligt sind (Horiike et al., 1997). Um diesen Phänomen näher auf den Grund zu gehen, klonierte Kiyoi et al (1998) zunächst verschiedene aus Patienten isolierte JM-ITD-Mutationen. Die

anschließende Expression der ITD-Mutationen in Zelllinien führte zu einer Ligandenunabhängigen Dimerisierung der FLT3-Rezeptoren und einer Phosphorylierung der Tyrosinreste in Abwesenheit des Liganden (Kiyoi et al., 1998). Dabei waren verschiedene AS-Stellen unter anderem Y589, Y591 und Y599 phosphoryliert (Heiss et al., 2006; Rocnik et al., 2006). Im Gegensatz zum WT, initiierte die konstitutive Phosphorylierung des mutierten FLT3-Rezeptors in murinen hämatopoetischen Zellen und in primären Patientenproben eine Aktivierung des STAT5-Signalwegs (Choudhary et al., 2007; Birkenkamp et al., 2001, Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000). Durch die molekulare Analyse von 284 FLT3-ITD-positiven Patienten stellte sich heraus, dass knapp 80 % der ITDs den speziellen AS-Rest R595 in der duplizierten Region enthalten (Vempati et al., 2007). Durch Deletion oder Substitution dieser spezifischen Stelle 595 in ITD-Mutanten konnte das STAT5 Signal substantiell gesenkt werden und führte zur drastischen Verringerung des transformierenden Potentials der Zellen (Vempati et al., 2007). Darüber hinaus spielen die beiden Tyrosinreste 589 und 591 des FLT3-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von STAT5. Nach Substitutionen dieser beiden Reste durch Phenylalanin war die FLT3-ITD-Kinase zwar weiterhin funktionsfähig, aber es kam zu einer Aufhebung der STAT5-Aktivierung (Rocnik et al., 2006). Durch die spezifische Blockade des STAT5-Signalwegs kam es zu einer drastischen Inhibition der Koloniebildung von FLT3-ITD-Zellen. Dies bewies, dass STAT5 ein essentieller Signalweg in der onkogenen Signaltransduktion von FLT3 ist (Mizuki et al., 2000).

Die Betrachtung der AS-Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten ITD-Varianten (JM-ITD und TKD1-ITD) zeigte, dass in allen Mutationen sowohl die beiden Tyrosinreste 589 und 591 als auch der spezifische AS-Rest R595 in jedem der duplizierten Bereiche vorhanden war (siehe Abb. 7 und Abb. 21). Dies ließ die Vermutung zu, dass die unterschiedlichen FLT3-Rezeptoren der TKD1-Domäne (*FLT3-ITDE611V*(32), *FLT3-ITDG613E*(33) und *FLT3-ITDA620V*(28)) als auch der JM-Domäne (*FLT3-ITD598/599*(22), *FLT3-ITDK602R*(7) und *FLT3-ITD598/599*(12)) eine Autophosphorylierung der Kinase bedingen. Aufgrund der beobachteten transformierenden Eigenschaft der ITDs nach IL-3-Entzug müsste daher eine Aktivierung von STAT5 nachweisbar sein. Mit Westernblot-Analysen konnte eine ligandenunabhängige Autophosphorylierung der FLT3-Kinase an der spezifischen Stelle Y591 und darüber hinaus eine Aktivierung von STAT5 durch eine Detektion der Phosphorylierung an Stelle Y694 und Y699 beobachtet werden (siehe Abb. 9 und Abb. 23). Für JM-ITDs wurde beschrieben, dass Pim-1 durch konstitutiv aktiviertes STAT5 hoch reguliert wird, wodurch eine Phosphorylierung am Serinrest 112 des proapoptischen

Proteins Bad stattfindet, was mit einer Inaktivierung von Bad assoziiert ist (Kim et al., 2006; Kim et al., 2005). Darüber hinaus kooperierte Pim-1 seinerseits in *in vitro*-Untersuchungen mit dem *Myc* Protoonkogen, welches wiederum Proliferation induzierte (Wernig et al., 2008). Daher liegt es nahe zu vermuten, dass es aufgrund der konstitutiven Phosphorylierung von STAT5 durch die *FLT3*-TKD1-ITDs (siehe Abb. 11A und Abb. 20) zu einer Inhibition von Bad bei gleichzeitiger Aktivierung von Pim-1 und *Myc* kommt, was in einer gesteigerten Zellteilung resultiert.

In früheren Analysen an *FLT3*-JM-ITD-exprimierender Zellen konnte von Masson et al. (2009) neben der aberranten Phosphorylierung des *FLT3*-Rezeptors und der Phosphorylierung von STAT5 eine Bindung von GRB2 und GAB2 an den aktivierten *FLT3*-Rezeptor nachgewiesen werden. Über diesen Komplex schien auch eine Aktivierung der MAP-Kinase und PI3K/AKT-Signaltransduktionskaskade stattzufinden. Arnaud et. al. (2004) konnten zeigen, dass die Bindung von ERK1/2 an GAB2 an dem Serin-Rest 623 zusätzlich über die Phosphatase SHP2 reguliert wird. So fand eine verminderte Bindung von ERK1/2 durch die Einbringung von Alanin als Substitutionsmutante des Serin-Restes 623 statt. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von GAB1 an den phosphorylierten *FLT3*-Rezeptor durch PI3K die Signaltransduktion über AKT initiiert wurde (Zhang et al., 2000). Durch andere Gruppen konnte beobachtet werden, dass durch die Expression einer *FLT3*-ITD mit Lokalisation innerhalb der JM-Domäne des *FLT3*-Rezeptors in hämatopoetischen Zellen eine Aktivierung von ERK1/2 und zusätzlich von AKT stattfindet (Brandts et al., 2005; Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000).

Durch Immunblotanalyse der MAP- und PI3K/AKT-Kinase-Signaltransduktionskaskade an Gesamtlisaten der ITD-exprimierenden Zellen konnte eine Aktivierung der spezifischen Phosphorylierungsstellen von ERK1/2 (T202/Y204) und AKT (S473) festgestellt werden (siehe Abb. 11). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl ERK1/2 als auch AKT in beiden *FLT3*-Mutationstypen (TKD1-ITDs und JM-ITD) aktiviert wurde. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass JM-ITD-Mutationen über den AKT-Signalweg zusammen mit STAT5 die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL regulieren (Brandts et al., 2005; Socolovsky et al., 1999; Lisovsky et al., 1997). In Versuchen mit unterschiedlichen ITD-mutierten Zellen konnte nach IL-3-Entzug eine Expression von Bcl-xL im Vergleich zum *FLT3*-WT in Westernblot-Analysen detektiert werden (siehe Abb. 11B). Es gibt weitere Hinweise, dass die onkogene *FLT3*-ITD-Signaltransduktion auch über AKT und ERK1/2 Einfluss auf die Phosphorylierung von Bad nimmt. So konnten She et al. (2005) unterschiedliche AS-Reste von Bad identifizieren, welche von unterschiedlichen

Signalmolekülen phosphoryliert werden. Der Serinrest an der Stelle 112 war dabei von der ERK1/2-Aktivität und die AS-Stelle S136 hingegen von der AKT-Aktivität abhängig. Yang et al. (2005) fanden heraus, dass es aufgrund der Aktivierung der „ribosomal S6 kinase 1“ (RSK1) durch ERK1/2 in *FLT3*-ITD-mutierten Zellen zu einer Phosphorylierung des Serinrests 112 von Bad kommt. Die Verwendung spezifischer Inhibitoren, die gegen *FLT3* und ERK1/2 gerichtet waren, führten zu einer Inaktivierung von RSK1 und einer Aktivierung von Bad (Yang et al., 2005). Bei diesem Prozess wurden die beide Serinreste von Bad dephosphoryliert, wodurch Bad aktiviert und aus dem Komplex mit dem Protein 14-3-3 freigesetzt wurde, was schließlich Apoptose induziert (She et al., 2005; Yang et al., 2005). Scheijen et al. (2004) konnten zeigen, dass AKT durch die Aktivierung der ITD das „Forkhead family“ Protein Foxo3a phosphoryliert, wodurch die Translokation in den Nukleus verhindert wird. Dies führt zu einer Suppression der Foxo3a-Zielgene, wie z.B. des zellzyklusinhibierenden Proteins p27Kip1 und des pro-apoptotischen Proteins Bim (Takahashi et al., 2011). Dies hat zusammen letztlich eine erhöhte Proliferation der Zellen zur Konsequenz.

Daneben konnte in der vorliegenden Arbeit neben Bcl-xL die Expression von Mcl-1 in *FLT3*-JM-ITD- als auch TKD1-ITD-exprimierenden Zellen detektiert werden (siehe Abb. 17). Dieses Protein gehört ebenfalls zur Bcl-2-Familie und spielt eine entscheidende Rolle fürs Überleben der Zelle (Yang-Yen et al., 2006). Die Suppression von Mcl-1 in humanen pluripotenten Stammzellen erzeugte einen fast vollständigen Verlust ihrer Selbsterneuerungseigenschaft (Campbell et al., 2010). Zudem spielt die Modulation von Mcl-1 eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Resistenzen bei verschiedenen Krebsarten, wie z.B. Leukämie, Brustkrebs oder Karzinomen (Oh et al., 2012; Yang et al., 2012; Breitenbuecher et al., 2009). Aufgrund der Daten kann man von folgendem Szenario ausgehen: Die konstitutive Aktivierung des *FLT3*-Rezeptor durch ITD-Mutationen innerhalb verschiedener funktioneller Domänen (JM- bzw. TKD1-Domäne) führt zur Bindung der Adapterproteine GAB1, GAB2 und GRB2, worauf eine Initiation der drei Signaltransduktionswege STAT5, ERK1/2 und AKT folgt. Diese Aktivierung der Signalkaskaden induziert eine Regulation verschiedener anti-apoptotischer sowie zugleich pro-apoptotischen Proteine, wodurch es zu einer Resistenz gegenüber Apoptose-Induktion nach IL-3-Entzug kommt.

Bis dato wird zwar von einer Auflösung der autoinhibitorischen Funktion durch die Integration der ITD in die JM-Domäne ausgegangen (Griffith et al., 2004; Kiyoi et al., 2002), doch bleibt der genaue Mechanismus über den direkten Einfluss der ITDs, insbesondere der

TKD1-ITDs, auf die Struktur des FLT3-Rezeptors rein spekulativ. So zeigten Kristallstrukturanalysen, dass die drei topologischen Strukturen der JM-Domäne, das N-terminale JM-Bindemotiv (JM-B) (AS572-578), das Schaltermotiv (JM-S) (AS579-592) und das C-terminale Zippermotiv (JM-Z) (AS593-603) (siehe Abb. 3B) nahezu den kompletten Bereich des wasserlöslichen Anteils der intrazellulären FLT3-Kinase binden (Griffith et al., 2004). Die Vermutung liegt nahe, dass die Integration einer ITD in der JM-Domäne diese Bindung aufhebt, dadurch die Rotation des „N-lobe“ (TKD1) zum „C-lobe“ (TKD2) zur Bildung einer aktivierten Kinasestruktur ermöglicht und es dadurch zur Dimerisierung von zwei FLT3-Rezeptormolekülen kommt. Dafür sprechen könnte die Beobachtung von Kiyoi et al. (2002), dass die Expression eines verkürzten *FLT3*-ITD-Rezeptors, bei dem die TKD-Domänen durch einen Anhang der Myc-Sequenz ersetzt wurden, zusammen mit *FLT3*-WT-Rezeptor zu einer stringenten Bildung von Heterodimeren führt, was letztlich eine Phosphorylierung des Rezeptorkomplexes bewirkt. Dies suggeriert, dass die Kinaseaktivierung auf einem intermolekularen Mechanismus basiert. Die kleinste bisher beobachtete ITD ist nur eine einzige AS lang und besteht aus einer Duplikation an Stelle R595 (Vempati et al., 2007). Diese führt ebenfalls zu einer Dimerisierung und konstitutiven Aktivierung des FLT3-Rezeptors. Durch den Einschub einer einzigen AS werden vermutlich Verbindungen zwischen AS-Resten der JM-Domäne und den TKD-Domänen getrennt, wodurch die Drehung der TKD1 und TKD2 möglich wird. Es kommt zur aktiven Kinase-Konformation, Dimerisierung und schließlich zur konstitutiven Autophosphorylierung der FLT3-Rezeptoren. So könnte man hingegen vermuten, dass durch die Integration einer ITD in die TKD1-Domäne die JM-Domäne von der TKD1 und TKD2 räumlich entfernt wird und dadurch eine Rotation zulässt, was zur FLT3-Dimerisierung führt. Der resultierende Effekt wäre für die JM-ITD oder TKD1-ITD der gleiche, denn die Rotation der TKD1 und TKD2 läuft ungestört ab und es kommt zu einer ungehinderten Dimerisierung und Phosphorylierung der FLT3-Rezeptoren.

Zusammenfassend kann soweit festgehalten werden, dass im Gegensatz zum *FLT3*-WT alle ITD-transformierten Zellen durch eine konstitutive Autophosphorylierung von FLT3 und einer Aktivierung von STAT5, ERK1/2 und AKT gekennzeichnet sind. Diese Daten zeigen, dass es sich auch bei *FLT3*-ITDs mit Lokalisation in der TKD1 um aktivierende und transformierende Mutationen handelt. Somit sind die ITDs unabhängig von ihrer Lage im FLT3-Rezeptor „gain-of-function“-Mutationen. Aufgrund der Ergebnisse, der bisher durchgeführten Versuche, muss davon ausgegangen werden, dass in Bezug auf die Aktivierung des FLT3-Rezeptors und auf das transformierende Potential die Expression von

FLT3-TKD1-ITD im Vergleich zu *FLT3*-JM-ITD in hämatopoetischen Zellen zu keinem biologisch unterschiedlichen Phänotyp *in vitro* führt.

Die Expression von Beta 1-Faltblatt-ITDs ist mit einer Resistenz gegenüber TKI-Behandlung assoziiert

Das häufige Auftreten mutierter Tyrosinkinase in verschiedenen onkologischen Erkrankungen macht diese Zielstrukturen für therapeutische Ansätze interessant. Neben monoklonalen Antikörpern wurden auch sogenannte „small molecules“ zur Inhibition der konstitutiv aktivierten Kinase entwickelt (Müller-Tidow et al., 2007).

Mit der Entdeckung des neuen ITD-Mutationsclusters außerhalb der JM-Domäne des *FLT3*-Rezeptors und insbesondere der assoziierten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika der ITD-Subgruppe mit Lokalisation im Beta 1-Faltblatts der TKD1-Domäne (Breitenbuecher et al., 2009; Kayser et al., 2009) kamen viele Fragen auf. Zunächst rückte die Hypothese in den Vordergrund, dass die Lokalisation einer ITD-Mutation innerhalb des Beta1-Faltblatts mit einem veränderten biologischen Phänotyp einhergeht. Die bisher vorgestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass in Bezug auf die Aktivierung des *FLT3*-Rezeptors und nachgeschalteter Signalwege sowie auf das transformierende Potential von Zellen kein signifikanter biologischer Unterschied gefunden werden konnte. Die daraus resultierende Frage war, ob die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) einen unterschiedlichen Phänotyp aufzeigen könnte.

Bei der Entwicklung von TKIs gegen *FLT3* konnte auf die bestehende Erfahrung mit dem Prototyp der TKIs Imatinib Mesylate (STI571) zurückgegriffen werden. Dieses Medikament war sehr erfolgreich Mitte der 90er Jahre bei CML-Patienten eingesetzt worden und vieles konnte aus den Erkenntnissen auf die Behandlung von AML mit TKIs übertragen werden (Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996). Bei der CML tritt in über 90 % eine chromosomale Aberration auf, die Translokation t(9;22)(q34;q11) mit dem charakteristischen Philadelphia-Chromosom (22q-), wobei das Fusionsprotein BCR-ABL mit konstitutiver Tyrosinkinase-Aktivität entsteht. Imatinib Mesylate bindet sehr spezifisch an die ATP-Bindetasche des Fusionsproteins und führt zu einer Inhibition der konstitutiven Aktivität der Kinase ABL (Buchdunger et al., 2000). Die Aktivität *in vivo* war sehr vielversprechend, denn über 75 % der Patienten in der chronischen Phase erreichten unter Imatinib eine komplette hämatologische und zytogenetische Remission (O'Brien et al., 2003). Bei der AML stellen *FLT3*-Mutationen eine der häufigsten Aberrationen mit aktivierender und transformierender Eigenschaft dar (Falini et al., 2007; Mizuki et al., 2000). Daher wurde diskutiert, ob die

FLT3-Kinase eine mögliche angreifbare Struktur in der Therapie der AML sein könnte (Tse et al., 2001; Fenski et al., 2000). Smith et al. (2012) konnten in einer *in vitro*-Mutagenese Resistenzmutationen an AS-Resten in der TKD-Domäne im FLT3-Rezeptor identifizieren. Acht Patienten, welchen der TKI AC220 als Monotherapie verabreicht worden war, entwickelten eine Resistenz gegenüber der TKI-Behandlung. Durch Sequenzierung konnte für alle acht Patientenproben genau die im *in vitro*-Ansatz zuvor identifizierten Mutationen festgestellt werden (Smith et al., 2012). Diese Mutationen waren vor der Behandlung nicht präsent. Eine anschließende Hochdurchsatzsequenzierung der Patientenproben konnte diese Befunde bestätigen und gleichzeitig zeigen, dass an genau diesen AS-Resten in normalen Kontrollproben mit extrem geringer Häufigkeit eine Basensubstitution stattfindet (Smith et al., 2012). Da die Daten eine zentrale Abhängigkeit des leukämischen Klons von der *FLT3*-ITD-Signaltransduktion zeigten, konnten sie damit *FLT3*-ITDs als therapeutisches Ziel in der AML verifizieren (Smith et al., 2012).

Die ersten Versuche mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wie Herbinmycin A oder AG1296 zeigten an Zelllinien, primären Patientenproben oder im Mausmodell eine wesentliche Inhibition der konstitutiven Autophosphorylierung des mutierten FLT3-Rezeptors, eine drastische Senkung der Proliferation *in vivo* und eine erhöhte Latenzzeit bis zum Ausbruch der Erkrankung im Mausmodell (Levis et al., 2001; Naoe et al., 2001; Tse et al., 2001; Zhao et al., 2000). Spezifischere TKIs wie z.B. PKC412 zeigten eine hohe Wirksamkeit gegen die konstitutive FLT3-Rezeptoren *in vitro* und *in vivo* (Stone et al., 2005; Armstrong et al., 2003; Grundler et al., 2003; Fabbro et al., 2000; Fabbro et al., 1999). Um die Effektivität von PKC412 gegenüber den in dieser Arbeit identifizierten Beta 1-Faltblatt-ITDs zu testen, wurden die Zellen mit Konzentrationen von 10 nM bis 100 nM PKC412 inkubiert, welche den von Weisberg et al. (2002) beschriebenen relevanten Konzentrationen für *in vitro* Inhibition der FLT3-Kinase entsprechen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung von FLT3 und der nachgeschalteten Signalwege STAT5 und ERK1/2 mit Westernblot-Analysen überprüft (siehe Abb. 15 und Abb. 25). Die Daten zeigten, dass PKC412 schon bei geringen Konzentrationen von 10 nM eine Inhibition der FLT3-Kinase als auch der nachgeschalteten Signalwege STAT5 und ERK1/2 bewirkt. Dies deckt sich mit der von Knapper et al. (2006) durchgeführten Studie zur Inhibition von FLT3 unter Verwendung von PKC412 an 65 diagnostizierten AML-Patientenproben. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass diese Substanz eine hohe Bioaktivität aufweist, d.h. bei einer Konzentration von ca. 10 nM PKC412 konnte die Autophosphorylierung von FLT3 sowie die Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege STAT5 und ERK1/2 bei Patientenproben mit

mutierten FLT3-Rezeptoren komplett unterbunden werden (Knapper et al., 2006). Sie beschrieben darüber hinaus, dass eine Inhibition der FLT3-Kinase auf 15 % der Ausgangsphosphorylierung nötig ist, um einen zytotoxischen Effekt in den Zellen auszulösen (Knapper et al., 2006). Durch Immunpräzipitationen der in dieser Arbeit verwendeten *FLT3*-ITD-Rezeptoren konnte ebenfalls eine drastische Inhibition der Kinaseaktivität nach einstündiger PKC412-Behandlung detektiert werden (siehe Abb. 19). Eine Ausnahme in dieser Analyse stellte die *FLT3*-ITDE611V(32) dar, bei der trotz kompletter Inhibition der FLT3-Kinase-Aktivität weiterhin eine Phosphorylierung von ERK1/2 an den spezifischen Resten T202 und Y204 zu detektieren war (siehe Abb. 17). Dies ließ vermuten, dass diese spezielle Mutation einen resistenten Phänotyp gegenüber PKC412-Behandlung ausbildet. Denn bereits Breitenbuecher et al. (2009) konnten eine konstitutive Aktivierung von ERK1/2 *in vitro* in einer spezifische Mutante in der TKD1 an der Stelle 627 beobachten, welche in einem Patienten für eine primäre Resistenz gegenüber TKIs verantwortlich war. Um der Beobachtung der konstitutiven ERK1/2-Aktivierung für die *FLT3*-ITDE611V(32) genauer auf den Grund zu gehen, wurden die Zellen, welche unterschiedliche ITD-Mutationen mit Lokalisation im Beta 1-Faltblatts exprimieren, mit unterschiedlichen Konzentrationen PKC412 inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Anteil an apoptotischen Zellen gemessen (siehe Abb. 14A). Interessanterweise, konnte sowohl für die *FLT3*-ITDE611V(32) als auch für die die *FLT3*-ITDG613E(33) ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur JM-ITD-Mutation gegenüber 10 nM PKC412-Behandlung festgestellt werden. Für die Konzentrationen 50 nM und 100 nM konnte sogar ein sehr signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) detektiert werden. Da die *FLT3*-ITDE611V(32) eine differentielle ERK1/2-Aktivierung trotz inhibierter FLT3-Kinase zeigte, wurde zunächst diesem Phänomen nachgegangen. Hierfür wurde mit dem spezifischen MEK1-Inhibitor U0126 als erstes die ERK1/2-Signaltransduktionskaskade geblockt (siehe Abb. 18A). Die Inhibition dieses Signalwegs und gleichzeitiger Behandlung mit PKC412 führte zwar zu einer Steigerung der Apoptose, aber nicht zu einer Aufhebung des resistenten Verhaltens (siehe Abb. 18B). Diese Ergebnisse bewiesen, dass ERK1/2 eine Rolle in der Resistenzvermittlung spielt, aber als Hauptfaktor für den resistenten Phänotyp ausscheidet. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungsergebnissen von Breitenbuecher et al. (2009), der ebenfalls eine differentielle ERK1/2-Phosphorylierung in der TKD1-ITD an der Stelle 627 beobachtete. Auch diese Daten suggerieren, dass ERK1/2 eine untergeordnete Rolle in der Resistenzvermittlung spielt. Dagegen fand die Gruppe heraus, dass die primäre Resistenz mit einer aberranten Mcl-1-Aktivierung einhergeht (Breitenbuecher et al., 2009). Die Analyse der Mcl-1-

Aktivierung in *FLT3*-ITDE611V(32) als auch in *FLT3*-ITDG613E(33) im Vergleich zur JM-ITD598/599(12) zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 20). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Resistenz der ITD-Mutationen mit Lokalisation im Beta 1-Faltblatts der TKD1-Domäne des *FLT3*-Rezeptors durch einen anderen Mechanismus vermittelt wird. Die PKC412-Behandlung von den zusätzlich generierten 32D und Ba/F3 Zelllinien, die jeweils die *FLT3*-ITDE611V(32) bzw. für die *FLT3*-ITDG613E(33) im PIG-Vektor-System exprimierten, konnte das resistente Verhalten bestätigen (siehe Abb. 24A+B). Die Daten führen daher zusammenfassend zu dem Schluss, dass Beta 1-Faltblatt-ITDs einen resistenten Phänotyp gegenüber PKC412-Behandlung ausprägen. Die Ergebnisse implizieren, dass hier ein phosphorylierungsunabhängiger Mechanismus die Resistenz vermittelt, da die *FLT3*-Kinasen für Beta 1-Faltblatt-ITDs als auch JM-ITDs gleichermaßen von dem TKI PKC412 inhibiert sind.

Neben PKC412 konnte auch für den Raf1-Inhibitor Sorafenib (BAY-439006) in früheren Untersuchungen ein Antitumoreffekt in *FLT3*-mutierten leukämischen Zellen gezeigt werden (Auclair et al., 2007). Diese Studie zeigte eine Verringerung der Zellproliferation und eine Inhibition der Phosphorylierung in *FLT3*-mutierten MV4;11- und EOL-1-Zellen. Parallel konnte für Sorafenib in einem Mausmodell, bei welchem MV4;11-Zellen subkutan in Mäuse appliziert wurden, gezeigt werden, dass bei Gabe von 3 mg/kg bzw. 10 mg/kg Sorafenib täglich über einen Zeitraum von 14 Tage sechs bzw. neun Tiere von jeweils 10 Tieren eine komplette Tumorregression erfuhren. Diese Ergebnisse konnten mit einer randomisierten Phase1-Studie mit 16 AML-Patienten untermauert werden (Zhang et al., 2008). Hierbei zeigte die Verabreichung von 200 bis 400 mg Sorafenib an fünf Tagen in der Woche, dass der Prozentsatz der leukämischen Blasten mit einer *FLT3*-Mutation im peripheren Blut im Median von 81 % auf 8 % sowie im Knochenmark von 76 % auf 34 % gesenkt werden konnte, wobei gleichzeitig eine Inhibition der *FLT3*-Kinase auftrat. Die in dieser Arbeit erstellten *FLT3*-ITDE611V(32)- und *FLT3*-ITDG613E(33)-Ba/F3-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib (10 nM bis 100 nM) für 24 Stunden behandelt und der Anteil apoptotischer Zellen mittels PI-Färbung bestimmt (siehe Abb. 14B). Die Ergebnisse zeigten, dass nach dieser Inkubationszeit die Ba/F3 JM-ITD598/599(12)-Zellen signifikant stärker in Apoptose gehen als jene von *FLT3*-ITDE611V(32) und *FLT3*-ITDG613E(33) ($p < 0,05$). So zeigten diese beiden Beta 1-Faltblatt-Mutationen eine errechnete IC(50) weit über 100 nM gegenüber Sorafenib. Interessanterweise konnte für alle ITD-Mutationen (Beta 1-Faltblatt-ITD und JM-ITD) eine gleichmäßige Inhibition der *FLT3*-Kinase und der nachgeschalteten Signaltransduktionswege STAT5 und ERK1/2 bei bereits

geringen Konzentrationen von 10 nM Sorafenib beobachtet werden (siehe Abb. 15A). Diesen Effekt konnte auch bereits von Zhang et al. (2008) in Ba/F3 JM-ITD598/599(12)-Zellen beobachtet werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression der beiden Beta 1-Faltblatt-Mutationen in Ba/F3-Zellen ebenfalls zu einem resistenten Phänotyp gegenüber Sorafenib führen. Die Westernblot-Analysen lassen darüber hinaus vermuten, dass es sich auch unter Sorafenib-Behandlung um einen phosphorylierungsunabhängigen Mechanismus handelt, da die Kinase und die nachgeschalteten Signalwege eine gleichmäßige Inhibition der Phosphorylierung aufweisen.

Zarrinkar et al. (2009) durchsuchten in einem computergestützten Ansatz Datenbanken zu chemischen Komponenten auf potentielle Kinaseinhibitoren. Hierbei konnten mehrere Substanzen unter anderem AC220 (Quizartinib) identifiziert werden, welche in der Theorie eine hohe Affinität gegenüber der FLT3-Kinase haben sollten (Chao et al., 2009; Zarrinkar et al., 2009). Untersuchungen von Zarrinkar et al. (2009) zeigten, dass tatsächlich ein starker inhibitorischer Effekt bei bereits 3 nM AC220 einsetzte. Ähnliche Versuche in MV4;11-Zellen führten zu dem Ergebnis, dass die Proliferation dieser Zellen bei Konzentrationen < 10 nM komplett gehemmt werden konnte. In Mausmodellen und in einer Phase I-Studie mit 76 refraktären Patienten konnte ein antileukämischer Effekt von AC220 erzielt werden (Cortes et al., 2009). Aufgrund dieser vielversprechenden Daten des TKIs der zweiten Generation stellte sich die Frage, ob der Einsatz von AC220 dem bisher beobachteten resistenten Phänotyp der Beta 1-Faltblatt-ITDs überlegen wäre. Die Behandlung von Ba/F3-Zellen, die mit dem pAL_*FLT3*-ITDE611V(32) bzw. pAL_*FLT3*-ITDG613E(33) transfiziert worden waren, zeigten eindeutig, dass unter Verwendung von AC220 in diesen Zellen im Vergleich zu Ba/F3 *FLT3*-ITD598/599(12)-Zellen verzögert Apoptose induziert wurde (siehe Abb. 14C). Interessanterweise war AC220 aber in diesem verwendeten Zellsystem nicht so potent wie in der Literatur beschrieben. Hier konnte eine IC(50) in der Kontroll JM-ITD598/599(12) bei ca. 20 nM AC220 festgestellt werden. In publizierten Daten von Zarrinkar et al. (2009) lag die IC(50) unter 10 nM. Der Unterschied kann aufgrund des verwendeten Zellsystems auftreten, da Zarrinkar et al. (2009) humane Zelllinien für ihre Untersuchungen einsetzten, während in der vorliegenden Arbeit murine Zellen verwendet wurden. Daher wurden in FLT3-mutierten Ba/F3-Zellen (*FLT3*-ITDE611V(32), *FLT3*-ITDG613E(33), *FLT3*-ITD598/599(12)) die Dephosphorylierung von FLT3 unter Verwendung verschiedener Konzentrationen AC220 (0 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM und 50 nM) genauer mittels Westernblot-Analysen untersucht (siehe Abb. 16). Diese Untersuchung

konnte zeigen, dass es erst ab einer Konzentration von über 10 nM AC220 zu einer kompletten Inhibition der FLT3-Aktivität kommt. Dies ließ vermuten, dass der beobachtete Unterschied in der Sensitivität gegenüber AC220 tatsächlich eine Eigenschaft des verwendeten Zellkulturmodells war. Die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien kann unter anderem von der Anzahl der Transporterproteine und Porenproteinen abhängen, die die jeweilige Zelllinie exprimiert (Giordano et al., 2012). Bei der hier verwendeten Ba/F3-Zelllinie handelt es sich um immortalisierte murine IL-3-abhängige lymphoide pro-B-Zellen. Diese Zellen stellen für die Analyse von Onkogenen ein geeignetes Modellsystem dar, da diese Zellen ihre IL-3-Abhängigkeit durch die Expression transformierender Gene verlieren (Hayakawa et al., 2000). Da *FLT3*-ITD-Mutationen aber vorwiegend in myeloiden Linien auftreten, wurde zusätzlich die murine myeloblasten-ähnliche 32D-Zelllinie mit verschiedenen ITDs transduziert. Diese Zelllinie stammt von der myeloiden Reihe ab und muss ebenfalls mit IL-3 als Wachstumsfaktor kultiviert werden, da ansonsten in Abwesenheit von IL-3 Apoptose induziert wird (Lotem und Sachs, 1995). Daher stellt auch diese Zelllinie ein ideales System zur Analyse von Onkogenen dar und spiegelt eher die physiologische Situation wieder (Mizuki et al., 2000).

Um zusätzlich auszuschließen, dass der beobachtete Effekt der verminderten Sensitivität gegenüber AC220 in der verwendeten Vergleichs-Mutation JM-ITD598/599(12) begründet liegt, wurden zudem weitere JM-ITD-Mutationen (*FLT3*-ITD598/599(22) und *FLT3*-ITDK602R(7)) (siehe Abb. 21) für die folgenden Analysen einbezogen. So wurden die Beta 1-Faltblatt-ITDs *FLT3*-ITDE611V(32) und *FLT3*-ITDG613E(33) sowie die JM-ITD-Mutationen *FLT3*-ITD598/599(22), *FLT3*-ITDK602R(7) und *FLT3*-ITD598/599(12) in das PIG-Vektor-System kloniert und anschließend in 32D-Zellen transduziert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen AC220 (10 nM, 50 nM, 100 nM) für 24 Stunden behandelt und anschließend der Anteil an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abb. 24B). Parallel wurden Ba/F3-Zellen mit den gleichen ITD-Konstrukten transduziert und nach dem gleichen Versuchsaufbau, wie für die 32D-Zellen, mit verschiedenen Konzentrationen AC220 für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde im Durchflusszytometer der Anteil apoptotischer Zellen gemessen (siehe Abb. 24D). Die Ergebnisse zeigten übereinstimmend, dass die Sensitivität innerhalb der beiden verwendeten Zellsysteme (Ba/F3 und 32D) variierte, das resistente Verhalten der Beta 1-Faltblatt-ITDs im Vergleich zu den JM-ITDs aber erhalten blieb. Westernblot-Analysen demonstrierten zudem, dass die Autophosphorylierung der FLT3-Kinasen mit unterschiedlichen Mutationen (Beta 1-Faltblatt-ITDs und JM-ITDs) sowie der nachgeschaltete Signalweg STAT5 in beiden

Zelllinien ohne signifikante Unterschiede durch AC220 inhibiert wurde (siehe Abb. 25). Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass die Sensitivität vom verwendeten Zellsystem abhängig ist. Um diese Hypothese zu stärken müssten die beschriebenen Versuche in mit *FLT3*-ITD- transduzierten humanen Zellen zusätzlich überprüft werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression von Beta 1-Faltblatt-ITDs mittels zwei unterschiedlicher Vektoren (pAL und PIG) und zwei unterschiedlichen Zelllinien (32D und Ba/F3) durch Inhibition der Kinase-Aktivität im Vergleich zu den JM-ITDs zu einem anderen biologischen Phänotyp führt, welcher mit einer Resistenz gegenüber TKI-Behandlung (PKC412, Sorafenib bzw. AC220) assoziiert ist. Die jeweiligen Behandlungen mit PKC412, Sorafenib und AC220 der ITD-exprimierenden 32D- bzw. Ba/F3-Zellen führten hierbei zu einer Inhibition der *FLT3*-Kinasen und einer Blockade der nachgeschalteten Signalwege ohne einen erkennbaren signifikanten Unterschied. Diese Daten lassen daher auf einen phosphorylierungsunabhängigen Mechanismus schließen, doch bleibt der Resistenzmechanismus selbst unbekannt.

Resistenzmechanismus der ITDs mit Lokalisation innerhalb des Beta 1-Faltblatts

Schon während den ersten klinischen Versuchsstadien mit „small molecules“ konnten in experimentellen Ansätzen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber TKIs *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden (Kindler et al., 2010). Auch deuteten kurz darauf Ergebnisse der klinischen Studien auf Behandlungsmisserfolge hin, da z.B. nicht alle Patienten auf die jeweilige Behandlung ansprachen, was auf die Existenz von primären Resistenzen schließen ließ (Kindler et al., 2010). Dabei handelt es sich um einen bereits bestehenden Mechanismus in einer leukämischen Zelle, welcher meist erst durch die Behandlung mit Chemotherapeutika oder TKIs in den Vordergrund tritt und zum Überleben des leukämischen Klons führt (Kindler et al., 2010). Die Versuche nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener TKIs (PKC, Sorafenib und AC220) mit den in dieser Arbeit generierten *FLT3*-ITD-exprimierenden Zellen (32D und Ba/F3) zeigten, dass Beta 1-Faltblatt-ITDs im Vergleich zu JM-ITDs eine geringere Sensitivität aufwiesen (siehe Abb. 14 und Abb. 24). Um die Frage zu beantworten, ob sich die in dieser Arbeit verwendeten Beta 1-Faltblatt-ITDs-exprimierenden Zellen durch den Generierungs- und Selektionprozess eine zusätzlich Mutation angeeignet haben, wurde zunächst die der *FLT3*-Rezeptor-Expression durch siRNA gezielt inhibiert. Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen innerhalb von 48 Stunden in Abwesenheit eines Wachstumsfaktors zu einem hohen Anteil (>80 %) in Apoptose gehen (siehe Abb. 12A). Westernblot-Analysen konnten eine effiziente Suppression der

FLT3-Expression bestätigen (siehe Abb. 12B). Damit konnten zusätzliche aktivierende Mutationen in anderen *FLT3*-ITD-unabhängige Signalwegen ausgeschlossen werden. Auch weiterführende Versuche, wobei die *FLT3*-Rezeptoren nach einstündiger Behandlung mit dem TKI immunpräzipitiert wurden, zeigten, dass alle Rezeptoren suffizient inhibiert waren (siehe Abb. 19). Auch die mit verschiedenen *FLT3*-ITDs (*FLT3*-ITD598/599(22)_PIG, *FLT3*-ITDK602R(7)_PIG, *FLT3*-ITD598/599(12)_PIG, *FLT3*-ITDE611V(32)_PIG und *FLT3*-ITDG613E(33)_PIG) transduzierten Ba/F3- und 32D-Zellen zeigten unter AC220-Behandlung im Immunblot eine gleichmäßige Inhibition der *FLT3*-Kinase sowie der Inaktivierung von STAT5 (siehe Abb. 20).

Sekundäre Resistenzen hingegen entstehen erst durch Selektionsdruck unter TKI-Behandlung. Bekannte Mechanismen sind z.B. Resistenzmutationen in der ATP-Bindetasche oder *FLT3*-Überexpression (Kindler et al., 2010; Mahon et al., 2000). Zunächst konnte durch erneute Sequenzierung der jeweiligen *FLT3*-Sequenz von Ba/F3 *FLT3*-ITDE611V(32)- und Ba/F3 *FLT3*-ITDG613E(33)-Zellen davon ausgegangen werden, dass keine zusätzliche Punktmutation im Rezeptor vorhanden ist (Daten nicht gezeigt).

Paralell konnte in Westernblot-Analysen von ITD-transduzierten Zellen (32D und Ba/F3) keine erhöhte Expression der *FLT3*-Rezeptoren detektiert werden (siehe Abb. 11 und 23). Eine zusätzliche densitometrische Analyse bestätigte darüber hinaus eine ähnliche Expressionsstärke der unterschiedlichen *FLT3*-Mutationen (siehe Abb. 8).

Somit kann soweit festgehalten werden, dass die Beta 1-Faltblatt-ITDs per se eine Resistenz *in vitro* vermitteln. Die präsentierten Daten lassen vermuten, dass diese ITD-Mutationen des *FLT3*-Rezeptors mit einer primären Resistenz *in vivo* assoziiert sind.

Breitenbuecher et al. (2009) beobachteten bei einem Patienten trotz PKC412-Behandlung eine Progression der Krankheit. Nach Analyse des Mutationsstatus konnte eine ITD-Mutation mit Lokalisation in der TKD1 an der spezifischen Stelle 627 identifiziert werden. Breitenbuecher et al. (2009) konnten den primären Resistenzmechanismus auf eine veränderte Mcl-1-Aktivität zurückführen. Die Analyse der Mcl-1-Aktivierung in *FLT3*-ITDE611V(32) als auch in *FLT3*-ITDG613E(33) im Vergleich zur JM-ITD598/599(12) zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 20). Daher konnte der beschriebene Mechanismus für die Beta 1-Faltblatt-Mutationen nicht bestätigt werden (siehe Abb. 20). Somit muss für diese Mutationen von einem anderen Resistenzmechanismus ausgegangen werden.

Die Regulation von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-xL wurden bereits von Bagrintseva et al. (2004) als möglicher Mechanismus bei der Resistenzvermittlung beschrieben. Doch die Expressionsanalyse mittels Westernblot zeigte auch hier keine Unterschiede zwischen den

Beta 1-Faltblatt-ITDs *FLT3*-ITDE611V(32) und *FLT3*-ITDG613E(33) nach Behandlung mit PKC412 im Vergleich zu Ba/F3 JM-ITD598/599(12)-Zellen (siehe Abb. 20).

Hunter et al. (2004) konnte an primären AML-Patientenproben zeigen, dass eine erhöhte Expression des Membran-Effluxpumpen P-glycoprotein (PGP) zu einer verringerten Apoptose nach TKI-Behandlung führt. Zusätzlich fanden Stölzel et al., (2010) heraus, dass in TKI resistenten MV4;11-Zellen die ABC-Transportergene dysreguliert vorliegen. Daher könnte man vermuten, dass zum Beispiel die Beta 1-Faltblatt-ITDs *FLT3*-ITDE611V(32) und *FLT3*-ITDG613E(33) die Expression von PGP oder der ABC-Transporter erhöhen und dadurch einen erhöhten Efflux der TKIs vermitteln, was zu einer verringerten Sensitivität der betreffenden Zellen führen würde. Dementsprechend müsste aber eine schwächere Inhibition der Autophosphorylierung der FLT3-Kinase detektierbar sein, was jedoch mittels Westernblotanalysen nicht bestätigt werden konnte (siehe Abb. 15-17 und Abb. 25).

Einflüsse von ITDs auf die Struktur und deren Zusammenhang hinsichtlich der Sensitivität gegenüber TKIs

Die Notwendigkeit der exakten Kenntnis der molekularen Zielstruktur für eine effiziente Inhibition der Kinaseaktivität wurde bereits für die onkogene Tyrosinkinase BCR-ABL beschrieben. Mutationen innerhalb der Kinasedomäne führen zur Resistenz von BCR-ABL gegenüber dem ABL-Kinaseinhibitor Imatinib Mesylate (Shah et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002). Ebenso spielt die Struktur des FLT3-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Resistenz. Cools et al. (2004) beschrieben in einem Mutagenese-Versuch, wobei künstlich durch Zufall Mutationen im *FLT3*-Gen erzeugt wurden, dass unter anderem eine Mutation der spezifischen AS627 von dem originalen Alaninrest zu einem Threoninrest zu einem resistenten Phänotyp führte. Interessanterweise konnte Breitenbuecher et al. (2009) eine ITD-Mutation mit Lokalisation genau innerhalb des Codons der AS627 feststellen. Beim Entstehungsprozess der Längenmutation integrierte die ITD innerhalb des Codons und führte so zu einer Punktmutation an dieser Stelle von dem ursprünglichen Alaninrest (A) zum Glutamatrest (E). Diese spezifische ITD-Mutation führte *in vitro* und *in vivo* zu einem Resistenzphänotyp. Die Reversion der Mutation (E zu A), wobei die Länge der ITD-Mutation unverändert blieb, führte zu einer Sensibilisierung der transformierten Zellen (Breitenbuecher et al., 2009). Jede einzelne in dieser Arbeit verwendeten Beta 1-Faltblatt-Mutation weist eine Punktmutation an der Lokalisationsstelle auf (siehe Abb. 7). So weist die *FLT3*-ITDE611V(32) eine Substitutionsmutation von der polaren AS Glutamat zu der unpolaren AS Valin auf. Die *FLT3*-ITDG613E(33) zeigt eine Substitutionsmutation von der polaren AS

Glycin zum gering polaren AS-Rest Glutamat. Zudem liegen alle Punktmutationen in räumlicher Nähe des kritischen „gate-keeper“-Rests F691 und des DFG-Motivs. Die beiden Substitutionen sind starke Veränderungen, die theoretisch zu einer starken strukturellen Veränderung des FLT3-Rezeptors führen und dadurch ein zusätzliches Epitop entstehen lassen könnten. Hierdurch binden eventuell bisher unbekannte Adapterproteine an den FLT3-Rezeptor und führen trotz Inhibition der Kinaseaktivität zu Signaltransduktion. Die Mutationen können aber auch Einfluss auf den AS-Rest F691 bzw. das DFG-Motiv nehmen und damit die Bindung des TKIs verändern. Smith et al. (2012) beschrieben in einer computergestützten Bindungsanalyse von AC220, dass die AS-Reste F830, D835 und Y842 das sogenannte DFG-Motiv in der TKD2 des FLT3-Rezeptors bilden. Dieses Motiv ist wichtig für die Aktivierung der FLT3-Kinase. Die Daten von Wodicka et al. (2010) suggerieren, dass AC220 vorzugsweise an das DFG-Motiv bindet. Hierbei bildet der Phenolring von AC220 eine Aromaten-Komplex-Bindung mit dem AS-Rest F830 des DFG-Motivs (Burley und Petsko, 1985). Treten nun Mutationen an den AS-Resten des DFG-Motivs (F830, D835 und Y842) bzw. an dem AS-Rest F691 auf, so wird die Bindung von AC220 verhindert und es kommt zu einer insuffizienten Inhibition der FLT3-Kinase (Smith et al., 2012). Ähnliche Beobachtungen wurden für Sorafenib in kristallographischen Untersuchungen gemacht (Wan et al., 2004). Aufgrund dieser Daten könnte man vermuten, dass die Intergration von ITDs in das Beta 1-Faltblatt die intramolekulare Struktur so stark verändert, dass dies sowohl die Eigenschaft des DFG-Motivs als auch die des AS-Restes F691 beeinflusst.

Dagegen weist nur die *FLT3*-ITDK602R aus der Gruppe der JM-ITD-Mutationen eine Substitutionsmutation auf. Hierbei findet ein AS-Austausch des polaren Argininrest zu dem polaren Lysinrest statt. Dieser Austausch könnte womöglich einen weitaus geringeren Effekt auf die Struktur selbst haben, da hierdurch die gesamte Polarität des FLT3-Proteins weitgehend unverändert bleibt. Genauere strukturelle Analysen sowie Untersuchungen mit reversen Punktmutationen der Lokalisationsstellen der einzelne Beta 1-Faltblatt-Mutationen werden nötig sein, um weitere Aussagen treffen zu können.

Mögliche Relevanz der Beta 1-Faltblatt-ITDs im AML-Patienten

Mit der Entdeckung unterschiedlicher ITD-Mutationen und der prognostischen Relevanz für AML-Patienten entstand eine große Debatte über deren Einfluss hinsichtlich der Länge, der Lokalisation innerhalb funktioneller Domänen oder aber des Verhältnisses der *FLT3*-ITD-Mutationen im Vergleich zu *FLT3*-WT, dem sogenannten „allelic ratio“, da dies enormen

Einfluss auf die klinische Behandlung von Patienten mit TKIs haben könnte (Pratz et al., 2010; Kayser et al., 2009; Gale et al., 2008; Stirewalt et al., 2006; Kiyoi et al., 2002; Thiede et al., 2002; Whitman et al., 2001; Rombouts et al., 2000). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Sensitivität gegenüber TKIs aufgrund der Lokalisation innerhalb einer funktionellen Domäne definiert wird. So ergeben die beiden Beta 1-Faltblatt-ITDs *FLT3-ITDE611V(32)* und *FLT3-ITDG613E(33)* eine geringere Sensitivität gegenüber TKI-Behandlung im Vergleich zu *JM-ITD598/599(12)* (siehe Abb. 14). Dagegen zeigen die Ergebnisse mit den drei getesteten *JM-ITD*-Mutationen, dass diese die gleiche Sensitivität zueinander gegenüber TKIs der ersten als auch der zweiten Generation aufweisen (siehe Abb. 24). Dies deutet darauf hin, dass die Länge der ITD keine Relevanz hinsichtlich der Behandlung mit TKIs hat. Gleichzeitig suggerieren die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten, dass das Verhältnis zwischen den mutierten zu gesunden Allelen keinen Einfluss auf die Sensitivität der ITD-exprimierenden Zellen gegenüber Inhibitor-Behandlung hat. Da die molekularen Pathomechanismen, die zur Entstehung einer AML beitragen, sehr kompliziert und heterogen sind, werden Untersuchungen *in vivo* unerlässlich sein, da die einzelnen Kompartimente im Organismus, wie die Stammzellnische, starken Einfluss auf die Behandlung einzelner Mutationen nehmen können (Alvares et al., 2011). Dementsprechend bleiben leider auch die in klinischen Studien getesteten TKIs hinter den Erwartungen zurück. Die Daten aus einer randomisierten Studie mit Chemotherapie gefolgt von 80 mg CEP701 konnten weder eine signifikante Verbesserung der Remissionsrate noch des Gesamtüberlebens belegen (Levis et al., 2011). Es werden daher die Daten der TKIs der zweiten Generation hoffnungsvoll erwartet.

6. Ausblick und zukünftige Untersuchungen

Die Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) sowie das „National Comprehensive Cancer Network“ (NCCN) schlägt für die Diagnose von AML-Patienten standardmäßig eine molekulare Analyse des FLT3-Status vor (O'Donnell et al., 2012; Döhner et al., 2010; Gökbuget et al., 2005). Die Ergebnisse aus den klinischen Studien, dass die Anwesenheit von *FLT3*-ITD-Mutationen einen signifikant negativen Effekt auf die Krankheitsprogression, das Rückfallrisiko und das Gesamtüberleben von AML-Patienten haben, ließen die Frage nach personalisierter Behandlungsoptionen aufkommen (Brunet et al., 2012; Fröhling et al., 2002, Kottaridis et al., 2002; Kottaridis et al., 2001; Shih et al., 2002; Thiede et al., 2002; Rombouts et al., 2000; Kiyoi et al., 1999). Dabei rückte insbesondere die Verwendung von zytotoxischen Substanzen wie TKIs oder Antikörper in den Fokus (Williams et al., 2012; Fischer et al., 2010). Dies wurde vor allem in Kombination mit Knochenmarkstransplantationen diskutiert (DeZern et al., 2011; Schlenk et al., 2008). Leider blieben die Ergebnisse der ersten klinischen Studien hinter den Erwartungen zurück. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Sato et al. (2011) analysierten das Blut-Plasma von PKC412 behandelten AML-Patienten und schlossen aus ihren Daten, dass vermutlich eine zu geringe Konzentration an TKI im Plasma vorhanden sein könnte, um onkogene FLT3-Signaltransduktion zu inhibieren. Auf der anderen Seite könnte die leukämische Stammzelle durch die Stammzellnische, also durch die umgebenden fibroblastischen Zellen des Knochenmarks, vor der zytotoxischen Wirkung des TKIs geschützt werden. Diese Hypothese wird durch aktuell publizierte Daten unterstützt (Parmar et al., 2011; Konopleva et al., 2002). Parmar et al. (2011) fanden heraus, dass FLT3-ITD-positive Vorläuferzellen insensitive gegenüber TKI-Behandlung waren. Zusätzlich zeigte eine künstlich erzeugte Stammzellnische einen protektiven Effekt für primäre AML-Patientenproben (Konopleva et al., 2002).

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression unterschiedlicher FLT3-ITDs mit Lokalisationen in unterschiedlichen funktionellen Domänen mit unterschiedlichem Verhalten gegenüber TKI-Behandlung assoziiert ist. Dies kann weitreichende Folgen im Hinblick auf eine individualisierte Tumorbehandlung (Chemotherapie/TKI-Behandlung / Stammzelltransplantation) haben. Es werden daher weitergehende Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nötig sein, um den genauen Einfluss der ITD-Lokalisation auf den biologischen Phänotyp definieren zu können. Hierfür sollten zunächst weitere ITD-Mutationen aus unterschiedlichen Bereichen des FLT3-Rezeptors (JM-Domäne und TKD1-Domäne) *in vitro* analysiert werden. Parallel sollten *in vivo*-Untersuchungen mittels eines

retroviralen Transplantationsmodells in Mäusen durchgeführt werden, um die Eigenschaften der unterschiedlichen ITD-Mutationen im Hinblick auf „Homing“, „Engraftment“ und Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung genauer zu ergründen. Integrativen Genexpressionsanalyse der mRNA aus transfizierten Zelllinien, transduzierten Progenitoren aus dem murinen Transplantationmodell und primären humanen Blasten aus *FLT3*-ITD-positiven AML-Patienten könnten mehr Aufschluss über einen unterschiedlichen Phänotyp der exprimierten ITDs liefern. Darüber hinaus sollten die verschiedenen ITD-Cluster in laufenden und zukünftigen klinischen Studien eingeschlossen und berücksichtigt werden.

Literaturverzeichnis

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

- 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11091200>
- Agnès, F., Shamooin, 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*(2), 283–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8056344>
- Alvares, C. L., Schenk, T., Hulkki, S., Min, T., Vijayaraghavan, G., Yeung, J., Gonzalez, D., et al. (2011). Tyrosine kinase inhibitor insensitivity of non-cycling CD34+ human acute myeloid leukaemia cells with FMS-like tyrosine kinase 3 mutations. *British journal of haematology*, *154*(4), 457–65. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08748.x
- André, C., Martin, E., Cornu, F., Hu, W. X., Wang, X. P., & Galibert, F. (1992). Genomic organization of the human c-kit gene: evolution of the receptor tyrosine kinase subclass III. *Oncogene*, *7*(4), 685–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373482>
- Appelbaum, F. R., Rowe, J. M., Radich, J., & Dick, J. E. (2001). Acute myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 62–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722979>
- Armstrong, S. A., Kung, A. L., Mabon, M. E., Silverman, L. B., Stam, R. W., Den Boer, M. L., Pieters, R., et al. (2003). Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer cell*, *3*(2), 173–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620411>
- Arnaud, M., Crouin, C., Deon, C., Loyaux, D., & Bertoglio, J. (2004). Phosphorylation of Grb2-associated binder 2 on serine 623 by ERK MAPK regulates its association with the phosphatase SHP-2 and decreases STAT5 activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *173*(6), 3962–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356145>
- Arora, D., Stopp, S., Böhmer, S.-A., Schons, J., Godfrey, R., Masson, K., Razumovskaya, E., et al. (2011). Protein-tyrosine phosphatase DEP-1 controls receptor tyrosine kinase FLT3 signaling. *The Journal of biological chemistry*, *286*(13), 10918–29. doi:10.1074/jbc.M110.205021
- 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 : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *21*(3), 439–45. doi:10.1038/sj.leu.2404508
- Bacher, U., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2010). Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Current opinion in oncology*, *22*(6), 646–55. doi:10.1097/CCO.0b013e32833ed806
- 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. doi:10.1182/blood-2003-05-1653
- Birg, F., Courcou, M., Rosnet, O., Bardin, F., Pébusque, M. J., Marchetto, S., Tabilio, A., et al. (1992). Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*, *80*(10), 2584–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384791>

- Birg, F., Rosnet, O., Carbuccia, N., & Birnbaum, D. (1994). The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 13(3-4), 223–7. doi:10.3109/10428199409056285
- Birkenkamp, K. U., Geugien, M., Lemmink, H. H., Kruijer, W., & Vellenga, E. (2001). Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 15(12), 1923–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753614>
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835), 355–65. doi:10.1038/35077225
- Boyer, S. W., Schroeder, A. V, Smith-Berdan, S., & Forsberg, E. C. (2011). All hematopoietic cells develop from hematopoietic stem cells through Flk2/Flt3-positive progenitor cells. *Cell stem cell*, 9(1), 64–73. doi:10.1016/j.stem.2011.04.021
- Brandts, C. H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwäble, J., Buerger, H., 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. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0422
- Brandts C., Kim A. & Serve H. (2010) Die Akute Myeloische Leukämie (AML) bei Erwachsenen. UCT Frankfurt 12022010 Retrieved from http://www.uct-frankfurt.de/sites/UCT/content/e880/e3511/e3514/AML_Broschuere_ger.pdf
- Brasel, K., Escobar, S., Anderberg, R., De Vries, P., Gruss, H. J., & Lyman, S. D. (1995). Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 9(7), 1212–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7630197>
- Breitenbuecher, F., Markova, B., Kasper, S., Carius, B., Stauder, T., Böhmer, F. D., Masson, K., et al. (2009). A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML. *Blood*, 113(17), 4063–73. doi:10.1182/blood-2007-11-126664
- Breitenbuecher, F., Schnittger, S., Grundler, R., Markova, B., Carius, B., Brecht, A., Duyster, J., et al. (2009). Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood*, 113(17), 4074–7. doi:10.1182/blood-2007-11-125476
- Broxmeyer, H. E., Lu, L., Cooper, S., Ruggieri, L., Li, Z. H., & Lyman, S. D. (1995). Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Experimental hematology*, 23(10), 1121–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544740>
- Brunet, S., Labopin, M., Esteve, J., Cornelissen, J., Socié, G., Iori, A. P., Verdonck, L. F., et al. (2012). Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(7), 735–41. doi:10.1200/JCO.2011.36.9868
- Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 295(1), 139–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10991971>
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer research*, 56(1), 100–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548747>
- Burley, S. K., & Petsko, G. A. (1985). Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science (New York, N.Y.)*, 229(4708), 23–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3892686>

- Campbell, C. J. V., Lee, J. B., Levadoux-Martin, M., Wynder, T., Xenocostas, A., Leber, B., & Bhatia, M. (2010). The human stem cell hierarchy is defined by a functional dependence on Mcl-1 for self-renewal capacity. *Blood*, *116*(9), 1433–42. doi:10.1182/blood-2009-12-258095
- Carow, C. E., Levenstein, M., Kaufmann, S. H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., et al. (1996). Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*, *87*(3), 1089-96.
- Casteran, N., Rottapel, R., Beslu, N., Lecocq, E., Birnbaum, D., & Dubreuil, P. (1994). Analysis of the mitogenic pathway of the FLT3 receptor and characterization in its C terminal region of a specific binding site for the PI3' kinase. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, *40*(3), 443–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7920189>
- 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-butyl-isoxazol-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. doi:10.1021/jm9007533
- Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Böhmer, F.-D., et al. (2007). Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood*, *110*(1), 370–4. doi:10.1182/blood-2006-05-024018
- Cleveland, J. L., Dean, M., Rosenberg, N., Wang, J. Y., & Rapp, U. R. (1989). Tyrosine kinase oncogenes abrogate interleukin-3 dependence of murine myeloid cells through signaling pathways involving c-myc: conditional regulation of c-myc transcription by temperature-sensitive v-abl. *Molecular and cellular biology*, *9*(12), 5685–95. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=363740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Fabbro, D., Clark, J. J., Griffin, J. D., Marynen, P., 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. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2148
- Cortes J, Perl A, Smith C, Kovacsovic T, Dombret H, Döhner H et al A phase II open-label, AC220 monotherapy efficacy (ACE) study in patients with acute myeloid leukemia (AML) with FLT3-ITD activating mutations: Interim results. *Haematologica* 2011; 96: 426.
- Dash, A., & Gilliland, D. G. (2001). Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best practice & research. Clinical haematology*, *14*(1), 49–64. doi:10.1053/beha.2000.0115
- DaSilva, N., Hu, Z. B., Ma, W., Rosnet, O., Birnbaum, D., & Drexler, H. G. (1994). Expression of the FLT3 gene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *8*(5), 885–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182945>
- Daver, N., & Cortes, J. (2012). Molecular targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, *17 Suppl 1*, S59–62. doi:10.1179/102453312X13336169155619
- Deininger, M. W., Goldman, J. M., Lydon, N., & Melo, J. V. (1997). The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*, *90*(9), 3691–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9345054>
- deLapeyrière, O., Naquet, P., Planche, J., Marchetto, S., Rottapel, R., Gambarelli, D., Rosnet, O., et al. (1995). Expression of Flt3 tyrosine kinase receptor gene in mouse hematopoietic and nervous tissues. *Differentiation; research in biological diversity*, *58*(5), 351–9. doi:10.1046/j.1432-0436.1995.5850351.x

- DeZern, A. E., Sung, A., Kim, S., Smith, B. D., Karp, J. E., Gore, S. D., Jones, R. J., et al. (2011). Role of allogeneic transplantation for FLT3/ITD acute myeloid leukemia: outcomes from 133 consecutive newly diagnosed patients from a single institution. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 17(9), 1404–9. doi:10.1016/j.bbmt.2011.02.003
- Dosil, M., Wang, S., & Lemischka, I. R. (1993). Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Molecular and cellular biology*, 13(10), 6572–85. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=364716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, Thomas, Burnett, Alan K, Dombret, H., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453-74. doi:10.1182/blood-2009-07-235358
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., et al. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine*, 2(5), 561–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616716>
- Fabbro, D., Buchdunger, E., Wood, J., Mestan, J., Hofmann, F., Ferrari, S., Mett, H., et al. (1999). Inhibitors of protein kinases: CGP 41251, a protein kinase inhibitor with potential as an anticancer agent. *Pharmacology & therapeutics*, 82(2-3), 293–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454207>
- Fabbro, D., Ruetz, S., Bodis, S., Pruschy, M., Csermak, K., Man, A., Campochiaro, P., et al. (2000). PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anti-cancer drug design*, 15(1), 17–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888033>
- Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M. F., & Mecucci, C. (2007). Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*, 109(3), 874–85. doi:10.1182/blood-2006-07-012252
- Fenski, R., Flesch, K., Serve, S., Mizuki, M., Oelmann, E., Kratz-Albers, K., Kienast, J., et al. (2000). Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *British journal of haematology*, 108(2), 322–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691863>
- 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 : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(28), 4339–45. doi:10.1200/JCO.2010.28.9678
- Fischer, T. (2011). Rethinking bioactivity of FLT3 inhibitors. *Blood*, 117(12), 3247-8. doi:10.1182/blood-2011-02-334540
- Frödin, M., & Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and cellular endocrinology*, 151(1-2), 65–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411321>
- Fröhling, S., Schlenk, R. F., Breittruck, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Döhner, H., 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. *Blood*, 100(13), 4372–80. doi:10.1182/blood-2002-05-1440
- Fröhling, S., Scholl, C., Levine, R. L., Loriaux, M., Boggon, T. J., Bernard, O. A., Berger, R., et al. (2007). Identification of driver and passenger mutations of FLT3 by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles. *Cancer cell*, 12(6), 501–13. doi:10.1016/j.ccr.2007.11.005

- Fujimoto, K., Lyman, S. D., Hiriyama, F., & Ogawa, M. (1996). Isolation and characterization of primitive hematopoietic progenitors of murine fetal liver. *Experimental hematology*, *24*(2), 285–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641354>
- Gabbianelli, M., Pelosi, E., Montesoro, E., Valtieri, M., Luchetti, L., Samoggia, P., Vitelli, L., et al. (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), 1661–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544638>
- Gale, R. E., Green, C., Allen, C., Mead, A. J., Burnett, A. K., Hills, R. K., & Linch, D. C. (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, *111*(5), 2776–84. doi:10.1182/blood-2007-08-109090
- Gilliland, D. G., & Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, *100*(5), 1532–42. doi:10.1182/blood-2002-02-0492
- Giordano, C. R., Mueller, K. L., Terlecky, L. J., Krentz, K. A., Bollig-Fischer, A., Terlecky, S. R., & Boerner, J. L. (2012). A targeted enzyme approach to sensitization of tyrosine kinase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Experimental cell research*, *318*(16), 2014–21. doi:10.1016/j.yexcr.2012.06.001
- Godfrey, R., Arora, D., Bauer, R., Stopp, S., Müller, J. P., Heinrich, T., Böhmer, S.-A., et al. (2012). Cell transformation by FLT3 ITD in acute myeloid leukemia involves oxidative inactivation of the tumor suppressor protein-tyrosine phosphatase DEP-1/ PTPRJ. *Blood*, *119*(19), 4499–511. doi:10.1182/blood-2011-02-336446
- Gökbuget N., Ganser A. und Schlenk R.F. (2005). Akute Leukämien. DGHO Retrieved from <http://ebookbrowse.com/dgho-leitlinie-all-pdf-d367735735>
- Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., et al. (2004). The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular cell*, *13*(2), 169–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759363>
- Griswold, I. J., Shen, L. J., La Rosée, P., Demehri, S., Heinrich, M. C., Braziel, R. M., McGreevey, L., et al. (2004). Effects of MLN518, a dual FLT3 and KIT inhibitor, on normal and malignant hematopoiesis. *Blood*, *104*(9), 2912–8. doi:10.1182/blood-2003-05-1669
- Grosjean-Raillard, J., Adès, L., Boehrer, S., Tailler, M., Fabre, C., Braun, T., De Botton, S., et al. (2008). Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, *13*(9), 1148–61. doi:10.1007/s10495-008-0243-4
- 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. doi:10.1182/blood-2002-11-3441
- Haferlach T, Schoch C. (2002). WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS). *Dtsch Med Wochenschr*; *127*(9):447-450.
- Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S., Bazan, J. F., Kastelein, R., et al. (1994). Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*, *368*(6472), 643–8. doi:10.1038/368643a0
- 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), 624–31. doi:10.1038/sj.onc.1203354

- Haylock, D. N., Horsfall, M. J., Dowse, T. L., Ramshaw, H. S., Niutta, S., Protopsaltis, S., Peng, L., et al. (1997). Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood*, *90*(6), 2260–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310477>
- Heidel, F., Solem, F. K., Breitenbuecher, F., Lipka, D. B., Kasper, S., Thiede, M. H., Brandts, C., et al. (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. doi:10.1182/blood-2005-06-2469
- Heiss, E., Masson, K., Sundberg, C., Pedersen, M., Sun, J., Bengtsson, S., & Rönstrand, L. (2006). Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of Src family kinases and the protein tyrosine phosphatase SHP2. *Blood*, *108*(5), 1542–50. doi:10.1182/blood-2005-07-008896
- Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, *80*(2), 213–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834741>
- Hirayama, F., Lyman, S. D., Clark, S. C., & Ogawa, M. (1995). The flt3 ligand supports proliferation of lymphohematopoietic progenitors and early B-lymphoid progenitors. *Blood*, *85*(7), 1762–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7703483>
- Horiike, S., Yokota, S., Nakao, M., Iwai, T., Sasai, Y., Kaneko, H., Taniwaki, M., et al. (1997). Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *11*(9), 1442–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305595>
- Hotte, S. J., & Hirte, H. W. (2002). BAY 43-9006: early clinical data in patients with advanced solid malignancies. *Current pharmaceutical design*, *8*(25), 2249–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369852>
- Hudak, S., Hunte, B., Culpepper, J., Menon, S., Hannum, C., Thompson-Snipes, L., & Rennick, D. (1995). FLT3/FLK2 ligand promotes the growth of murine stem cells and the expansion of colony-forming cells and spleen colony-forming units. *Blood*, *85*(10), 2747–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537980>
- Hunter, H. M., Pallis, M., Seedhouse, C. H., Grundy, M., Gray, C., & Russell, N. H. (2004). The expression of P-glycoprotein in AML cells with FLT3 internal tandem duplications is associated with reduced apoptosis in response to FLT3 inhibitors. *British journal of haematology*, *127*(1), 26–33. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05145.x
- Huse, M., & Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, *109*(3), 275–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015977>
- Ito, A., Hirota, S., Kitamura, Y., & Nomura, S. (1993). Developmental expression of flt3 mRNA in the mouse brain. *Journal of molecular neuroscience : MN*, *4*(4), 235–43. doi:10.1007/BF02821555
- 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. doi:10.1182/blood-2009-03-209999
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., & Gilliland, D. G. (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), 310–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756186>
- Kharazi, S., Mead, A. J., Mansour, A., Hultquist, A., Böiers, C., Luc, S., Buza-Vidas, N., et al. (2011). Impact of gene dosage, loss of wild-type allele, and FLT3 ligand on Flt3-ITD-induced myeloproliferation. *Blood*, *118*(13), 3613–21. doi:10.1182/blood-2010-06-289207

- Kim, K.-T., Baird, K., Ahn, J.-Y., Meltzer, P., Lilly, M., Levis, M., & Small, D. (2005). Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood*, *105*(4), 1759–67. doi:10.1182/blood-2004-05-2006
- Kim, K.-T., Levis, M., & Small, D. (2006). Constitutively activated FLT3 phosphorylates BAD partially through pim-1. *British journal of haematology*, *134*(5), 500–9. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06225.x
- Kim, Y. G., Kim, M. J., Lim, J.-S., Lee, M.-S., Kim, J. S., & Yoo, Y. Do. (2006). ICAM-3-induced cancer cell proliferation through the PI3K/Akt pathway. *Cancer letters*, *239*(1), 103–10. doi:10.1016/j.canlet.2005.07.023
- 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. doi:10.1182/blood-2010-04-261867
- Kiyoi, H., Naoe, T., Nakano, Y., Yokota, S., Minami, S., Miyawaki, S., Asou, N., et al. (1999). Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, *93*(9), 3074–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216104>
- Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., Takeshita, A., et al. (1997). Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, *11*(9), 1447–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305596>
- 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), 1333–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9737679>
- Kiyoi, Hitoshi, Ohno, R., Ueda, R., Saito, H., & Naoe, T. (2002). Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*, *21*(16), 2555–63. doi:10.1038/sj.onc.1205332
- Knapper, S., Mills, K. I., Gilkes, A. F., Austin, S. J., Walsh, V., & Burnett, A. K. (2006). The effects of lestaurtinib (CEP701) and PKC412 on primary AML blasts: the induction of cytotoxicity varies with dependence on FLT3 signaling in both FLT3-mutated and wild-type cases. *Blood*, *108*(10), 3494–503. doi:10.1182/blood-2006-04-015487
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., & Sowadski, J. M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *253*(5018), 407–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1862342>
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S., & Sowadski, J. M. (1991). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *253*(5018), 414–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1862343>
- Konopleva, M., Konoplev, S., Hu, W., Zaritskey, A. Y., Afanasiev, B. V., & Andreeff, M. (2002). Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, *16*(9), 1713–24. doi:10.1038/sj.leu.2402608
- Kottaridis, P D, Gale, R. E., Frew, M. E., Harrison, G., Langabeer, S. E., Belton, A. A., Walker, H., et al. (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United King. *Blood*, *98*(6), 1752–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535508>

- Kottaridis, Panagiotis D, Gale, R. E., Langabeer, S. E., Frew, M. E., Bowen, D. T., & Linch, D. C. (2002). Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*, *100*(7), 2393–8. doi:10.1182/blood-2002-02-0420
- Lavagna-Sévenier, 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 : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *12*(3), 301–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529123>
- Le Coutre, P., Mologni, L., Cleris, L., Marchesi, E., Buchdunger, E., Giardini, R., Formelli, F., et al. (1999). In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *Journal of the National Cancer Institute*, *91*(2), 163–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9923858>
- Lee, B. H., Williams, I. R., Anastasiadou, E., Boulton, C. L., Joseph, S. W., Amaral, S. M., Curley, D. P., et al. (2005). FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. *Oncogene*, *24*(53), 7882–92. doi:10.1038/sj.onc.1208933
- Levis, M, Tse, K. F., Smith, B. D., Garrett, E., & Small, D. (2001). A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations. *Blood*, *98*(3), 885–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468194>
- Levis, Mark, Allebach, J., Tse, K.-F., Zheng, R., Baldwin, B. R., Smith, B. D., Jones-Bolin, S., et al. (2002). A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*, *99*(11), 3885–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010785>
- Levis, Mark, Brown, P., Smith, B. D., Stine, A., Pham, R., Stone, R., Deangelo, D., et al. (2006). Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors. *Blood*, *108*(10), 3477–83. doi:10.1182/blood-2006-04-015743
- Levis, Mark, Ravandi, F., Wang, E. S., Baer, M. R., Perl, A., Coutre, S., Erba, H., et al. (2011). Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood*, *117*(12), 3294–301. doi:10.1182/blood-2010-08-301796
- Lisovsky, M., Braun, S. E., Ge, Y., Takahira, H., Lu, L., Savchenko, V. G., Lyman, S. D., et al. (1996). Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *10*(6), 1012–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8667636>
- Lisovsky, M., Estrov, Z., Zhang, X., Consoli, U., Sanchez-Williams, G., Snell, V., Munker, R., et al. (1996). Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood*, *88*(10), 3987–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8916965>
- Lotem, J., & Sachs, L. (1995). Interferon-gamma inhibits apoptosis induced by wild-type p53, cytotoxic anti-cancer agents and viability factor deprivation in myeloid cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *9*(4), 685–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7723404>
- Lyman, S. D., James, L., Vanden Bos, T., De Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L. T., et al. (1993). Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell*, *75*(6), 1157–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505204>
- Lyman, S. D., Stocking, K., Davison, B., Fletcher, F., Johnson, L., & Escobar, S. (1995). Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci. *Oncogene*, *11*(6), 1165–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7566977>

- Löwenberg, B. (2008a). Diagnosis and prognosis in acute myeloid leukemia--the art of distinction. *The New England journal of medicine*, 358(18), 1960–2. doi:10.1056/NEJMe0802379
- Löwenberg, B. (2008b). Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 1–11. doi:10.1182/asheducation-2008.1.1
- Mahon, F. X., Deininger, M. W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, 96(3), 1070–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910924>
- Maroc, N., Rottapel, R., Rosnet, O., Marchetto, S., Lavezzi, C., Mannoni, P., Birnbaum, D., et al. (1993). Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 8(4), 909–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384358>
- Masson, K., & Rönstrand, L. (2009). Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cellular signalling*, 21(12), 1717–26. doi:10.1016/j.cellsig.2009.06.002
- Matthews, W., Jordan, C. T., Wiegand, G. W., Pardoll, D., & Lemischka, I. R. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*, 65(7), 1143–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1648448>
- Mayr C. & Bartel D.P. (2009). *Cell*. 2009 Aug 21. 138(4):673-84.
- McKenna, H. J., De Vries, P., Brasel, K., Lyman, S. D., & Williams, D. E. (1995). Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 86(9), 3413–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579445>
- Meshinchi, S, Woods, W. G., Stirewalt, D. L., Sweetser, D. A., Buckley, J. D., Tjoa, T. K., Bernstein, I. D., et al. (2001). Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*, 97(1), 89–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133746>
- Meshinchi, S., Alonzo, T. A., Stirewalt, D. L., Zwaan, M., Zimmerman, M., Reinhardt, D., Kaspers, G. J. L., et al. (2006). Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood*, 108(12), 3654-61. doi:10.1182/blood-2006-03-009233
- Meshinchi, Soheil, & Appelbaum, F. R. (2009). Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(13), 4263–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123
- Miller, C. L., & Lai, B. (2005). Human and mouse hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 290, 71-89.
- Minami, Y., Yamamoto, K., Kiyoi, H., Ueda, R., Saito, H., & Naoe, T. (2003). Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood*, 102(8), 2969–75. doi:10.1182/blood-2002-12-3813
- Mizuki, M, Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Müller, C., Grüning, W., et al. (2000). Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*, 96(12), 3907–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090077>
- Mizuki, Masao, Schwable, J., Steur, C., Choudhary, C., Agrawal, S., Sargin, B., Steffen, B., et al. (2003). Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood*, 101(8), 3164–73. doi:10.1182/blood-2002-06-1677

- Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S. P., & Bloomfield, C. D. (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, *109*(2), 431–48. doi:10.1182/blood-2006-06-001149
- Muench, M. O., Roncarolo, M. G., Menon, S., Xu, Y., Kastelein, R., Zurawski, S., Hannum, C. H., et al. (1995). FLK-2/FLT-3 ligand regulates the growth of early myeloid progenitors isolated from human fetal liver. *Blood*, *85*(4), 963–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531516>
- Müller-Tidow C., Krug U., Brunnberg U., Berdel W.E., & Serve H. (2007) Tyrosine Kinases Are the Targets of New Treatments in Oncology. *Dtsch Arztebl* 2007; 104(19): A-1312 / B-1165 /C-1116. Retrieved from <http://www.aerzteblatt.de/pdf/104/19/a1312.pdf>
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., et al. (1996). Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, *10*(12), 1911–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8946930>
- Namikawa, R., Muench, M. O., De Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (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*(5), 1881–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8634436>
- Naoe, T., Kiyoe, H., Yamamoto, Y., Minami, Y., Yamamoto, K., Ueda, R., & Saito, H. (2001). FLT3 tyrosine kinase as a target molecule for selective antileukemia therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *48 Suppl 1*, S27–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587362>
- Oh, B., Park, S., Pak, J. H., & Kim, I. (2012). Downregulation of Mcl-1 by daunorubicin pretreatment reverses resistance of breast cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Biochemical and biophysical research communications*, *422*(1), 42–7. doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.093
- Ostman, A., Frijhoff, J., Sandin, A., & Böhmer, F.-D. (2011). Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *Journal of biochemistry*, *150*(4), 345–56. doi:10.1093/jb/mvr104
- Ozaki, H., Seo, M. S., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, N., Hofmann, F., et al. (2000). Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *The American journal of pathology*, *156*(2), 697–707. doi:10.1016/S0002-9440(10)64773-6
- O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, *348*(11), 994–1004. doi:10.1056/NEJMoa022457
- O'Donnell M.R., Abboud C.N., Altman J., Appelbaum F.R., Arber D.A., Attar E. et al. (2012). Akute myeloid leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 Aug;10(8):984-1021.
- 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. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4136
- Petzer, A. L., Zandstra, P. W., Piret, J. M., & Eaves, C. J. (1996). Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *The Journal of experimental medicine*, *183*(6), 2551–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Piacibello, W., Fubini, L., Sanavio, F., Brizzi, M. F., Severino, A., Garetto, L., Stacchini, A., et al. (1995). Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy

- with other hematopoietic growth factors. *Blood*, 86(11), 4105–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7492767>
- Pratz, K. W., Sato, T., Murphy, K. M., Stine, A., Rajkhowa, T., & Levis, M. (2010). FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood*, 115(7), 1425–32. doi:10.1182/blood-2009-09-242859
- Romanovsky, V. (1925) On the Moments of the Standard Deviation and of the Correlation Coefficient in Samples from Normal. *Metron* 5, 3-46, 1925
- Ray, R. J., Paige, C. J., Furlonger, C., Lyman, S. D., & Rottapel, R. (1996). Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *European journal of immunology*, 26(7), 1504–10. doi:10.1002/eji.1830260715
- Reindl, C., & Spiekermann, K. (2006). From kinases to cancer: leakiness, loss of autoinhibition and leukemia. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(6), 599–602. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582613>
- Rocnik, J. L., Okabe, R., Yu, J.-C., 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. *Blood*, 108(4), 1339-45. doi:10.1182/blood-2005-11-011429
- Rombouts, W. J., Blokland, I., Löwenberg, B., & Ploemacher, R. E. (2000). Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 14(4), 675–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764154>
- Rosnet, O., & Birnbaum, D. (1993). Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Critical reviews in oncogenesis*, 4(6), 595–613. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506935>
- Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O., & Birnbaum, D. (1991a). Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene*, 6(9), 1641–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656368>
- Rosnet, O., Mattei, M. G., Marchetto, S., & Birnbaum, D. (1991b). Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*, 9(2), 380–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004790>
- Rosnet, O., Schiff, C., Pébusque, M. J., Marchetto, S., Tonnelles, C., Toiron, Y., Birg, F., et al. (1993b). Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*, 82(4), 1110–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394751>
- Rossner, M. T., McArthur, G. A., Allen, J. D., & Metcalf, D. (1994). Fms-like tyrosine kinase 3 catalytic domain can transduce a proliferative signal in FDC-P1 cells that is qualitatively similar to the signal delivered by c-Fms. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 5(5), 549–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8049161>
- Rottapel, R., Turck, C. W., Casteran, N., Liu, X., Birnbaum, D., Pawson, T., & Dubreuil, P. (1994). Substrate specificities and identification of a putative binding site for PI3K in the carboxy tail of the murine Flt3 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 9(6), 1755–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8183574>
- Rusten, L. S., Lyman, S. D., Veiby, O. P., & Jacobsen, S. E. (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(4), 1317–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608220>
- Sander, S., Calado, D. P., Srinivasan, L., Köchert, K., Zhang, B., Rosolowski, M., Rodig, S. J., et al. (2012). Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer cell*, 22(2), 167–79. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.012

- 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. doi:10.1182/blood-2010-01-266742
- Sattler, M., Scheijen, B., Weisberg, E., & Griffin, J. D. (2003). Mutated tyrosine kinases as therapeutic targets in myeloid leukemias. *Advances in experimental medicine and biology*, *532*, 121–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12908554>
- Scheijen, B., Ngo, H. T., Kang, H., & Griffin, J. D. (2004). FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene*, *23*(19), 3338–49. doi:10.1038/sj.onc.1207456
- Schessl, C., Rawat, V. P. S., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T. M., Rosten, P. M., Spiekermann, K., et al. (2005). The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *The Journal of clinical investigation*, *115*(8), 2159–68. doi:10.1172/JCI24225
- Schlenk, R. F., Döhner, K., Krauter, J., Fröhling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., et al. (2008). Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, *358*(18), 1909–18. doi:10.1056/NEJMoa074306
- Schmidt-Arras, D.-E., Böhmer, A., Markova, B., Choudhary, C., Serve, H., & Böhmer, F.-D. (2005). Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Molecular and cellular biology*, *25*(9), 3690–703. doi:10.1128/MCB.25.9.3690-3703.2005
- Schnittger, S., Bacher, U., Haferlach, C., Alpermann, T., Kern, W., & Haferlach, T. (2012). Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13–15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes, chromosomes & cancer*, *51*(10), 910–24. doi:10.1002/gcc.21975
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Löffler, H., et al. (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, *100*(1), 59–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12070009>
- Schwäble, J., Choudhary, C., Thiede, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Steur, C., Rehage, M., et al. (2005). RGS2 is an important target gene of Flt3-ITD mutations in AML and functions in myeloid differentiation and leukemic transformation. *Blood*, *105*(5), 2107–14. doi:10.1182/blood-2004-03-0940
- Shah, A. J., Smogorzewska, E. M., Hannum, C., & Crooks, G. M. (1996). Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood*, *87*(9), 3563–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8611678>
- Shah, N. P., Nicoll, J. M., Nagar, B., Gorre, M. E., Paquette, R. L., Kuriyan, J., & Sawyers, C. L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer cell*, *2*(2), 117–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204532>
- Shawver, L. K., Slamon, D., & Ullrich, A. (2002). Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer cell*, *1*(2), 117–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086869>
- She, Q.-B., Solit, D. B., Ye, Q., O'Reilly, K. E., Lobo, J., & Rosen, N. (2005). The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer cell*, *8*(4), 287–97. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.006
- Sheridan, C., & Martin, S. J. (2008). Commitment in apoptosis: slightly dead but mostly alive. *Trends in cell biology*, *18*(8), 353–7. doi:10.1016/j.tcb.2008.06.002
- Shih, L.-Y., Huang, C.-F., Wu, J.-H., Lin, T.-L., Dunn, P., Wang, P.-N., Kuo, M.-C., et al. (2002). Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow

- samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*, 100(7), 2387–92. doi:10.1182/blood-2002-01-0195
- Smith HF. (1951). Analysis of variance with unequal but proportionate numbers of observations in the subclasses of a two-way classification. *Biometrics*. 1951;7:70-4.
- Smith, C. C., Wang, Q., Chin, C.-S., Salerno, S., Damon, L. E., Levis, M. J., Perl, A. E., et al. (2012). Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, 485(7397), 260–3. doi:10.1038/nature11016
- Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C., & Lodish, H. F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, 98(2), 181–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428030>
- Spiekermann, K., Dirschinger, R. J., Schwab, R., Bagrintseva, K., Faber, F., Buske, C., Schnittger, S., et al. (2003). The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood*, 101(4), 1494–504. doi:10.1182/blood-2002-04-1045
- Stirewalt, D L, Kopecky, K. J., Meshinchi, S., Appelbaum, F. R., Slovak, M. L., Willman, C. L., & Radich, J. P. (2001). FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 97(11), 3589–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369655>
- Stirewalt, Derek L, & Radich, J. P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature reviews. Cancer*, 3(9), 650–65. doi:10.1038/nrc1169
- 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. doi:10.1182/blood-2004-03-0891
- Stölzel, F., Studel, C., Oelschlägel, U., Mohr, B., Koch, S., Ehninger, G., & Thiede, C. (2010). Mechanisms of resistance against PKC412 in resistant FLT3-ITD positive human acute myeloid leukemia cells. *Annals of hematology*, 89(7), 653–62. doi:10.1007/s00277-009-0889-1
- Swords, R., Freeman, C., & Giles, F. (2012). Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 26(10), 2176–85. doi:10.1038/leu.2012.114
- Takahashi, M., Ogino, T., & Baba, K. (1969). Estimation of relative molecular length of DNA by electrophoresis in agarose gel. *Biochimica et biophysica acta*, 174(1), 183–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4885691>
- Takahashi, Y., Daitoku, H., Hirota, K., Tamiya, H., Yokoyama, A., Kako, K., Nagashima, Y., et al. (2011). Asymmetric arginine dimethylation determines life span in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16. *Cell metabolism*, 13(5), 505–16. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.017
- Thiede, C., Studel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., et al. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99(12), 4326–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036858>
- Tickenbrock, L., Schwäble, J., Wiedehage, M., Steffen, B., Sargin, B., Choudhary, C., Brandts, C., et al. (2005). Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. *Blood*, 105(9), 3699–706. doi:10.1182/blood-2004-07-2924
- Tse, K. F., Novelli, E., Civin, C. I., Bohmer, F. D., & Small, D. (2001). Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 15(7), 1001–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11455967>

- Turner, A. M., Bennett, L. G., Lin, N. L., Wypych, J., Bartley, T. D., Hunt, R. W., Atkins, H. L., et al. (1995). Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood*, *85*(8), 2052–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7536489>
- Turner, A. M., Lin, N. L., Issarachai, S., Lyman, S. D., & Broudy, V. C. (1996). FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*, *88*(9), 3383–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896403>
- Veiby, O. P., Lyman, S. D., & Jacobsen, S. E. (1996). Combined signaling through interleukin-7 receptors and flt3 but not c-kit potently and selectively promotes B-cell commitment and differentiation from uncommitted murine bone marrow progenitor cells. *Blood*, *88*(4), 1256–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8695843>
- 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. doi:10.1182/blood-2006-10-053181
- Von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C., & Duyster, J. (2002). BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to ST1571: a prospective study. *Lancet*, *359*(9305), 487–91. doi:10.1016/S0140-6736(02)07679-1
- Wan, P. T. C., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, *116*(6), 855–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035987>
- Weinstein, I. B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5578), 63–4. doi:10.1126/science.1073096
- 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124173>
- Wernig, G., Gonneville, J. R., Crowley, B. J., Rodrigues, M. S., Reddy, M. M., Hudon, H. E., Walz, C., et al. (2008). The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood*, *111*(7), 3751–9. doi:10.1182/blood-2007-07-102186
- Whitman, S. P., Archer, K. J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B. D., Carroll, A. J., et al. (2001). Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer research*, *61*(19), 7233–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585760>
- Williams, A. B., Nguyen, B., Li, L., Brown, P., Levis, M., Leahy, D., & Small, D. (2012). Mutations of FLT3/ITD confer resistance to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* doi:10.1038/leu.2012.191
- Williams, A. B., Li, L., Nguyen, B., Brown, P., Levis, M., & Small, D. (2012). Fluvastatin inhibits FLT3 glycosylation in human and murine cells and prolongs survival of mice with FLT3/ITD leukemia. *Blood*, *120*(15), 3069–79. doi:10.1182/blood-2012-01-403493
- Wodicka, L. M., Ciceri, P., Davis, M. I., Hunt, J. P., Floyd, M., Salerno, S., Hua, X. H., et al. (2010). Activation state-dependent binding of small molecule kinase inhibitors: structural insights from biochemistry. *Chemistry & biology*, *17*(11), 1241–9. doi:10.1016/j.chembiol.2010.09.010
- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., et al. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, *97*(8), 2434–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11290608>

- Yang, C., Jiang, F., Xu, F., & Jiang, G. (2012). ADAM10 overexpression confers resistance to doxorubicin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 33(5), 1535–41. doi:10.1007/s13277-012-0405-4
- Yang, T. T. C., Xiong, Q., Graef, I. A., Crabtree, G. R., & Chow, C.-W. (2005). Recruitment of the extracellular signal-regulated kinase/ribosomal S6 kinase signaling pathway to the NFATc4 transcription activation complex. *Molecular and cellular biology*, 25(3), 907–20. doi:10.1128/MCB.25.3.907-920.2005
- Yang-Yen, H.-F. (2006). Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *Journal of biomedical science*, 13(2), 201–4. doi:10.1007/s11373-005-9064-4
- Yokota, S., Kiyoi, H., Nakao, M., Iwai, T., Misawa, S., Okuda, T., Sonoda, Y., et al. (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), 1605–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9324277>
- 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. doi:10.1182/blood-2009-05-222034
- Zeigler, F. C., Bennett, B. D., Jordan, C. T., Spencer, S. D., Baumhueter, S., Carroll, K. J., Hooley, J., et al. (1994). Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood*, 84(8), 2422–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919361>
- Zhang, S., & Broxmeyer, H. E. (1999). p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 254(2), 440–5. doi:10.1006/bbrc.1998.9959
- Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., Hango, G., Cooper, S., Spolski, R., Leonard, W. J., et al. (2000). Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *The Journal of experimental medicine*, 192(5), 719–28. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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. *Journal of leukocyte biology*, 65(3), 372–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080542>
- Zhang, S. Q., Tsiaras, W. G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., & Neel, B. G. (2002). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Molecular and cellular biology*, 22(12), 4062–72. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=133866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zhang, W., Konopleva, M., Ruvolo, V. R., McQueen, T., Evans, R. L., Bornmann, W. G., McCubrey, J., et al. (2008). Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(4), 808–18. doi:10.1038/sj.leu.2405098
- Zhang, Weiguo, Konopleva, M., Shi, Y., 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. doi:10.1093/jnci/djm328
- Zhao, M., Kiyoi, H., Yamamoto, Y., Ito, M., Towatari, M., Omura, S., Kitamura, T., et al. (2000). In vivo treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 14(3), 374–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720129>

Zheng, R., Friedman, A. D., Levis, M., Li, L., Weir, E. G., & Small, D. (2004). Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood*, *103*(5), 1883–90. doi:10.1182/blood-2003-06-1978

Doktorarbeiten:

Borrmann A. (2012), Funktionelle Charakterisierung der FLT3-ITD G613E(33) im Zellkulturmodell.

Grundler R. (2005), Charakterisierung von AML-assoziierten FLT3-Rezeptortyrosinkinasevarianten im Zell- und Mausmodell.

Reindl C. (2007), Aberrante Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase FLT3 in der akuten myeloischen Leukämie.

Schmidt-Arras, D. (2007), Tyrosinphosphorylierung als Regulator der Reifung von Rezeptortyrosinkinasen.

Bücher:

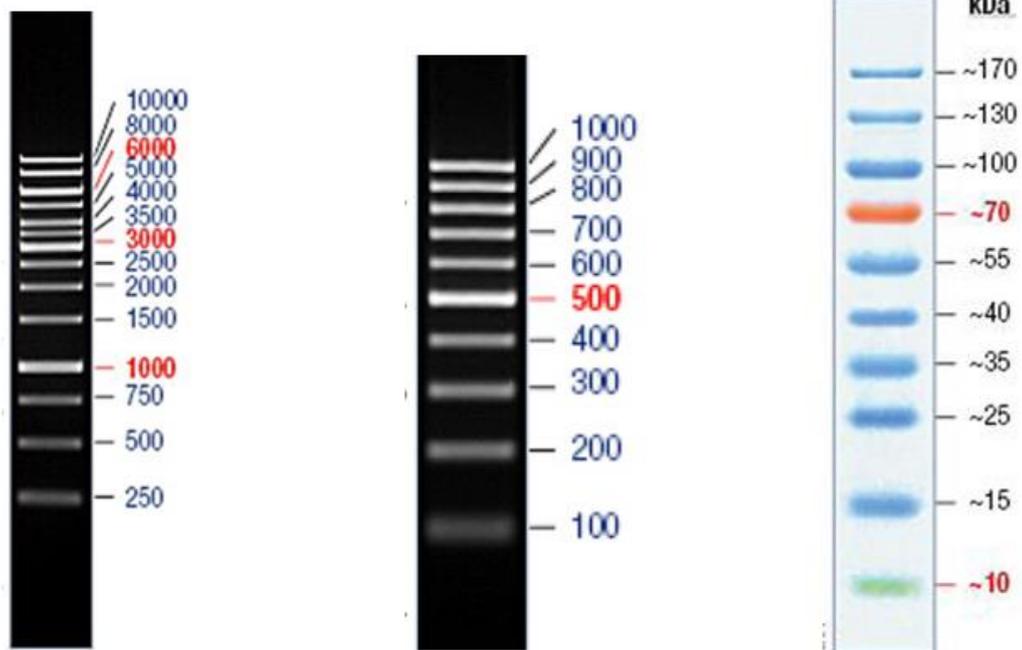
Hoffbrand, JE, Pettit, PAH, Moss, and D. Hoelzer (2003). Grundkurs Hämatologie. Blackwell Verlag, 2nd Edition.

Kufe D., Pollock R., Weichselbaum R., Bast R., Gansler T., Holland J. & Frei E. (2003). Cancer Medicine. Hamilton BC Decker 6th Edition. ISBN-10:1-55009-213-8

Löffler, G., Petrides P.E., Petro E. und Heinrich P. (2003). Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag, 8th Edition.

Anhang

Anhang DNA- und Protein-Größenstandards:



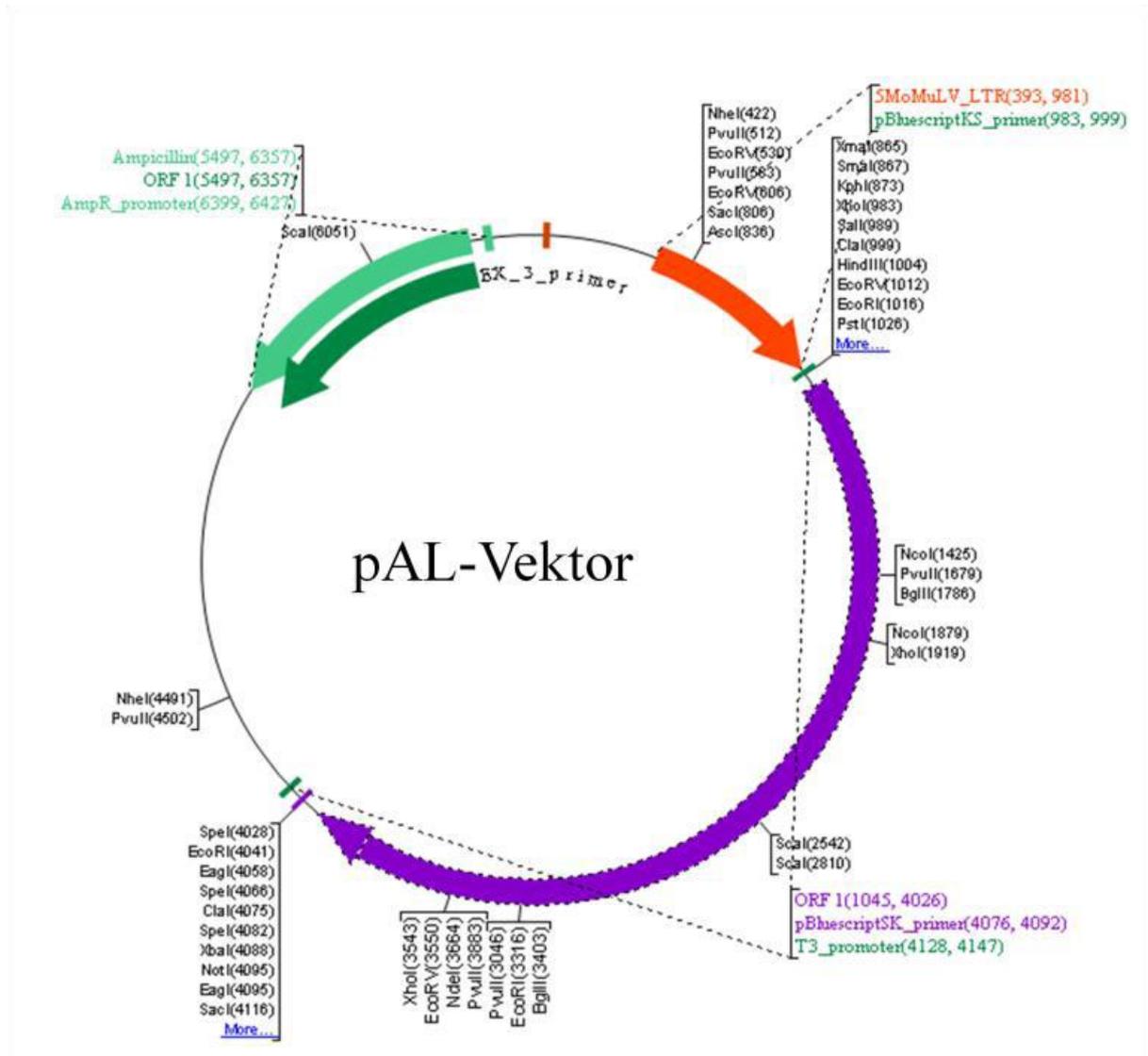
DNA- und Protein-Größenstandards

Links: DNA-Größenstandard 1kb-Ladder, Fermentas

Mitte: DNA-Größenstandard 100bp-Ladder, Fermentas

Rechts: Protein-Größenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

Anhang Vektorkarte pAL:



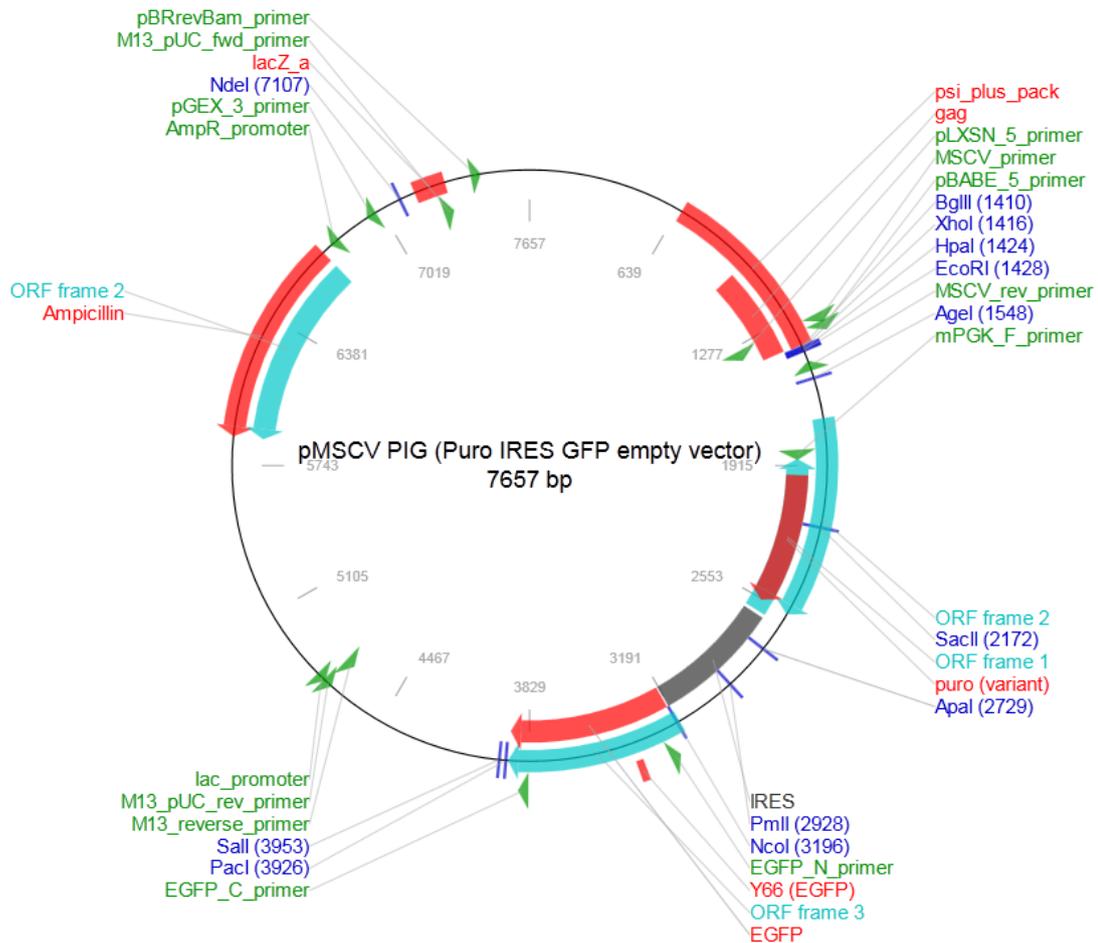
Schematischer Aufbau des Säuger-Expressionsvektors pAL zur Expression von *FLT3*-ITDs in murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die *FLT3*-ITD-Konstrukte wurde über die Schnittstellen *HindIII* und *BamHI* hinter den CMV-Promotor kloniert.

Anhang Vektorkarte pCR[®]4-TOPO[®]:



Schematischer Aufbau des Vektorsystems pCR[®]4-TOPO[®] zur Sequenzierung von *FLT3*-ITDs. Die *FLT3*-ITD-Konstrukte wurde hinter den P_{lac}-Promotor kloniert.

Anhang Vektorkarte pMSCV-Puromycin-IRES-GFP (PIG):



Schematischer Aufbau des Säuger-Expressionsvektors pMSCV-Puromycin-IRES-GFP (PIG) zur Expression von *FLT3*-ITDs in murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die *FLT3*-ITD-Konstrukte wurde über die Schnittstellen *Bgl*III und *Xho*I hinter den MSCV-Promotor kloniert.

Danksagung

Die letzten Seiten meiner Arbeit möchte ich nutzen, um den Menschen zu danken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Zuallererst möchte ich mich daher herzlich bei Herrn Prof. Thomas Fischer für die Bereitstellung des interessanten und herausfordernden Themas, für die Betreuung, für das Vertrauen in mich und meine Arbeit, für die großzügigen wissenschaftlich-geistigen Freiheiten und die hervorragende Unterstützung während meiner Doktorandenzeit bedanken.

Herrn Prof. Naumann danke ich einerseits für die Zweitkorrektur dieser Arbeit und darüberhinaus möchte ich zusammen mit Herrn Prof. Gundelfinger für die Unterstützung und Förderung innerhalb des Graduiertenkollegs GRK1167 der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken.

Unseren Postdocs, Tina und Florian, möchte ich für ihr immer offenes Ohr und die gute Zeit danken. Allen meinen Kollegen danke ich für die nette Zeit und ihre stetige Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an meine Mädels und Jungs, die den Feierabend für mich zu jederzeit zu einem Moment der Entspannung gemacht haben. Ich danke Euch dafür, dass Ihr mein Leben auf eine besondere Art bereichert habt.

Leider haben nicht alle Menschen das Ende dieser Arbeit miterleben können. Ich möchte Euch trotzdem danken, dass Ihr mich auf diesem Weg begleitet habt.

Liebe Familie, Ich danke Euch für Eure Unterstützung, Euer Verständnis, Eure Liebe, Eure Anerkennung und daher widme Euch in Liebe diese Arbeit...

Lebenslauf



Thomas Sebastian Mack
Klingenbachstr. 43
65207 Wiesbaden

0176-61329645
TM.Mack@gmx.de

Persönliche Daten

Seit 04/2009	Promotion an der Klinik für Hämatologie/Onkologie an der Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg.
01/2009	Diplomabschluss Biologie
04/2003 – 01/2009	Biologiestudium an der Johannes Gutenberg Universität Mainz.

Schulbildung

1993 – 2002	Gymnasium am Mosbacher Berg, Wiesbaden.
1989 – 1993	Grundschule Wiesbaden-Breckenheim.

Publikationen

1) "3,4-Diarylmaleimides-a novel class of kinase inhibitors-effectively induce apoptosis in FLT3-ITD-dependent cells." Ann Hematol. 2012 Mar;91(3):331-44.

Heidel FH, **Mack TS**, Razumovskaya E, Blum MC, Lipka DB, Ballaschk A, Kramb JP, Plutizki S, Rönstrand L, Dannhardt G, Fischer T.



Thomas S. Mack
Wiesbaden, 5 / 2013

Thomas Sebastian Mack
Klingenbachstr. 43
65207 Wiesbaden

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

**Biologische Charakterisierung von unterschiedlichen FLT3 internen
Tandemduplikationen (ITD) in der akuten myeloischen Leukämie (AML)**

Selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.



Thomas S. Mack
Wiesbaden, 5 / 2013