

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik,
Klinikum rechts der Isar

“Evaluierung des biologischen Effekts von FLT3 und SRC Inhibitoren auf FLT3
Mutationen im murinen und humanen Zellsystem”

Hannes Leischner

Vollständiger Abdruck
der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster
2. Priv.-Doz. Dr. T. N. Dechow

Die Dissertation wurde am 22.06.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 14.12.2011 angenommen.

Für meine Großeltern

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	4
2.1 Die akute myeloische Leukämie.....	4
2.1.1 Das <i>two-hit</i> -Modell der Entstehung akuter Leukämien	7
2.2 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3	8
2.2.1 Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese	9
2.2.2 FLT3-Inhibitoren	11
2.3 Tyrosinkinaseinhibitoren.....	11
2.3.1 PKC412 (Midostaurin)	12
2.3.2 BMS 354-286 (Dasatinib)	13
2.3.3 Sorafenib (Nexavar)	13
2.3.4 Sunitinib (Sutent)	14
3 Aufgabenstellung.....	17
4 Ergebnisse	19
4.1 Charakteristika von FLT3-Mutationen	19
4.1.1 Konstitutive Aktivierung der mutierten FLT3-Proteine	19
4.1.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 durch FLT3-Mutanten.....	20
4.1.3 Faktorunabhängige Proliferation von FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierenden Zellen	20
4.2 Sensitivität von FLT3 Mutationen gegenüber einzelner Inhibitoren	22
4.2.1 Wirkung des Inhibitors PKC412 auf das Wachstum FLT3 ITD- oder FLT3 TKD- exprimierender Zelllinien.....	22
4.2.2 Wirkung des Inhibitors Dasatinib auf das Wachstum FLT3 ITD- oder FLT3 TKD- exprimierender Zelllinien.....	23

4.2.3	Wirkung der des Inhibitors Sorafenib auf das Wachstum FLT3 ITD-oder FLT3 TKD- exprimierender Zelllinien.....	24
4.2.4	Wirkung des Inhibitors Sunitinib auf das Wachstum FLT3 ITD- oder FLT3 TKD- exprimierende Zelllinien.....	25
4.3	Sensitivität von FLT3-Mutationen gegenüber Kombinationen von Inhibitoren	26
4.3.1	Wachstumsinhibitorischer Effekt der Kombination von PKC412 und Dasatinib auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positive Zellen.....	27
4.3.2	Wachstumsinhibitorischer Effekt der Kombination von Sorafenib und Dasatinib auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positive Zellen.....	27
4.3.3	Wachstumsinhibitorischer Effekt der Kombination von Sunitinib und Dasatinib auf FLT3 ITD und FLT3 TKD positive Zellen	28
4.4	Die Wirkung von PKC412 und Dasatinib auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positive Zellen im Methylzelluloseassay	30
4.4.1	Der kombinatorische Effekt von PKC412 und BMS auf FLT3 ITD-exprimierende Zellen im Methylzelluloseassay	30
4.4.2	Der kombinatorische Effekt von PKC412 und BMS auf FLT3 TKD-exprimierende Zellen im Methylzelluloseassay	31
4.4.3	Der Effekt von PKC412 und Dasatinib auf humane FLT3 ITD-positive MV4-11- Zellen im Methylzelluloseassay	32
4.4.4	Der kombinatorische Effekt von PKC412 und BMS auf parentale 32D-Zellen im Methylzelluloseassay.....	32
5	Diskussion	34
5.1	Die Signaltransduktion und das onkogene Potential mutierter FLT3-Tyrosinkinasen..	34
5.2	Untersuchung der Sensitivität von FLT3-Mutanten gegenüber einzelnen Tyrosinkinaseinhibitoren	36
5.3	Ansprechen von FLT3 Mutanten auf Kombinationen von Tyrosinkinaseinhibitoren	38
6	Material.....	41
6.1	Chemikalien und biogene Substanzen.....	41
6.2	Medien und Supplemente	42
6.3	Membranen	43
6.4	Antikörper	43
6.5	Verbrauchsmaterialien und molekularbiologische Kitsysteme	44
6.6	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	45
6.7	Standard Geräte	45
6.8	Oligonukleotide.....	46

6.8.1 Sequenzierprimer	46
6.9 DNA-Konstrukte	46
6.10 Tyrosinkinaseinhibitoren.....	47
6.11 Bakterienstämme	47
6.12 Eukaryotische Zelllinien.....	47
6.13 Standard Lösungen und Puffer	48
7 Methoden	51
7.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken	51
7.1.1 Polymerase-Kettenreaktion	51
7.1.2 Restriktionsverdau	52
7.1.3 Dephosphorylierung	52
7.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	52
7.1.5 Gelextraktion	53
7.1.6 Ligation	53
7.2 Arbeiten mit Bakterien	54
7.2.1 Kultivierung von Bakterien.....	54
7.2.2 Transformation	54
7.2.3 Plasmid-Präparation	55
7.2.4 Sequenzierung	56
7.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	56
7.3.1 Kultivierung von Zellen	56
7.3.2 Kryokonservierung von Zellen	56
7.3.3 Auftauen von Zellen.....	57
7.3.4 Bestimmung der Zellzahl	57
7.3.5 Transiente Transfektion	57
7.3.6 Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion	58
7.3.7 Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse).....	60
7.3.8 Selektion mit Puromycin	61
7.3.9 Herstellung von Einzelklonen	61
7.4 Proteinbiochemische Methoden	62
7.4.1 Herstellung von Zelllysaten	62
7.4.2 Proteinbestimmung.....	62
7.4.3 SDS-Gelelektrophorese.....	63
7.4.4 Transfer von Proteinen auf PVDF Membranen (Westernblot).....	64
7.4.5 Immunihistochemischer Nachweis von transferierten Proteinen.....	64

7.5	Biologische Untersuchungen.....	65
7.5.1	Messung der proliferativen Aktivität.....	65
7.5.2	Methylzellulose-Assay	65
8	Literaturverzeichnis	66
9	Abbildungsverzeichnis.....	76
10	Danksagung	78
11	Publikationen.....	79

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha (anti)
β	beta
g	gamma
λ	Wellenlänge
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μmol	10^{-6} Mol
μM ($\mu\text{mol/l}$)	10^{-6} Mol/Liter
Abb.	Abbildung
A. d.	Aqua destillata
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Base
BCR	breakpoint cluster region
BCR-ABL	BCR-ABL-Fusionsprotein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CIAP	alkalische Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase)
CR	konservierte Region (<i>conserved region</i>)
CREB	cAMP-responsive element-binding protein
CSF	colony stimulating factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA

DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
ECD	extrazelluläre Domäne
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extrazellulär regulierte Kinase (extracellular signal regulated kinase)
et al.	et alii
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell scan)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GTP	Guanosin-Triphosphat
Gy	Gray (1 Gy=1 J/kg)
h	human/Stunde
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
Jak	Janus-Kinase
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
ko	knockout
LB	Luria-Bertani
lin	linear
log	logarithmisch
LTR	long terminal repeat
m	murin
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)

MCS	multiple cloning site
mM (mmol/l)	10 ⁻³ Mol/Liter
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
NLS	nukleäre Lokalisierungs-Sequenz
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
nM (nmol/l)	10 ⁻⁹ Mol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase
PH	Pleckstrin Homolog
pH	pondus Hydrogenii
Ph ⁺	Philadelphia-Chromosom positiv
PI	Propidiumiodid
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (3,4)-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidifluorid
pY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
Ras	rat sarcoma protein
RAF	rat fibrosarcoma protein
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
SS	Seitwärtsstreuung (<i>sideward scatter</i>)

SCF	Stammzellefaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH2	Src-homology 2
SH3	Src-homology 3
SHC	src homologous and collagen protein
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
STI	Signaltransduktionsinhibitor
TAE	Tris-Acetat Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Y	Tyrosin

1 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung der Myelopoiese und betrifft vor allem Patienten des höheren Alters in der deutschlandweit ca. 3600 Menschen im Jahr erkranken (Schnittger *et al.*, 2002; Estey und Dohner, 2006; Rowe, 2009).

Insgesamt kann bei allen AML Patienten in 70% der Fällen eine Remission von mehr als 5 Jahren erzielt werden. Wobei die Prognose der Patienten stark von dem AML Subtyp abhängt und von einer Vielzahl an Faktoren beeinflusst wird. Hierzu zählen u.a. Alter, zytogenetische Veränderungen und Mutationen von Proteinen wie der Rezeptortyrosinkinase FLT3 (Frohling *et al.*, 2002; Schlenk *et al.*, 2008).

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 ist ein Protein, das bei ca. 30% aller AML Patienten mutiert vorliegt (Abu-Duhier *et al.*, 2000). Patienten mit einer FLT3 Längenmutation (FLT3 ITD) haben u. a. eine erhöhte Rezidivrate sowie eine erhöhte Anzahl an Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark (Kottaridis *et al.*, 2001; Frohling *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002). Patienten mit Punktmutationen in der Kinasedomäne von FLT3 (FLT3 TKD) besitzen ebenfalls höhere Blastenanteile im peripheren Blut und Knochenmark. Im Gegensatz zu FLT3 ITDs wird die prognostische Bedeutung kontrovers diskutiert und ist Gegenstand von Studien (Moreno *et al.*, 2003; Yanada *et al.*, 2005; Mead *et al.*, 2007; Masson und Ronnstrand, 2009; Kindler *et al.*, 2010).

Grundlegender Bestandteil der Therapie von AML Patienten ist die Chemotherapie, die in zwei Phasen unterteilt wird, die Induktions- und Postremissionsphase (Schlenk *et al.*, 2008; Shipley und Butera, 2009). Die genauen Therapieschemata sind, wie die Prognose, von der Art des AML Subtyps abhängig. Neben der Chemotherapie, bei der Substanzen wie Cytarabin oder Anthracycline wie Danorubicin verwendet werden, kann in Abhängigkeit vom

Patienten eine autologe oder allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden (Rowe und Tallman, 2010).

Aufgrund der klinischen Bedeutung von FLT3 Mutationen untersuchen präklinische und klinische Studien den Effekt von FLT3 spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) (Levis *et al.*, 2002; Grundler *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2005; Cortes, 2009). TKI kommen aktuell vorwiegend in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika bzw. anderen Inhibitoren im Rahmen von Studien zur Anwendung (Cortes, 2009; Fischer *et al.*, 2010; Kindler *et al.*, 2010; Ravandi *et al.*, 2010; Serve, 2010). Dieses Vorgehen ist begründet durch Arbeiten, die zeigen, dass die Kombination von TKI mit konventionellen Chemotherapeutika synergistische Effekte in AML Zell- Tiermodellen hat (Yee *et al.*, 2004; Furukawa *et al.*, 2007; Cortes, 2009; Fischer *et al.*, 2010; Kindler *et al.*, 2010; Ravandi *et al.*, 2010). Des Weiteren zeigte Studien, dass die alleinige Verwendung von TKI gegen FLT3 zwar zu einem klinischen Ansprechen der Patienten führt, dieses jedoch nur von kurzer Dauer ist (Fiedler *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2005; Illmer und Ehninger, 2007).

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist die Evaluation der Wirkung von SRC Inhibitoren alleine und die Kombination von SRC und FLT3 Inhibitoren auf FLT3 ITD oder FLT3 TKD positive Zellen. Diese basiert zum einen auf den Ergebnissen unserer Gruppe, die zeigen, dass SRC ein bedeutsames Signaltransduktionsmolekül in FLT3 ITD positiver AML ist (Leischner *et al.* Manuskript in Vorbereitung); zum anderen auf den bereits angesprochenen Studien, zur Monotherapie mit TKI bei FLT3-Mutations positiven AML Patienten.

Hierzu wurden im ersten Teil der Arbeit FLT3 ITD oder FLT3 TKD exprimierende, murine Zellen und FLT3 ITD-positive, humane MV4-11-Zellen bezüglich ihres Ansprechens auf singuläre FLT3- und SRC-Inhibitoren untersucht.

Der SRC-Inhibitor Dasatinib zeigte Wirkung auf FLT3 ITD jedoch nicht auf FLT3 TKD positive Zellen. Des Weiteren erwiesen sich FLT3 ITD positive Zellen als deutlich sensibler gegenüber dem FLT3-Inhibitor Sunitinib, wohingegen FLT3 TKD-exprimierende Zellen stärker durch PKC412 und Sorafenib in ihrer proliferativen Aktivität gehemmt wurden.

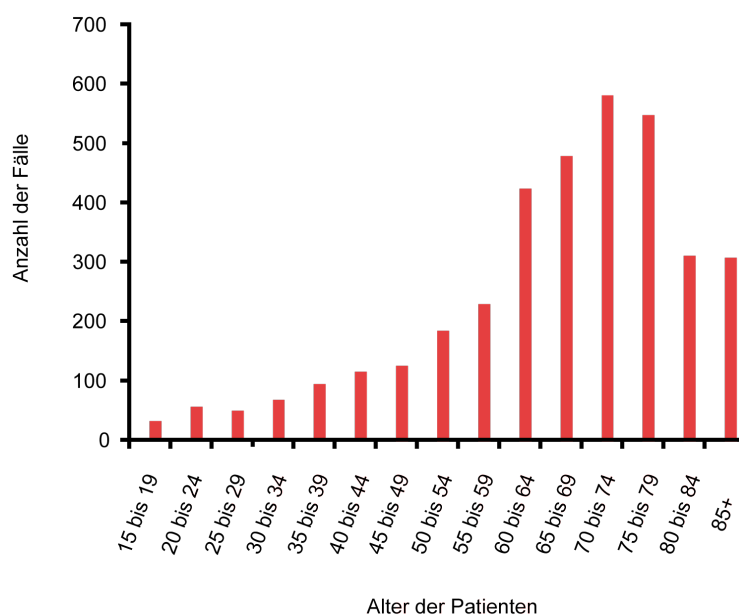
Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden die FLT3-Inhibitoren mit dem SRC-Inhibitor Dasatinib kombiniert und ihre Wirkung auf FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierende Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die Kombination eines FLT3- und eines SRC-Inhibitors additive inhibitorische Effekte auf das Wachstum von FLT3 ITD-positiven Zellen hat. FLT3 TKD exprimierende Zellen hingegen wurden durch die Kombination der Inhibitoren nicht zusätzlich beeinflusst.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse die zentrale Rolle von SRC in der Pathogenese von FLT3 ITD. Des Weiteren zeigen sie, dass die Kombination von FLT3- und SRC-Inhibitoren ein neues potentielles Therapiekonzept in der Behandlung von FLT3 ITD positiven AML Patienten darstellen könnte.

2 Einleitung

2.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) basiert auf einer malignen Transformation von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (Appelbaum, 2001), deren Differenzierung in funktionstüchtige Granulozyten und Monozyten nicht oder nur unvollständig stattfindet. Bei erkrankten Personen führt dies zu Symptomen, die auf die Verdrängung der normalen Knochenmarkzellen durch maligne Tumorzellen zurückzuführen sind. Häufig leiden die Patienten an Symptomen einer Anämie, Thrombozytopenie oder Granulozytopenie, wodurch es u. a. zu erhöhter Infektanfälligkeit kommt (Rowe und Tallman, 2010).



Tab. 1: Altersverteilung von AML Patienten in Deutschland (nach Hellenbrecht A 2003).

Epidemiologisch betrachtet, handelt es sich bei der AML um die häufigste Subform akuter Leukämien im Erwachsenenalter. Die durchschnittliche Inzidenz der Erkrankung liegt bei 2-4 Fällen pro 100.000 Menschen pro Jahr, wobei eine deutliche Zunahme im höheren Alter zu beobachten ist (s. Tab 1) (Buchner *et al.*, 2001).

Nach der World Health Organization (WHO)-Klassifikation (s. Tab. 1) liegt eine akute Leukämie bei einem Blastenanteil von über 20 % im Knochenmark vor (Haferlach und Schoch, 2002). Die French-American-British (FAB)-Klassifikation der AML aus dem Jahr 1976 unterscheidet basierend auf dem Reifungsgrad der Blasten und ihrer hämatopoetischen Linienzugehörigkeit zwischen acht AML-Subtypen (s. Tab. 2) (Bennett *et al.*, 1976; Bennett *et al.*, 1991). Zentrale Rollen nehmen im Rahmen der Klassifikation die Immunophänotypisierung, die morphologischen und die zytochemische Analyse der blastären Zellen ein (s. Tab. 2) (Rowe, 2010).

Ebenfalls von klinischer Bedeutung ist die Analyse chromosomaler Aberrationen aufgrund der Tatsache, dass mittels des Karyotyps von AML-Blasten eine prognostische Einteilung der AML durchgeführt werden kann (Haferlach und Schoch, 2002). So ist die balancierte Translokation t(8;21) oder t(15;17) mit einer guten klinischen Prognose assoziiert, wohingegen der Verlust von Chromosom 5 oder 7 mit einer schlechten Prognose für den Patienten vergesellschaftet ist (Jaffe, 2009). Diese rekurrierenden, genetischen Alterationen in AML-Blasten wurden neben der Zytomorphologie und Zytochemie in die neue WHO-Klassifikation integriert (s. Tab. 2) (Jaffe, 2009).

FAB-Subtyp	WHO-Nomenklatur	Morphologische Definition für alle Subtypen (FAB: \geq 30% Blasten; WHO: \geq 20% Blasten)
M0	AML mit minimaler myeloischer Differenzierung	<ul style="list-style-type: none"> - Anteil MPO-positiver Blasten von $<$3% und - Nachweis myeloischer (CD13, CD33, CD117) bzw. monozytärer (CD14) Antigene mittels Durchflusszytometrie und/oder - Immunologischer Nachweis von MPO und/oder - Elektronenmikroskopischer Nachweis von MPO
M1	AML ohne Ausreifung	<ul style="list-style-type: none"> - 90% Blasten, davon \geq 3% MPO-positiv und - Ausreifende Granulopoese (Promyelozyten bis Segmentkernige) mit oder ohne Monozytenanteil von \leq 10%
M2	AML mit Ausreifung bzw. mit t(8;21) (AML1/ETO)	<ul style="list-style-type: none"> - Maximal 89% Blasten, davon \geq 3% MPO-positiv und - Ausreifende Granulopoese (Promyelozyten bis Segmentkernige) mit oder ohne Monozytenanteil von $>$10% (aber monozytäre Population von $<$20%)
M3	Akute Promyelozytenleukämie	<ul style="list-style-type: none"> - Leukämische Population aus Blasten und abnormen, hypergranulierten Promyelozyten, davon \geq 3% MPO-positiv
M3V	AML mit t(15;17) (PML/RARa)	<ul style="list-style-type: none"> - Wie M3, jedoch Promyelozyten mit feineren Granula bzw. agranulär - Auffällige, lobulierte Kernformen
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	<ul style="list-style-type: none"> - Granulozytäre Komponente (Myeloblasten bis Segmentkernige) von \geq 20% der NEZ-positiven Zellen und - Signifikante (\geq 20%ige) monozytäre Komponente (Monoblasten, Promonozyten bis Monozyten im KM: \geq 20% der NEZ-positiven Zellen; und Monozyten im PB: \geq 5x 10⁹/l) oder - Monoblasten, Promonozyten bis Monozyten im KM: \geq 20% der NEZ-positiven Zellen; und ANAE-Positivität oder erhöhte Konzentration an Lysozym in Urin oder Serum oder - Markbefund wie bei M2 und \geq 5x10⁹Monozyten/l im PB und ANAE-Positivität oder erhöhte Konzentration an Lysozym in Urin oder Serum
M4Eo	AML mit inv16 oder t(16;16) (CBF β /MYH11)	<ul style="list-style-type: none"> - Wie M4, jedoch zusätzlich Nachweis von $>$5% atypischer Eosinophiler im KM
M5A	Akute Monoblastenleukämie	<ul style="list-style-type: none"> - Monozytäre Komponente im KM von \geq 80% der NEZ-positiven Zellen, davon \geq 80% Monoblasten, $<$20% MPO-positiv Zellen und $>$80% unspezifische esterasepositive Zellen
M5B	Akute Monozytenleukämie	<ul style="list-style-type: none"> - Monozytäre Komponente im KM von \geq 80% der NEZ-positiven Zellen, davon $<$80% Monoblasten
M6	Akute Erythroleukämie	<ul style="list-style-type: none"> - Erythropoese von \geq 50% der nukleären Zellen im KM und - Blastenanteil von \geq 30% (bzw. \geq 20%) der NEZ-positiven Zellen (AML MGA) - Erythroblastenanteil $>$80% (reine Erythroleukämie, AML M6B)
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie	<ul style="list-style-type: none"> - Megakaryoblasten MPO-negativ - Immunologischer Nachweis von Plättchenglykoproteinen (CD41, CD61) - Elektronenmikroskopische Untersuchung auf MPO bzw. der Ultrastruktur - WHO-Klassifikation: \geq 50% der leukämischen Blasten müssen der megakaryozytären Linie zuzuordnen sein

Tab.2: Klassifikation der AML

2.1.1 Das *two-hit*-Modell der Entstehung akuter Leukämien

Die Pathogenese der AML ist nach dem aktuellen Wissensstand ein mehrschrittiger Prozess, der unter dem Begriff *two-hit*-Modell zusammengefasst wird. Diese Annahme basiert u. a. auf der Beobachtung, dass die in Patienten gefundenen, genetischen Mutationen im Mausmodell alleine nicht in der Lage sind, eine Leukämie zu induzieren. (Gilliland und Griffin, 2002) Beispielsweise führt weder die Expression von aktiviertem FLT3 (FMS-like tyrosine kinase) (Grundler *et al.*, 2005), noch die Expression des Fusionsproteins AML1/ETO (t(8;21)) zu einer Leukämie im murinen Knochenmarktransplantationsmodell. (Schessl *et al.*, 2005) In Abhängigkeit der Mutationsart induzieren FLT3-Mutationen in Versuchstieren entweder eine myelo- oder eine lymphoproliferative Erkrankung (Grundler *et al.*, 2005).

Basierend auf diesen Ergebnissen wird nach dem gegenwärtigen Modell der AML spezifischen Leukämogenese angenommen, dass im Rahmen der Pathogenese von akuten Leukämien mindestens zwei so genannte „Klassen“ an genetische Alterationen zusammenwirken (s. Abb. 2.1). Klasse I Mutationen bewirken einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Hierzu zählen z.B. aktivierende Mutationen in RAS, FLT3 oder auch KIT (Mizuki *et al.*, 2000). Die zweite Klasse von Mutationen führt zu einer Veränderung der zellulären Differenzierung. Vertreter dieser Gruppe sind u. a. PML/RAR α , AML1/ETO oder HOX-Fusionsgene (Dash und Gilliland, 2001). Erst die Kombination beider Mutationsarten führt zur Entstehung einer Leukämie (Schessl *et al.*, 2005).

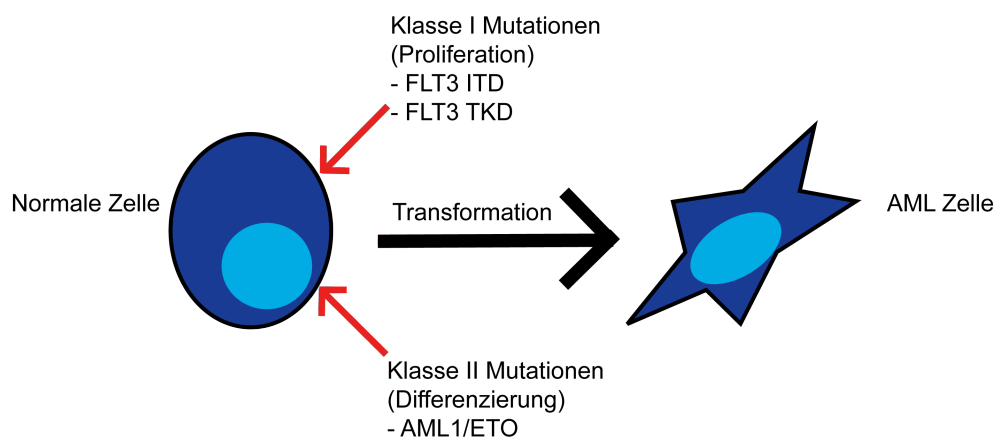


Abb. 2.1: *Two-hit* Hypothese der AML Pathogenese

2.2 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind Transmembran-Proteine, die Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität besitzen. RTKs sind vor allem in der Vermittlung von Wachstums-, Differenzierungs- und Entwicklungssignalen involviert. Bis heute wurden 58 humane RTKs identifiziert, von denen über die Hälfte für die Genese von malignen Tumoren maßgeblich sind (Blume-Jensen und Hunter, 2001).

Ihre Aktivität ist in gesunden Zellen streng reguliert. So liegen die RTKs in Abwesenheit von spezifischen Liganden als Monomere in einer inaktiven Konformation vor. Die Bindung des Liganden führt zur Dimerisierung. Hierdurch wird eine Trans-Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytosmatischen Domäne der Rezeptoren induziert. Dies wiederum führt zur Aktivierung der enzymatischen Aktivität des Rezeptors und Induktion von Signalkaskaden „*downstream*“ des Rezeptorproteins. Unmutierte RTK werden nach der Aktivierung zusammen mit ihrem Liganden internalisiert und degradiert (Polo *et al.*, 2004).

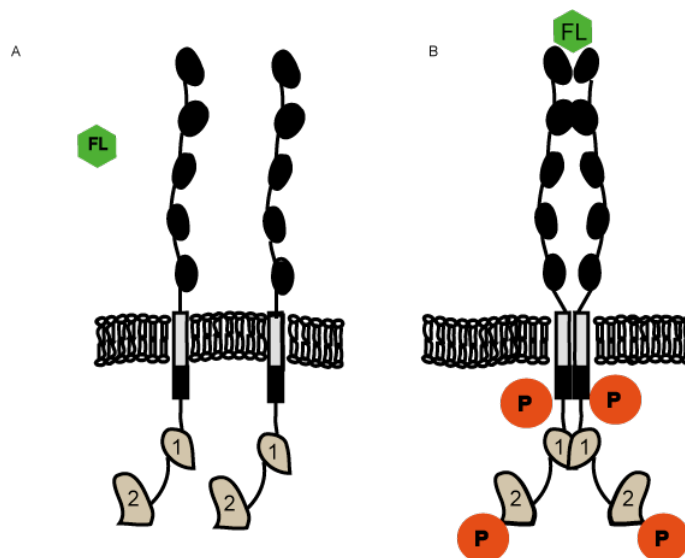


Abb. 2.2: Der Aufbau und die Aktivierung von FLT3.

(A) Schematischer Aufbau von FLT3. (B) Die Bindung des Liganden induziert eine Konformationsänderung, die Dimerisierung und Tyrosin-Phosphorylierung der Rezeptoren. Der aktivierte Rezeptor kann dann weitere Moleküle aktivieren.

Die Struktur der RTK gliedert sich in vier Domänen. Sie weisen neben der Tyrosinkinasedomäne (TKD) und der juxtamembranären (JM) Domäne im Zytoplasma außerdem eine Transmembrandomäne und eine Ligandenbindungsdomäne auf. Diese die Spezifität

des Rezeptors charakterisierende, extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne wird zusammen mit der Sequenz der TKD für die Klassifikation der RTK in die beschriebenen 20 Subfamilien herangezogen (Gilliland und Griffin, 2002).

Die Kinasedomäne ist unter den RTK hoch konserviert (Hanks *et al.*, 1988) und lässt sich in drei Strukturen unterteilen: Die Aktivierungsschleife (*activation loop*, *A-loop*), die ATP-Bindungstasche (*ATP binding pocket*) und die katalytisch aktive Kinaseschleife (*catalytic loop*). In der inaktiven Konformation erfolgt eine Blockierung der ATP-Bindungstasche durch die Aktivierungsschleife. Bei einigen RTK (z. B. FLT3) ist die Kinasedomäne im Vergleich zu anderen RTK durch ein hydrophobes Kinaseinsert (KI) geteilt. Die an die Kinasedomäne anschließende C-terminale Domäne dient durch zahlreiche Autophosphorylierungssequenzen als Interaktionsstelle für Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Des Weiteren besitzt sie eine inhibitorische Funktion (Shewchuk *et al.*, 2000). Den typischen Aufbau von RTKs und deren Aktivierung zeigt Abb. 2.3.

FLT3 gehört zur Familie der Klasse III RTKs, zu denen auch der *macrophage colony-stimulating factor receptor* (FMS), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) α und β und *stem cell factor receptor* (KIT) gehören (Rosnet *et al.*, 1991; Blume-Jensen und Hunter, 2001). Charakteristisch für diese Gruppe der RTK ist die extrazelluläre Domäne, die aus fünf *immunoglobulin like* Domänen besteht. Die Proteine dieser Gruppe besitzen des Weiteren eine durch ein wie oben beschriebenes „Kinaseinsert“ geteilte TKD.

2.2.1 Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese

FLT3 besitzt eine wichtige Funktion in der normalen Hämatopoese und Leukämogenese (Rosnet *et al.*, 1991). Exprimiert wird das Protein hauptsächlich in frühen myeloischen und lymphatischen Zellen im Knochenmark, Thymus und den Lymphknoten. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen geht die FLT3-Expression verloren (Rosnet *et al.*, 1993).

Außerdem ist FLT3 auf 70-90 % der leukämischen Blasten von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) und AML exprimiert (Carow *et al.*, 1996; Rosnet *et al.*, 1996). Die hohe Prozentzahl lässt darauf schließen, dass FLT3 an der onkogenen Transformation in AML-Blasten auf verschiedene Art beteiligt ist. Es wurden sowohl FLT3-Überexpression und autokrine Stimulierung durch FLT3-Ligand (FL) als auch aktivierende Mutationen im FLT3-Gen beobachtet. Diese genetischen Alterationen können bei 27-35 % der AML Patienten nachgewiesen werden und werden aufgrund struktureller und klinischer

Eigenschaften in zwei Gruppen bzw. Klassen unterteilt (Yokota *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2001; Thiede *et al.*, 2002).

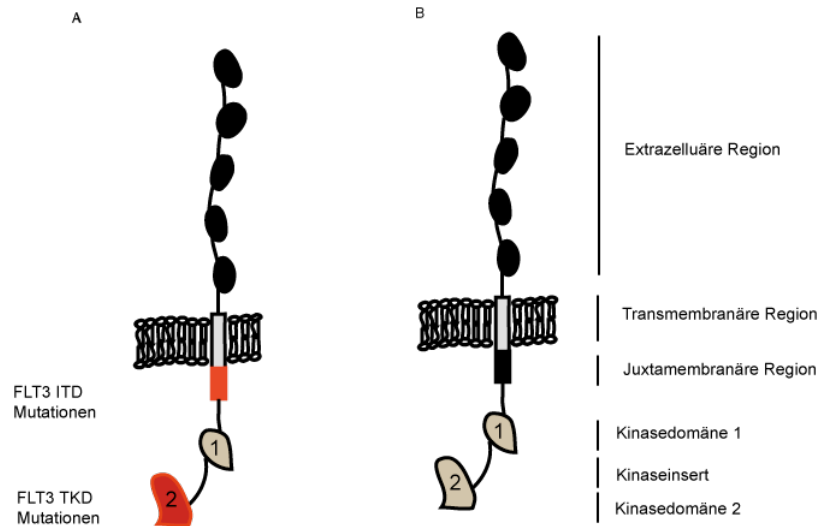


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der FLT3-Struktur und die Lokalisation der zwei häufigsten aktivierenden Mutationen bei AML Patienten.

(A) Die Lokalisation der zwei häufigsten Gruppen von FLT3 Mutationen, die bei Patienten mit AML gefunden werden, sind dargestellt: *internal tandem duplications* in der JM-Domäne und beginnenden TKD (FLT3 ITD) und Punktmutationen in der TKD (FLT3 TKD). (B) Aufbau des physiologisch/unmutierten vorkommenden FLT3.

Die erste Klasse aktivierender Mutationen, die sog. *internal tandem duplication mutations* (ITD), können bei 20-25 % aller AML Patienten nachgewiesen werden und machen die Mehrheit der FLT3- Mutationen aus (s. Abb. 1.3). FLT3 ITD entstehen durch Duplikation eines Fragments der kodierenden Sequenz, das in der Länge von 3 bis ≥ 400 Basenpaaren variieren kann, wobei der Leserahmen aufrechterhalten bleibt (Schnittger *et al.*, 2002).

Die zweite Klasse aktivierender Mutationen kommt mit 7-10 % deutlich seltener vor und bestehen aus Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der TKD von FLT3 (FLT3 TKD). Am häufigsten ist hierbei die Asparaginsäure an Position 835 betroffen (Yamamoto *et al.*, 2001). Neben diesen Klassen von Mutationen wurden weitere Klassen nachgewiesen und charakterisiert. Ein Beispiel hierfür sind Punktmutationen in der juxtamembranären Region des Proteins (Reindl *et al.*, 2006).

Beide Mutationsgruppen führen zur konstitutiven Autophosphorylierung/Aktivierung des Rezeptors und zur Induktion spezifischer Signalwege, u. a. des *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5)- und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweges. Hierdurch kommt es zum liganden-unabhängigen Zellwachstum verschiede-

ner Zelllinien (Mizuki *et al.*, 2000; Abu-Duhier *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Grundler *et al.*, 2005). FLT3 ITD-exprimierendes Knochenmark führt im murinen Knochenmark-Transplantations-Modell zu einer myeloproliferativen Erkrankung, wohingegen FLT3 TKD-transplantierte Tiere eine lymphoide Erkrankung entwickeln (Kelly *et al.*, 2002; Grundler *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005).

2.2.2 FLT3-Inhibitoren

FLT3 ITD-Mutationen sind ein häufig vorkommender, unabhängiger, ungünstiger prognostischer Indikator bei Patienten mit AML unter 65 Jahren und stellen eine viel versprechende Struktur für therapeutische Interventionen dar (Kiyoi *et al.*, 1998; Kottaridis *et al.*, 2001; Thiede *et al.*, 2002).

Die Effektivität der gezielten Inhibition einer onkogenen Kinase und deren Signalübertragung wurde bereits durch den Einsatz des Kinaseinhibitors Imatinib (STI571, Glivec®) bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML), CML-Blastenkrise oder auch im Kontext von soliden Tumoren bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), gezeigt (Druker, 2001; Sawyers *et al.*, 2002). Imatinib inhibiert die zytoplasmatische Kinase ABL und aufgrund dessen auch das für die CML charakteristische Fusionsprotein BCR-ABL. FLT3 hingegen wird aufgrund einer sterischen Hinderung durch ein nicht-konserviertes Phenylalanin (F691) nicht inhibiert (Bohmer *et al.*, 2003).

Basierend auf diesen Erfolgen in der CML-Therapie erfolgte eine intensive Suche nach potentiellen FLT3-RTK-Inhibitoren (Weisberg *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004). Jedoch hat bis heute noch keine Verwendung in der routinemäßigen Therapie von AML Patienten mit FLT3-Mutationen gefunden.

Aufgrund der beschriebenen *two-hit*-Hypothese und der Ergebnisse aktueller Studien (Stone *et al.*, 2005) ist davon auszugehen, dass die alleinige Inhibition von FLT3 für eine erfolgreiche Therapie nicht ausreichend sein wird, sondern vielmehr die Kombination unterschiedlicher Therapieansätze.

2.3 Tyrosinkinaseinhibitoren

Mutationen oder die Überexpression von Kinasen, die eine bedeutsame physiologische Funktion im Rahmen der Regulation des Zellwachstums spielen, werden mit verschiedenen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (Hanahan und Weinberg, 2000;

Yeatman, 2004), deshalb sind diese Proteine von starkem Interesse für die Entwicklung neuer effektiver Krebsmedikamente. Diese Kinaseinhibitoren, deren prominentester Vertreter der Wirkstoff Imatinib ist, stellen potente Werkzeuge in der zielgerichteten Krebstherapie dar. In der vorliegenden Arbeit werden die folgenden Tyrosinkinaseinhibitoren alleine oder in Kombination verwendet:

- PKC412 (Midostaurin)
- Dasatinib (Sprycel)
- Sorafenib (Nexavar)
- Sunitinib (Sutent)

2.3.1 PKC412 (Midostaurin)

PKC412 ist ein oral verabreichtes Benzoylstauosporin, das u. a. als *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)- und Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor entwickelt wurde und sowohl KIT als auch FLT3 hemmt (Weisberg *et al.*, 2002; Grundler *et al.*, 2003). Eine Phase-II-Studie mit AML-Patienten, die eine FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-Mutation aufwiesen und entweder rezidiert oder nicht für eine Chemotherapie geeignet waren, zeigte viel versprechende Ergebnisse. In 14 von 20 behandelten Patienten reduzierte sich die Anzahl der peripheren Blasten und in 5 Patienten die Anzahl der Blasten im Knochenmark um mehr als 50 % (Stone *et al.*, 2005). Des Weiteren zeigte sich 24 Stunden nach der ersten Gabe von PKC412 eine Abnahme der FLT3-Autophosphorylierung in 75 % der AML-Blastenproben. Aktuell wird PKC412 noch nicht routinemäßig zur Therapie von AML-Patienten eingesetzt, sondern ist vielmehr Gegenstand klinischer Studien (NCT00977782).

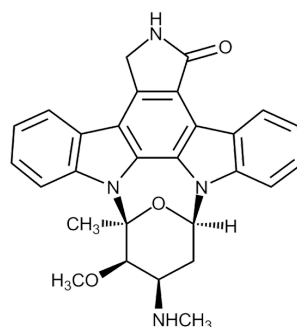


Abb. 2.4: Strukturformel von PKC412

2.3.2 BMS 354-286 (Dasatinib)

Dasatinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor (s. Abb. 1.5), der antiproliferativ und proapoptisch auf Zellen von hämatologischen und soliden Tumoren wirkt (Roszkiewicz *et al.*, 2009).

Hauptzielstrukturen sind vor allem die Fusionskinase BCR-ABL und SRC-Kinasen, Proteine denen eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie (CML) nachgewiesen werden konnten (König *et al.*, 2008; Guerrouahen *et al.*, 2009). In der Behandlung von Patienten ist Dasatinib aktuell zur Anwendung in der in der *first-line*-Therapie von CML-Patienten und bei Patienten mit Philadelphia-Chromosom positiver akuter lymphatischer Leukämie (Ph⁺ ALL) zugelassen (Quintas-Cardama *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010).

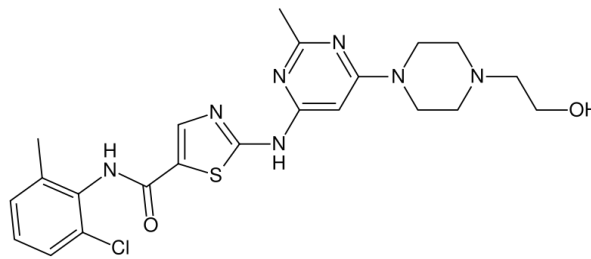


Abb. 2.5: Strukturformel von Dasatinib

2.3.3 Sorafenib (Nexavar)

Sorafenib ist ein Multikinaseinhibitor, der seine wachstumshemmende Wirkung auf Tumorzellen durch die Inhibition von konstitutiv aktivierten Kinasen entfaltet, z. B. von RAS- oder RAF-Kinasen oder auch von aktivierten RTK (wie FLT3) (Wilhelm *et al.*, 2004). Chemisch gehört Sorafenib zu den Bis-Aryl-Harnstoffverbindungen (s. Abb. 1.6) und wurde ursprünglich als RAF-Kinasehemmer entwickelt. Aufgrund seines breiten Wirkspektrums wurde Sorafenib bereits in einer Anzahl Phase I- und Phase II-Studien verschiedener Tumorerkrankungen getestet (Strumberg, 2005; Motzer *et al.*, 2006). Zum heutigen Zeitpunkt ist Sorafenib für die *second-line*-Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen.

In der Therapie von AML Patienten wird Sorafenib aktuell nur in klinischen Studien verwendet. Vor allem für Patienten mit einer Mutation in FLT3 verspricht man sich aufgrund der hohen Affinität von Sorafenib gegenüber der Rezeptortyrosinkinase FLT3 einen positiven Effekt auf das *outcome* der Patienten (Auclair *et al.*, 2007; Kancha *et al.*, 2007).

Erste Studien ergaben, dass Sorafenib als Monotherapie nicht ausreichend ist, um die Patienten zu heilen (Metzelder *et al.*, 2009). Deshalb wird derzeit in einer multizentrischen Phase II Studie die Kombination von Sorafenib mit konventionellen Chemotherapeutika wie Cytarabin und Daunorubicin überprüft (Klinische Studie: NCT00875745) (Ravandi *et al.*, 2010).

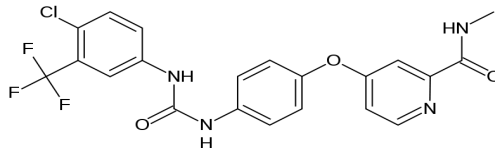


Abb. 2.6: Strukturformel von Sorafenib

2.3.4 Sunitinib (Sutent)

Sunitinib ist ein Rezeptortyrosinkinaseinhibitor (s. Abb. 1.6), der ein breites Wirkspektrum aufweist (Ikezoe *et al.*, 2006). Die Wirkung äußert sich vor allem in einer Inhibition der Tumorzellproliferation und Neoangiogenese bei den behandelten Patienten (Fiedler *et al.*, 2005). Aktuell wird Sunitinib für die Behandlung von Imatinib-resistenten GIST Tumoren und in der Erstlinientherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms verwendet (Faivre *et al.*, 2006).

Für die Behandlung der AML ist vor allem die hohe Affinität von Sunitinib an die Rezeptortyrosinkinase FLT3 von große Bedeutung. Klinische Studien konnten zeigen, dass durch die Gabe von Sunitinib der Phosphorylierungsgrad von FLT3 deutlich verringert werden konnte, wobei diese Wirkung bei mutiertem FLT3 (FLT3 ITD) deutlich stärker ausgeprägt war als bei unmutiertem FLT3 (Ikezoe *et al.*, 2006).

Auf zellulärer Ebene bewirkte Sunitinib in einer klinischen Phase-I-Studie mit Patienten, die an einer refraktären AML erkrankt waren, eine partielle Remission. Aufgrund der zeitlich beschränkten Dauer der Remission wird angenommen, dass das Ausmaß und die Dauer der Remission durch die Kombination von Sunitinib und konventionellen Chemotherapeutika wie Cytarabin oder Danorubicin erhöht werden kann (Yee *et al.*, 2004; Fiedler *et al.*, 2005).

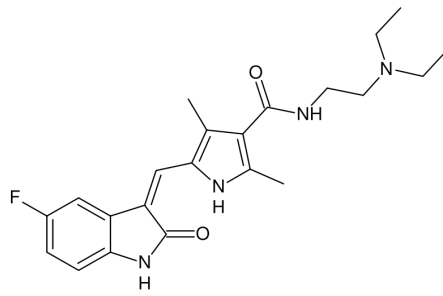


Abb. 2.7: Strukturformel von Sunitinib

3 Aufgabenstellung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine seltene maligne neoplastische Erkrankung der Hematopoese (Lowenberg *et al.*, 1999). Im Rahmen aktueller klinischer Studien werden AML Patienten mit unterschiedlichen Dosierungen und Kombinationen etablierter Wirkstoffe (Danorubicin oder Cytarabin) bzw. neuer Medikamente behandelt (Sorafenib oder PKC412) (Furukawa *et al.*, 2007; Mollgard *et al.*, 2008). Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte gilt die Knochemarktransplantation immer noch als wirkungsvollste kurative Therapieform für AML Patienten (Cassileth *et al.*, 1998; Chantry *et al.*, 2006; Burnett *et al.*, 2011). Jedoch ist diese Therapieform mit Risiken verbunden und nicht für jeden Patienten durchführbar, weshalb die Entwicklung neuer Therapieansätze von medizinischer Bedeutung für AML Patienten ist.

Ein Protein, dem eine zentrale Rolle in der Leukämogenese von AML Patienten zugeordnet wird, ist die Rezeptortyrosinkinase FLT3 (Gilliland und Griffin, 2002). Mutationen dieses Proteins können bei 30 % der AML Patienten nachgewiesen werden (Thiede *et al.*, 2002). Diese Veränderungen von FLT3 können in zwei Gruppen unterteilt werden, hierbei unterscheidet man zwischen Längenmutationen in der juxtamembranären Domäne des Proteins (sog. FLT3 ITD Mutationen) und Punktmutationen in der Kinasedomäne von FLT3 (FLT3 TKD).

Des Weiteren konnten wir im Rahmen einer weiteren Publikation zeigen, dass die Tyrosinkinase SRC eine bedeutsame Rolle in der Signaltransduktion von FLT3 ITD spielt (Leischner *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

Basierend auf dieser Grundlage, soll im ersten Teil dieser Arbeit das Ansprechen von FLT3 ITD- und FLT3 TKD-Mutationen auf die Inhibitoren PKC412, Sorafenib und Sunitinib und dem SRC-Inhibitor Dasatinib untersucht werden. Im zweiten Teil erfolgt die Evaluation des Effekts von FLT3-Inhibitoren in Kombination mit dem SRC-Inhibitor Dasatinib.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika von FLT3-Mutationen

4.1.1 Konstitutive Aktivierung der mutierten FLT3-Proteine

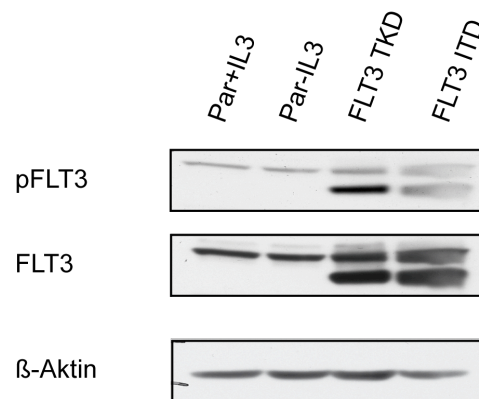


Abb. 4.1: FLT3 ITD und FLT3 TKD Mutationen führen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors.

Um im Vorfeld der geplanten Experimente die Expression und Funktionalität der verwendeten MIG FLT3 ITD- und MIG FLT3 TKD-Konstrukte zu überprüfen, wurden murine 32D-Zellen retroviral transduziert und anschließend analysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließendem Westernblot (WB) wurde neben der Expression der FLT3-Mutanten auch deren Phosphorylierung mittels eines phosphospezifischen Antikörpers untersucht. Es zeigte sich analog zu Ergebnissen anderer Arbeiten eine deutlich stärkere Phosphorylierung der FLT3 TKD-Mutante im Vergleich zu FLT3 ITD (s. Abb. 4.1) (Choudhary *et al.*, 2005; Grundler *et al.*, 2005).

4.1.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 durch FLT3-Mutanten

Neben der Rezeptorphosphorylierung kann auch die Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen als Marker für die Funktionalität der Konstrukte angesehen werden.

FLT3 ITD induzierte gegenüber FLT3 TKD eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5. Des Weiteren wurden die etablierten Zielmoleküle von FLT3 ITD und FLT3 TKD untersucht (Gilliland und Griffin, 2002; Grundler *et al.*, 2005). ERK1/2 und AKT wurden sowohl von FLT3 ITD als auch von FLT3 TKD phosphoryliert (s. Abb. 4.2).

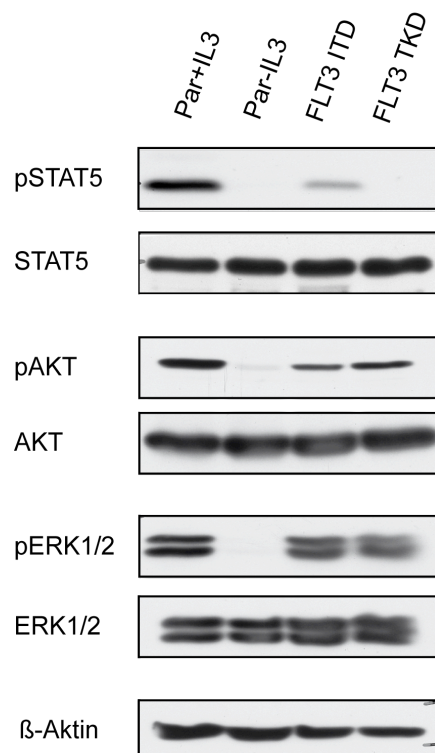


Abb. 4.2: Der Transkriptionsfaktor STAT5 wird durch FLT3 ITD jedoch nicht durch FLT3 TKD aktiviert.

4.1.3 Faktorunabhängige Proliferation von FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierenden Zellen

Die bisherigen Experimente zeigen, dass sowohl die FLT3 ITD- als auch die FLT3 TKD-Mutante des FLT3-Rezeptors bei Überexpression in 32D-Zellen konstitutiv autophosphoryliert vorliegen und zur Aktivierung promotogener Signalkaskaden führen (pAKT

und pERK1/2). Um den biologischen Effekt der zu untersuchenden Inhibitoren auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positive Zellen genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der MTT-Assay verwendet. Mit Hilfe dieses Assays kann die proliferative Aktivität von Zellen bestimmt werden.

Im Rahmen eines Vorversuchs wurden 32D-Zellen retroviral mit den FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-Konstrukten transduziert und die proliferative Aktivität nach 0, 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. Die Expression von FLT3 ITD und FLT3 TKD führte zu einem wachstumsfaktorunabhängigen Wachstum von murinen myeloiden 32D Zellen. Während kein signifikanter Unterschied zwischen IL3-stimulierten parentalen und FLT3 ITD-exprimierende 32D-Zellen zu beobachten war, war im Gegensatz hierzu die bei FLT3 TKD-Zellen gemessene proliferative Aktivität deutlich geringer.

Auch die humane, FLT3 ITD-positive MV4-11 Zelllinie wurde bezüglich ihrer Proliferation untersucht. Diese Zellen zeigten ein wachstumsfaktorunabhängiges Wachstum über 72 Stunden, jedoch proliferierten diese Zellen deutlich langsamer als die FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierenden 32D-Zellen (s. Abb. 4.3).

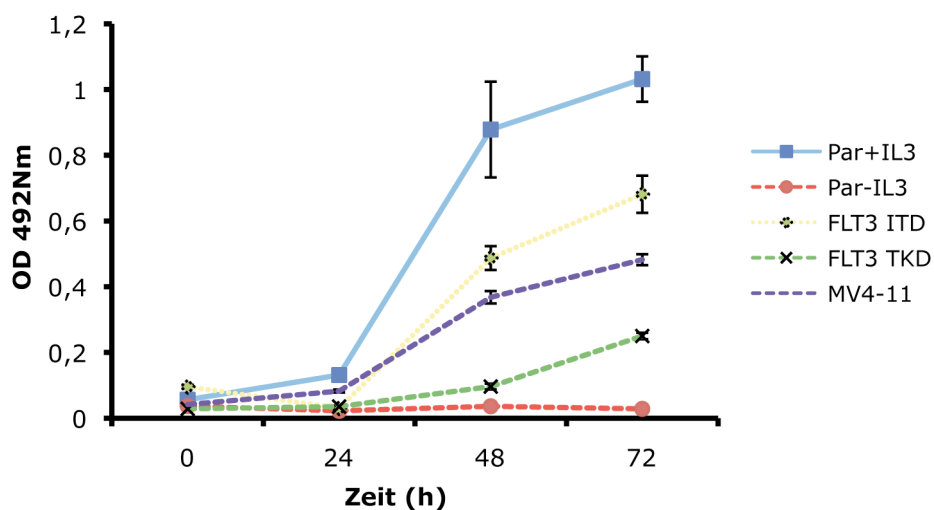


Abb. 4.3: Proliferation unterschiedlicher FLT3 Mutanten in 32D oder MV4-11 Zellen (FLT3 ITD positiv).

4.2 Sensitivität von FLT3 Mutationen gegenüber einzelner Inhibitoren

4.2.1 Wirkung des Inhibitors PKC412 auf das Wachstum FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierender Zelllinien

Das Staurosporin-Derivat PKC412 wurde zur Inhibition der Proteinkinase C entwickelt (Meyer *et al.*, 1989). In weiteren Studien bewies die Substanz zusätzlich eine inhibitorische Wirkung auf Mitglieder der Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen einschließlich FLT3 (Fabbro *et al.*, 2000; Weisberg *et al.*, 2002).

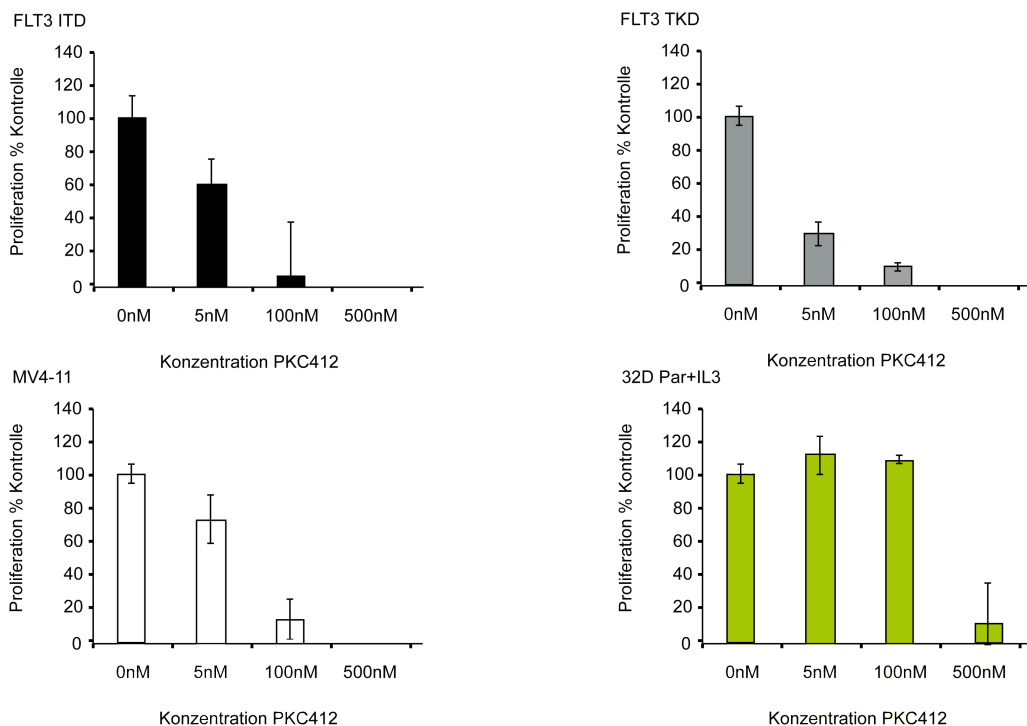


Abb. 4.4: Einfluss des Inhibitors PKC412 auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.

Wie Abb. 4.4 zeigt, weisen unterschiedliche FLT3 Mutanten diskrepantes Ansprechen auf den Inhibitor PKC412 auf. FLT3 TKD-exprimierende Zellen sind im Vergleich zu FLT3 ITD-positiven 32D- oder MV4-11-Zellen deutlich sensibler gegenüber PKC412. Um generelle, zytotoxische Effekte des Inhibitors auszuschließen, wurden IL3-stimulierte, parentale 32D-Zellen mit identischen PKC412-Konzentrationen behandelt. Konzentrationen von bis zu 100 nM hatten hierbei keinen wachstumsinhibitorischen Effekt.

4.2.2 Wirkung des Inhibitors Dasatinib auf das Wachstum FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierender Zelllinien

Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, ist Dasatinib ein Tyrosinkinaseinhibitor, der neben der Tyrosinkinase BCR-ABL auch SRC inhibiert (Chu *et al.*, 2006). Da SRC eine spezifische Rolle in der Signaltransduktion von FLT3 ITD spielt (Leischner *et al.* Manuskript in Vorbereitung), sollte in diesem Teil der Arbeit der Effekt von Dasatinib auf das zytokinunabhängige Wachstum FLT3 ITD-positiver Zellen untersucht werden.

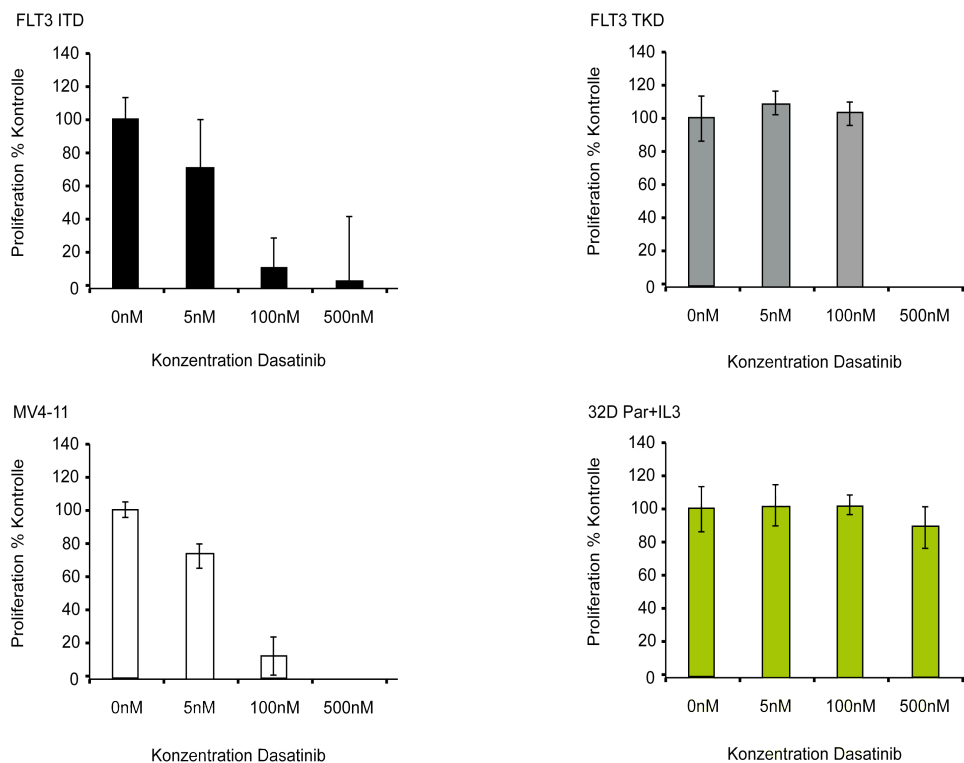


Abb. 4.5: Einfluss des Inhibitors Dasatinib auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.

Im Proliferationsassay zeigte sich nach 48 Stunden eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation von FLT3 ITD-exprimierenden murinen 32D- und humanen MV4-11-Zellen. Hingegen wurden FLT3 TKD-exprimierende und parentale 32D-Zellen nicht in ihrer Proliferation beeinflusst.

4.2.3 Wirkung der des Inhibitors Sorafenib auf das Wachstum FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierender Zelllinien

Sorafenib ist ein Multikinaseinhibitor, der seine wachstumshemmende Wirkung auf Krebszellen durch die Inhibition konstitutiv aktivierter Kinasen wie RAS- oder RAF-Kinasen oder auch von aktivierten RTK (wie FLT3) entfaltet (Auclair *et al.*, 2007; Kancha *et al.*, 2007).

Um die Wirkung von Sorafenib gegenüber unterschiedlichen FLT3-Mutanten zu untersuchen, wurden FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierende 32D-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors kultiviert. Es zeigte sich für FLT3 ITD-positive Zellen eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor, diese bewirkte eine starke Reduktion der proliferativen Aktivität von >50 % bereits bei einer Konzentration von 5 nM. FLT3 TKD-Zellen sprachen deutlich schwächer auf diesen Inhibitor an.

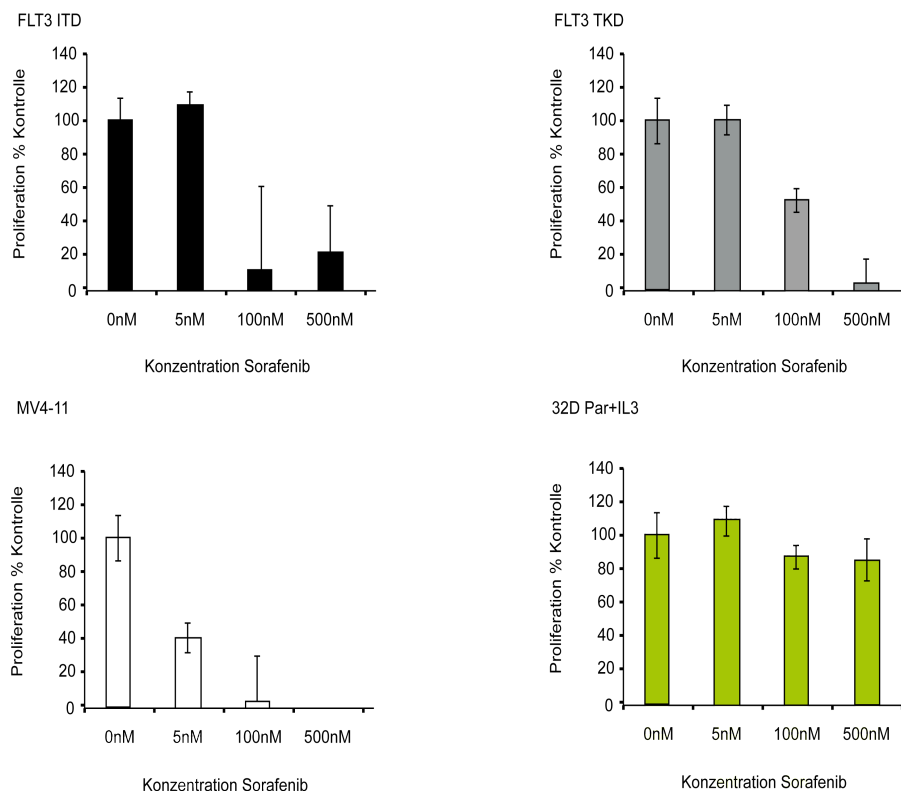


Abb. 4.6: Einfluss des Inhibitors Sorafenib auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.

Erst ab einer Konzentration von 125 nM war eine Reduktion der proliferativen Aktivität um 50 % zu beobachten.

FLT3 ITD-positive MV4-11-Zellen zeigten ein vergleichbares Ansprechen wie die murinen FLT3 ITD 32D-Zellen. Bei dieser Zelllinie führte der Inhibitor Sorafenib bei einer Konzentration von 5 nM zu einer Reduktion der proliferativen Aktivität von >50 %.

Um auszuschließen, dass es sich um einen unspezifischen, zytotoxischen Effekt des Inhibitors handelte, wurden IL3-stimulierte parentale 32D-Zellen mit steigenden Inhibitorkonzentrationen behandelt. Hierbei zeigte sich eine Reduktion von ca. 10 % auf die proliferative Aktivität bei Konzentrationen, die bei FLT3-Mutanten exprimierenden Zellen eine Reduktion der proliferativen Aktivität von mehr als 95 % bewirkten.

4.2.4 Wirkung des Inhibitors Sunitinib auf das Wachstum FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierende Zelllinien

Sunitinib ist ein Rezeptortyrosinkinaseinhibitor mit einem breiten Spektrum an Zielproteinen, zu denen u. a. FLT3 gehört (Kancha *et al.*, 2007). Die in Abb. 4.7 dargestellten Experimente stellen das Ansprechen unterschiedlichen FLT3 Mutationen in verschiedenen murinen oder humanen Zelllinien dar.

Im Gegensatz zu anderen Inhibitoren zeigten FLT3 TKD und ITD mit diesem Inhibitor inverses Ansprechen auf die Behandlung über 48 Stunden. Bereits bei einer Konzentration von 5 nM zeigten FLT3 TKD-positive Zellen eine Reduktion von 50 % hinsichtlich ihrer proliferativen Aktivität, wohingegen FLT3 ITD-positive Zellen erst bei Sunitinib-Konzentrationen von 12,5 nM signifikant (>50 %) in ihrer proliferativen Aktivität reduziert wurden. Diese Beobachtungen konnten bei Verwendung humaner FLT3 ITD-positiver MV4-11-Zellen bestätigt werden.

Als Kontrolle wurden IL3-stimulierte, parentale 32D-Zellen mit Sorafenib behandelt. Hierbei zeigte sich, dass der Inhibitor bis zu einer Konzentration von 500 nM keinen inhibitorischen Effekt auf die proliferative Aktivität parental Zellen besitzt. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachteten wachstumsinhibitorischen Effekte auf die FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-positiven Zellen nicht zytotoxischer Natur sind, sondern auf die Inhibition von FLT3 zurück zu führen sind.

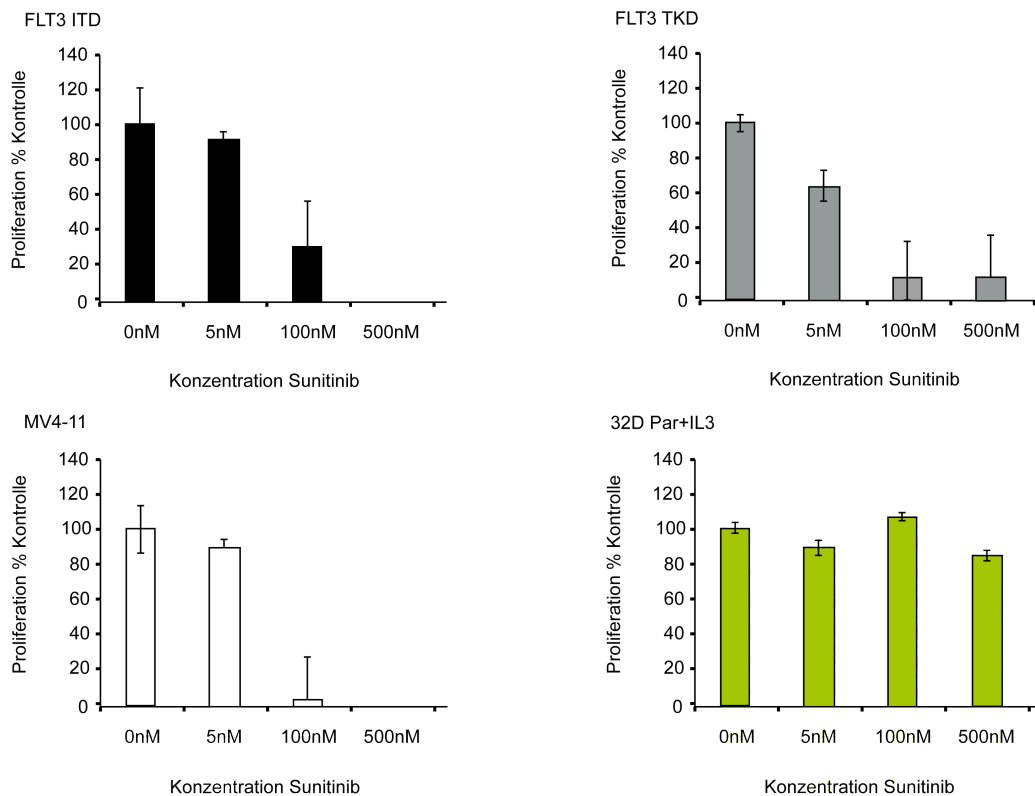


Abb. 4.7: Einfluss des Inhibitors Sunitinib auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.

4.3 Sensitivität von FLT3-Mutationen gegenüber Kombinationen von Inhibitoren

Aktuelle klinische Studien belegen, dass im Allgemeinen die Kombination von Chemotherapeutika einer Monotherapie bezüglich des Behandlungserfolgs überlegen sind (Ravandi *et al.*; Furukawa *et al.*, 2007). Basierend auf diesen Erkenntnissen, sollte im nächsten Schritt dieser Arbeit der Effekt von Inhibitorkombinationen evaluiert werden. Hierzu erfolgte die Kombination eines FLT3-Inhibitors (PKC412, Sorafenib oder Sunitinib) mit dem SRC-Inhibitor Dasatinib.

Die Auswertung des biologischen Effekts der Inhibitoren erfolgte mittels des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Assays nach 48 Stunden Kultivierung in Medium mit den angezeigten Inhibitorkonzentrationen.

4.3.1 Wachstumsinhibitorischer Effekt der Kombination von PKC412 und Dasatinib auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positive Zellen

s. Leischner et al., Manuskript in Vorbereitung.

4.3.2 Wachstumsinhibitorischer Effekt der Kombination von Sorafenib und Dasatinib auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positive Zellen

Die Inhibitoren Sorafenib und Dasatinib besitzen wie in Kap. 4.2.2 demonstriert in singularer Anwendung unterschiedlich starke Wirkung gegenüber den FLT3-Mutationen FLT3 ITD und FLT3 TKD. Dies konnte in verschiedenen Zellsystemen reproduziert werden. Aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeiten wird davon ausgegangen, dass beide Inhibitoren an unterschiedlichen Punkten der Signaltransduktion von FLT3 angreifen.

Im Falle von Dasatinib handelt es sich um SRC-Kinasen wohingegen Sorafenib direkt das FLT3-Protein inhibiert (Kancha *et al.*, 2007; Metzelder *et al.*, 2009). Um die Wirkung der Inhibitorkombination zu evaluieren, wurden die jeweiligen Zellen mit den angezeigten Inhibitorkonzentrationen für 48 Stunden inkubiert und danach bezüglich ihrer proliferativen Aktivität mittels des MTT-Assays analysiert.

Es zeigte sich hierbei, dass die Kombination von Sorafenib und Dasatinib einen additiven Effekt auf FLT3 ITD-positive Zellen besitzt. Dass es sich hierbei um einen zelllinienspezifischen Effekt für 32D-Zellen handelt, konnte ausgeschlossen werden, da derselbe Effekt auch in humanen MV4-11-Zellen nachgewiesen werden konnte. Auf FLT3 TKD-exprimierende Zellen hingegen zeigte die Kombination der beiden Inhibitoren keinen additiven inhibitorischen Effekt.

Um einen zytotoxischen Effekt der Substanzkombination auszuschließen, wurden die Zellen zum einen mit äquivalenten Konzentrationen an DMSO behandelt und zum anderen mit IL3 stimuliert. In diesen Experimenten zeigte sich keine Verringerung in der Proliferationsaktivität durch die Kombination beider Substanzen.

Des Weiteren konnte der hemmende Effekt der Inhibitoren durch IL3-Stimulation aufgehoben werden.

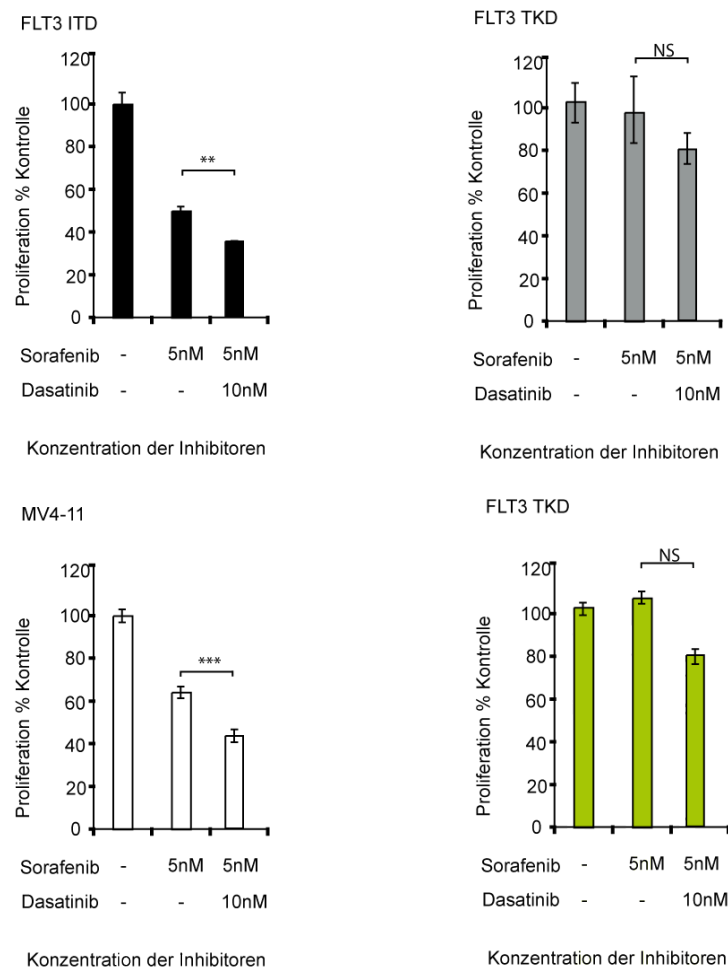


Abb. 4.8: Einfluss der Kombination von Sorafenib und Dasatinib auf FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-positive Zellen.

Die statistische Analyse erfolgte mittels des Students t-Test (NS (nicht signifikant) = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

4.3.3 Wachstumsinhibitorischer Effekt der Kombination von Sunitinib und Dasatinib auf FLT3 ITD und FLT3 TKD positive Zellen

Die TKI Sunitinib und Dasatinib zeigen unterschiedliche Effizienz gegenüber FLT3-Mutationen (s. Kap. 4.2), wobei dies in verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen werden konnte. Beide Inhibitoren besitzen unterschiedliche Zielstrukturen (Ikezoe *et al.*, 2006; Talpaz *et al.*, 2006; Kancha *et al.*, 2007). Aufgrund der Ergebnisse wurde in diesem Teil der Arbeit die Wirkung der Kombination beider Inhibitoren auf die proliferative Aktivität der Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit den angezeigten Inhibitorkonzentrationen für 48 Stunden inkubiert und danach die proliferative Aktivität mittels des MTT-Assays analysiert. Die erhaltenen Daten zeigten, dass die Kombination von Sunitinib und Dasatinib einen

additiven Effekt auf FLT3 ITD-positive humane und murine Zellen besitzt. Auf FLT3 TKD-exprimierende Zellen hingegen zeigte die Kombination der beiden Inhibitoren keinen additiven inhibitorischen Effekt. Um einen zytotoxischen Effekt der Substanzkombination auszuschließen, wurden diese zusätzlich bei IL3-stimulierten und mit DMSO behandelten Zellen verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte nur eine geringe Verringerung der Proliferationsaktivität durch die Kombination beider Substanzen beobachtet werden.

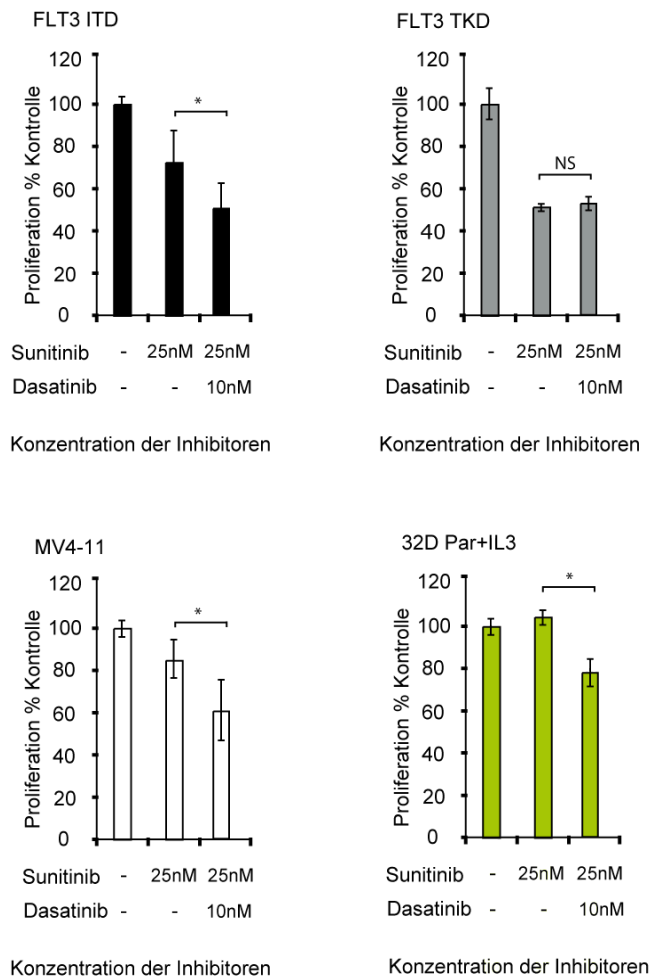


Abb. 4.9: Einfluss der Kombination von Sunitinib und Dasatinib auf FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-positive Zellen.

Die statistische Analyse erfolgte mittels des Students t-Test (NS (nicht signifikant) = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

4.4 Die Wirkung von PKC412 und Dasatinib auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positive Zellen im Methylzelluloseassay

Um den antiproliferativen Effekt von Substanzen auf zellulärer Ebene zu testen, gibt es neben dem in den vorherigen Experimenten verwendeten MTT-Assay den sog. Methylzelluloseassay. Dieser Assay ermöglicht eine Aussage über den Effekt des verwendeten Inhibitors mittels der Bestimmung von Kolonien, die in der Methylzellulose unter bestimmten Inhibitorkonzentrationen wachsen.

4.4.1 Der kombinatorische Effekt von PKC412 und BMS auf FLT3 ITD-exprimierende Zellen im Methylzelluloseassay

5000 FLT3 ITD-exprimierende 32D Zellen wurden für 120 Stunden mit den angezeigten Konzentrationen von PKC412 und Dasatinib in Methylzellulose kultiviert und die Zahl der Kolonien manuell ausgezählt. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der Kolonieanzahl durch die singulären Inhibitoren. Die Kombination beider Substanzen hatte einen zusätzlichen additiven wachstumsinhibitorischen Effekt auf die Zellen, d.h. die Anzahl der Kolonien wurden deutlich um 20 % verringert. (s. Abb. 4.10).

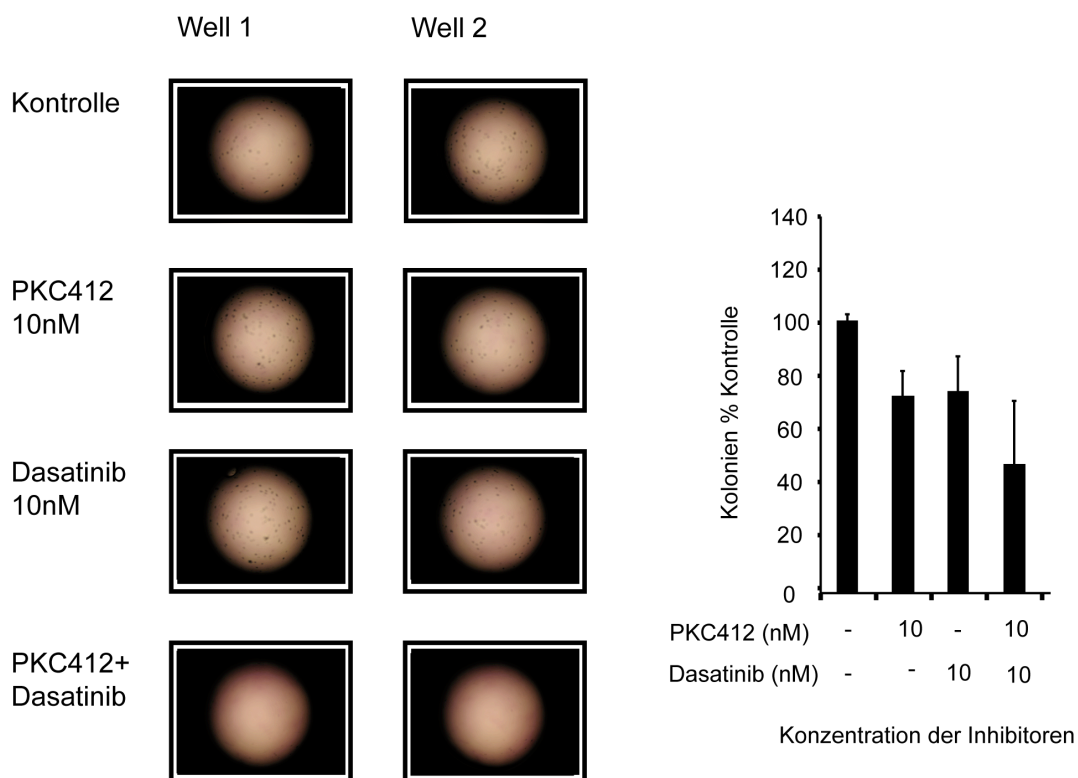


Abb. 4.10: Koloniebildung FLT3 ITD-positiver muriner 32D-Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.

4.4.2 Der kombinatorische Effekt von PKC412 und BMS auf FLT3 TKD-exprimierende Zellen im Methylzelluloseassay

5000 FLT3 TKD-exprimierende Zellen wurden in Methylzellulose ausplattiert und mit den angezeigten Inhibitorkonzentrationen behandelt. Bei dieser Mutationsgruppe zeigte sich keine Wirkung des Inhibitors Dasatinib bei einer Konzentration, die bei FLT3 ITD positiven Zellen bereits eine deutliche Reduktion der Kolonienzahl zu beobachten war. Hingegen war eine stärkere Reduktion der Kolonienzahl durch die Substanz PKC412 zu beobachten. Diese Ergebnisse entsprechen der Beobachtung aus den MTT-Daten, in denen ebenfalls eine höhere Sensitivität der FLT3 TKD Zellen gegenüber dem Inhibitor PKC412 zu beobachtet werden konnte (s. Kap. 4.2.1).

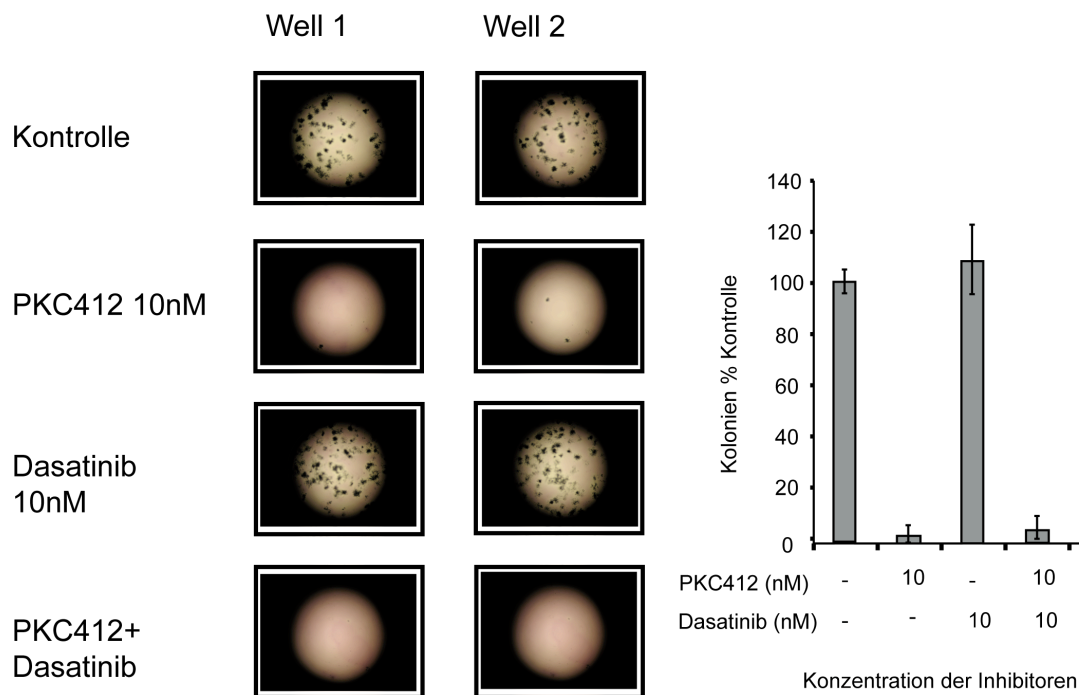


Abb. 4.11: Koloniebildung FLT3 TKD-positiver muriner 32D-Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.

4.4.3 Der Effekt von PKC412 und Dasatinib auf humane FLT3 ITD-positive MV4-11-Zellen im Methylzelluloseassay

Im nächsten Schritt wurden humane FLT3 ITD-positive Zellen verwendet um zu überprüfen, inwiefern der additive inhibitorische Effekt von Dasatinib und PKC412, den man bei murinen Zellen beobachten konnte, auf humane Zellen übertragbar war. Hierzu wurden 5000 MV4-11-Zellen in Methylzellulose ausplattiert und den angezeigten Konzentrationen der Inhibitoren exponiert. Nach 120 Stunden wurden die Kolonien gezählt.

Die einzelnen Inhibitoren PKC412 und Dasatinib alleine bewirkten eine deutliche Reduktion der Kolonien um 20 % (PKC412) und 25 % (Dasatinib). In Kombination zeigte sich eine Verstärkung des inhibitorischen Effekts um 35 % (s. Abb. 4.12).

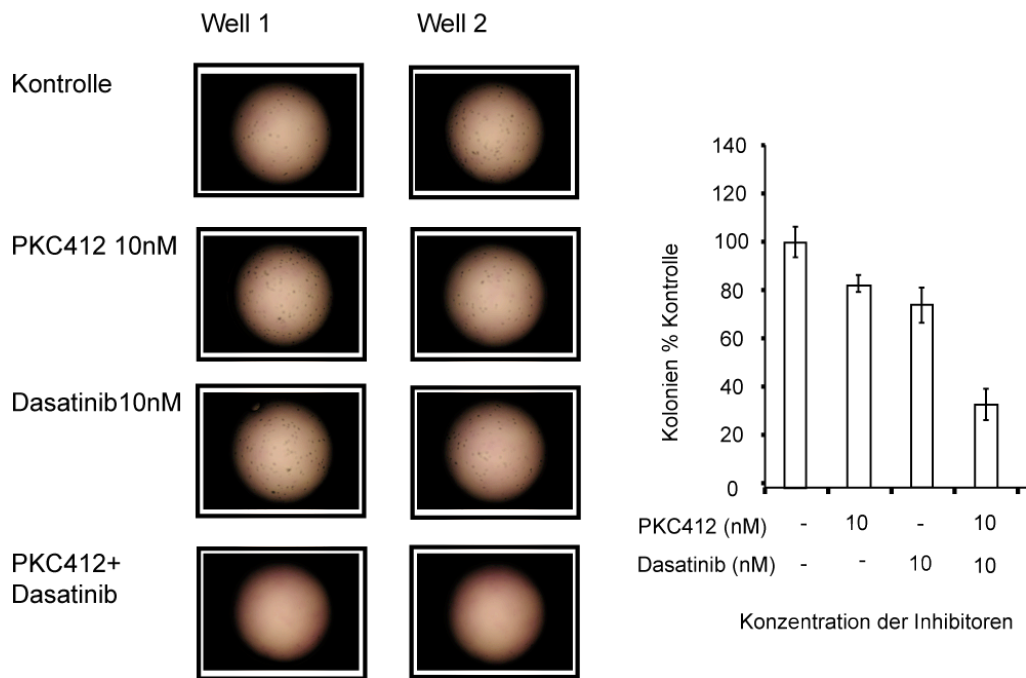


Abb. 4.12: Koloniebildung FLT3 ITD-positiver humaner MV4-11 Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.

4.4.4 Der kombinatorische Effekt von PKC412 und BMS auf parentale 32D-Zellen im Methylzelluloseassay

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekten mit den FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-exprimierenden 32D Zellen um einen zytotoxischen Effekt der Inhibi-

torkombination handelt, wurden zur Kontrolle IL3-stimulierte parentale 32D-Zellen den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt. Die Zellen wurde ebenfalls in Methylzellulose ausplattiert und die Anzahl der Kolonien nach 120 Stunden bestimmt. Es konnte keine Reduktion der Kolonieanzahl durch die Kombination der Inhibitoren festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Daten des Methylzelluloseassays sagen, dass die Kombination des FLT3-Inhibitors PKC und des SRC-Inhibitors Dasatinib unterschiedliche Effekte auf das Wachstum der zwei Hauptgruppen von FLT3-Mutationen hat. Bei FLT3 ITD-positiven murinen Zellen zeigte sich eine deutliche additive Reduktion der Kolonieanzahl, wohingegen die FLT3 TKD-positiven Zellen nicht durch die Kombination der Substanzen beeinflusst wurden.

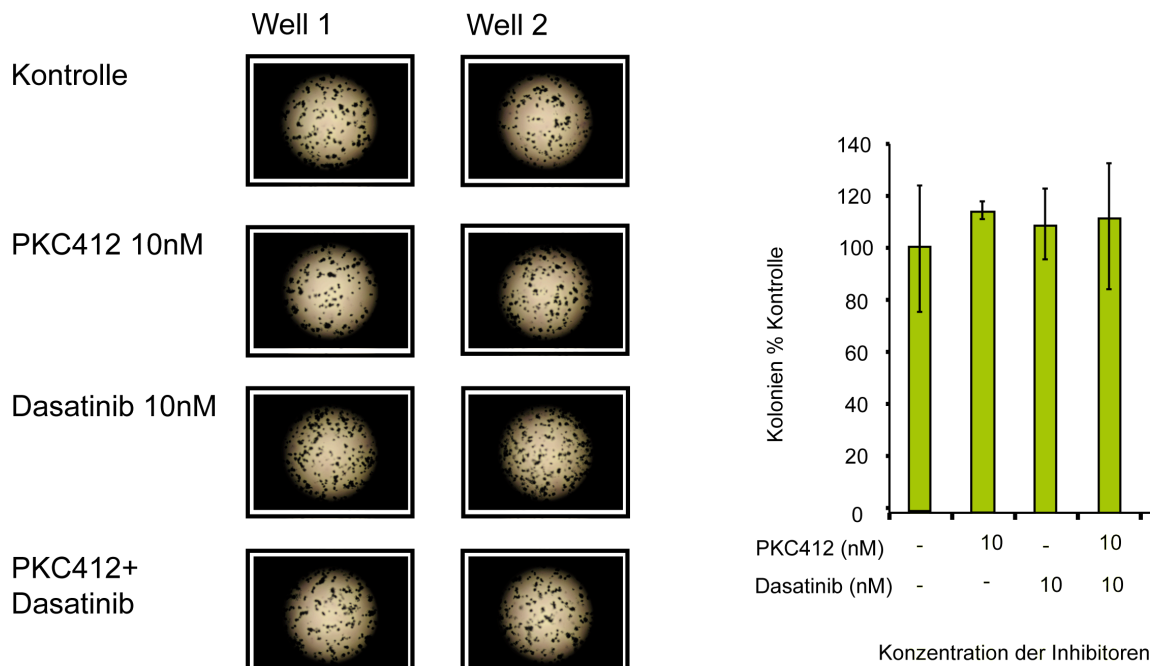


Abb. 4.13: Koloniebildung von parentalen, IL3-stimulierten, murinen 32D-Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.

Humane FLT3 ITD-positive MV4-11-Zellen sprachen ebenfalls auf die Kombination der Inhibitoren an. Diese Daten zeigen, dass SRC-Inhibitoren erfolgreich das Wachstum von FLT3 ITD-positiven murinen und humanen Zellen inhibieren können.

5 Diskussion

5.1 Die Signaltransduktion und das onkogene Potential mutierter FLT3-Tyrosinkinase

Die Tyrosinkinaseaktivität des FLT3-Rezeptors wird durch sterische Hinderung der ATP- und Substratbindung reguliert. Die Konformation der Aktivierungsschleife und die Lage der juxtamembranen Domäne spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Griffith *et al.*, 2004). Mutationen innerhalb dieser Domänen können zur Aufhebung der autoinhibitorischen Funktion des Rezeptors führen. In Anwesenheit von Längenmutationen der juxtamembranen Domäne (ITD) oder Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife (TKD) liegt der FLT3-Rezeptor konstitutiv phosphoryliert und damit aktiviert vor (Griffith *et al.*, 2004).

Die deregulierte Kinaseaktivität führt zu einer konstitutiven Aktivierung von Signalkaskaden wie dem MAP-Kinasen-Signaltransduktionsweg. Das onkogene Potential der FLT3-Mutanten zeigt sich in der Fähigkeit, IL3-abhängige myeloide (32D) und lymphoide Zellen (BAF-3) zu transformieren (Fenski *et al.*, 2000; Choudhary *et al.*, 2005; Grundler *et al.*, 2005). FLT3 ITD-Mutationen können bei durchschnittlich 25 % der AML-Patienten (Kottaridis *et al.*, 2001; Kiyoi und Naoe, 2002; Thiede *et al.*, 2002) und FLT3 TKD bei 7% der AML-Patienten nachgewiesen werden (Horiike *et al.*, 1997; Yokota *et al.*, 1997).

Zur Untersuchung der durch FLT3 ITD und FLT3 TKD induzierten Signaltransduktionswege wurden stabile Zelllinien mittels retroviraler Transduktion generiert und molekularbiologisch analysiert. Beide Mutationsarten führten zu einer Aktivierung von AKT und ERK. Im Gegensatz hierzu wurde STAT5 nur von FLT3 ITD nicht aber von FLT3 TKD aktiviert.

Hinsichtlich der Fähigkeit, IL3-abhängige, murine 32D-Zellen zu transformieren, bewirkte die Expression von FLT3 ITD oder FLT3 TKD wachstumsfaktorunabhängige

Proliferation der Zellen. Die proliferative Aktivität FLT3 ITD-positiver Zellen war deutlich höher als die der FLT3 TKD-exprimierenden Zellen. Eine Umstand, der auf die von den verschiedenen Formen von FLT3 aktivierten promotogenen Signalkaskaden zurückzuführen ist (z. B. STAT5) (Gilliland und Griffin, 2002; Choudhary *et al.*, 2005; Grundler *et al.*, 2005).

Trotz der großen biologischen Bedeutung und der intensiven Forschungsarbeiten ist es bis heute nicht geklärt, was zu der starken Aktivierung von STAT5 durch FLT3 ITD führt. Schmidt-Arras *et al.* (Schmidt-Arras *et al.*, 2009) und Choudhary *et al.* 2009 (Choudhary *et al.*, 2009) untersuchten den Einfluss der Proteinlokalisierung auf die Aktivierung von Signaltransduktionswegen. Schmidt-Arras *et al.* demonstrierten, dass die künstliche Lokalisation von FLT3 ITD im endoplasmatischen Retikulum zu einer Reduktion der Aktivierung von ERK1/2, AKT und STAT5 führt. Der Transkriptionsfaktor STAT3 wurde hingegen verstärkt aktiviert. Analog zu FLT3 ITD führte die Lokalisierung von FLT3 TKD zu einer erhöhten STAT3- und verringerten ERK1/2- und AKT-Aktivität. Choudhary *et al.* zeigten, dass die Lokalisation des FLT3 ITD-Proteins Einfluss auf die Aktivierung von STAT5 hat. Die Ergebnisse beider Publikationen deuteten auf eine essentielle Rolle der Proteinlokalisierung im Rahmen der Signaltransduktion hin. Die Unterschiede in den Ergebnissen lassen sich u. a. durch die verschiedenen Methoden beider Arbeitsgruppen erklären. Schmidt-Arras *et al.* mutierten das untersuchte Protein, wohingegen Choudhary *et al.* chemisch den intrazellulären Transport von FLT3 veränderten.

Andere Gruppen untersuchten, ob strukturelle Unterschiede zwischen den Proteinen FLT3 WT, FLT3 ITD oder FLT3 TKD verantwortlich für die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege sein könnten (Heiss *et al.*, 2006; Vempati *et al.*, 2008). Hierbei unterstrichen mehrere Gruppen unabhängig voneinander die Bedeutung der Tyrosinreste 589 und 591 des Proteins FLT3 ITD (Razumovskaya *et al.*, 2009). Die Mutation dieser Aminosäuren führte zur verringerten Aktivierung von STAT5 in FLT3 ITD-Zellen sowie zu einer Suppression der myeloproliferativen Erkrankung im murinen Transplantationsmodell (Rocnik *et al.*, 2006).

Weitere Gruppen untersuchten Signaltransduktionsmediatoren zwischen FLT3 ITD und STAT5. Hierbei wurde insbesondere die direkte Interaktion zwischen FLT3 ITD und STAT5 untersucht. Choudhary *et al.* (Choudhary *et al.*, 2007) zeigten, dass FLT3 ITD direkt mit STAT5 interagiert und keine weiteren Signaltransduktionsmoleküle wie Januskinasen oder SRC-Kinasen aktiviert. Diesen Ergebnissen stehen die Resultate unserer und einer anderen Gruppen gegenüber, die keine direkte Interaktion zwischen FLT3 ITD und STAT5 zeigen konnten (Robinson *et al.*, 2005) und Leischner *et al.* (Manuskript in Vorbereitung). Vielmehr konnten wir zeigen, dass unter den SRC-Kinasen SRC eine zentrale Rolle in der

FLT3 ITD-abhängigen Aktivierung spielt (Leischner et al. Manuskript in Vorbereitung) Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dos Santos et al. 2008 (Dos Santos *et al.*, 2008). Diese Gruppe zeigte, dass in humanen AML-Zelllinien und primären Patientenzellen eine Aktivierung der SFK vorliegt.

Die Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Gruppen, sind sehr wahrscheinlich auf die verwendeten Zellsysteme und Versuchstechniken zurückzuführen.

5.2 Untersuchung der Sensitivität von FLT3-Mutanten gegenüber einzelnen Tyrosinkinaseinhibitoren

FLT3 spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie und ist die am häufigsten mutierten Tyrosinkinase in diesem Leukämietyp (Gilliland und Griffin, 2002). Wie bereits in Kap. 2.1.1 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass FLT3 nicht das alleinverantwortliche Onkogen für die Induktion einer AML ist. Seine hohe Inzidenz bei AML-Patienten lässt es ein vielversprechendes Ziel für Hemmstoffe darstellen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden mehrere selektive FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt und in präklinischen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Inhibition der Autophosphorylierung von FLT3 die FLT3 ITD-vermittelte Proliferation sowohl in Zelllinien als auch in primären AML-Blasten unterbinden und in diesen Zellen Apoptose auslösen (Tse *et al.*, 2000; Levis *et al.*, 2002).

Des Weiteren wurde die funktionelle Relevanz von FLT3 ITD im Rahmen der AML-Pathogenese mittels TKI im FLT3 ITD-Mausmodell bestätigt. Die Behandlung der Mäuse mit FLT3-Kinaseinhibitoren hatte ein signifikant verlängertes Überleben der Tiere zur Folge (Levis *et al.*, 2002; Weisberg *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde die Sensitivität verschiedener FLT3-Mutanten gegenüber den FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren PKC412, Sorafenib und Sunitinib getestet. Es konnte gezeigt werden, dass das inhibitorische Potential der untersuchten Substanzen durch die Art der Mutation im FLT3-Rezeptor beeinflusst wird.

Sunitinib zeigte bei singularer Behandlung im Proliferationsassay den größten Effekt auf FLT3 TKD-positive Zellen. Der IC₅₀-Wert lag für FLT3 TKD-exprimierende 32D-Zellen bei 5 nM und für FLT3 ITD-exprimierende 32D-Zellen bei 25 nM. FLT3 ITD-positive MV4-11-Zellen zeigten ein vergleichbares Ansprechen wie FLT3 ITD-exprimierende 32D-Zellen.

Sorafenib hatte eine deutlich stärkere inhibitorische Wirkung auf FLT3 ITD-positive Zellen im Hinblick auf die Proliferation. Der IC₅₀-Wert lag für FLT3 ITD-positive Zellen bei <5

nM, wohingegen FLT3 TKD-positive Zellen einen deutlich höheren IC₅₀-Wert (>100 nM) aufwiesen. Diese Ergebnisse bestätigen die von anderen Arbeitsgruppen publizierte IC₅₀-Werte (Auclair *et al.*, 2007; Kancha *et al.*, 2007) und die Funktionalität des in dieser Arbeit verwendeten Zellsystems. Die divergierenden Ergebnisse von Liermann *et al.* 2007 bezüglich des IC₅₀-Wertes von 500 nM für FLT3 TKD-positive Zellen sind mit unterschiedlichen Zelllinien und Methoden zu erklären.

Bezüglich des Ansprechens auf den FLT3-Inhibitor PKC412 waren unsere Ergebnisse kongruent mit denen anderer Gruppen, die eine deutlich höhere Sensitivität von FLT3 TKD gegenüber dem Inhibitor PKC 412 zeigten (Grundler *et al.*, 2003; Auclair *et al.*, 2007; Kancha *et al.*, 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FLT3-Mutanten unterschiedlich auf verschiedene Inhibitoren ansprechen, eine Beobachtung, die vor allem im Rahmen der Therapie von Patienten mit einer AML von Bedeutung sein wird.

Dasatinib, ist ein dualer ABL- und SRC-Inhibitor, der ca. 300-fach potenter als Imatinib ist (Lombardo *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Imatinib, das ausschließlich an die inaktive Form der Kinasen binden kann, kann Dasatinib sowohl an die aktive als auch an die inaktive Form von ABL binden. Zusätzlich besitzt es eine deutlich höhere Affinität gegenüber den häufigsten Imatinibresistenz-vermittelnden Mutationen von ABL (Camps *et al.*, 2005; Schittenhelm *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Dasatinib auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-Mutationen untersucht.

Dasatinib führte bei FLT3 ITD-positiven murinen und humanen Zellen zu einer dosisabhängigen Reduktion der proliferativen Aktivität. Im Gegensatz hierzu führte Dasatinib bei FLT3 TKD-positiven Zellen erst in Konzentrationen von >100 nM zu einer Reduktion der zellulären Proliferation. Diese Ergebnisse unterstreichen die bedeutsame Rolle von SRC in den FLT3 ITD-aktivierten Signaltransduktionswegen.

Über die Wirkung von Dasatinib auf murine oder humane FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-positive Zellen gab es zum Zeitpunkt des Verfassens dieses Manuskripts keine Daten. Daher werden diese Ergebnisse im Kontext von Forschungsergebnissen anderer hämatologischer Erkrankungen diskutiert. Der Effekt von Dasatinib wurde vor allem in präklinischen Studien zur BCR-ABL positiven CML näher evaluiert. Hierbei konnten u. a. König *et al.* (König *et al.*, 2008) zeigen, dass Dasatinib in unterschiedlichen myeloiden Zellen bereits in Konzentrationen von 10 nM eine nachweisbare Reduktion der SFK-Phosphorylierung bewirkt. Basierend auf diesen Resultaten und denen unserer Arbeitsgruppe (Leischner *et al.* Manuskript in Vorbereitung) ist davon auszugehen, dass die beobachtete Inhibition des

Wachstums durch Dasatinib auf Inhibition von SRC in den FLT3 ITD-positiven murinen und humanen Zellen zurückzuführen ist.

5.3 Ansprechen von FLT3 Mutanten auf Kombinationen von Tyrosinkinaseinhibitoren

In Bezug auf die positiven Ergebnisse präklinischer Forschungsarbeiten mit SRC-Inhibitoren werden bei zahlreichen malignen neoplastischen Erkrankungen Kombinationstherapien mit SRC-Inhibitoren in klinischen Studien evaluiert (Kopetz *et al.*, 2009).

Mehrere Gruppen zeigten positive Effekte in präklinischen Studien zur Therapie der AML durch die Kombination von FLT3-Inhibitoren mit konventionellen Chemotherapeutika (Furukawa *et al.*, 2007; Mollgard *et al.*, 2008). Bis zum Zeitpunkt der Manuskriptverfassung existierten keinerlei Daten über den Effekt der Kombination von FLT3- und SRC-Inhibitoren auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiv AML-Zellen.

In diesem Teil der Arbeit wurde der Effekt von FLT3-Inhibitoren wie PKC412, Sorafenib oder Sunitinib in Kombination mit dem SRC hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Effekte auf FLT3 ITD- und FLT3 TKD-exprimierende murine und humane Zellen untersucht.

Die Kombination von PKC412 und Dasatinib führte zur deutlichen additiven Inhibition des Wachstums in FLT3 ITD-positiven 32D- und MV4-11-Zellen. Im Gegensatz hierzu hatte die Kombination beider Inhibitoren nur eine geringe Auswirkung auf FLT3 TKD-exprimierende Zellen zu haben.

Der inhibitorische Effekt von Sorafenib auf FLT3 ITD-exprimierende Zellen wurde bereits in mehreren klinischen und präklinischen Studien beschrieben (Strumberg, 2005; Auclair *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde die Effizienz des Wirkstoffs in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika untersucht (Ravandi *et al.*; Zhang *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit führte die Kombination von Sorafenib und Dasatinib zu einer additiven Proliferationsinhibition bei FLT3 ITD-positiven MV4-11- und 32D-Zellen. Zwar wurden die FLT3 TKD-positiven Zellen durch die Kombination beider Inhibitoren ebenfalls geringfügig in ihrer Proliferationsaktivität inhibiert, ein ähnlicher Effekt ließ sich jedoch ebenfalls bei parentalen 32D-Zellen beobachten, was den Rückschluss zulässt, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt handelt.

Die Wirkung von Sunitinib gegenüber den Mutationen der RTK FLT3 wurde in präklinischen Studien von verschiedenen Gruppen nachgewiesen (O'Farrell *et al.*, 2003; Ikezoe *et*

al., 2006; Kancha *et al.*, 2007). Außerdem ist die Applikation von Sunitinib als singuläres Medikament bereits in klinischen Studien bei AML-Patienten mit FLT3-Mutationen untersucht worden (s. klin. Studie NCT 00783653) (Fiedler *et al.*, 2005). Fiedler *et al.* beobachtete klinisches Ansprechen von AML-Patienten auf die Monotherapie mit Sunitinib, wobei die erzielte Remission nur partiell und von kurzer Dauer war. Weitere klinische Studien mit einer Sunitinib-Monotherapie bzw. in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika sind geplant (NCT 00783653). Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit waren keine Daten über Studien publiziert, in denen die Kombination von Sunitinib und dem SRC-Inhibitor Dasatinib untersucht werden.

Die Kombination der Inhibitoren Sunitinib und Dasatinib hatte eine proliferationshemmende Wirkung ausschließlich auf FLT3 ITD-positive Zellen. Es zeigte sich in diesen Zellen ein additiver inhibitorischer Effekt, wohingegen die proliferative Aktivität von FLT3 TKD-Zellen in keinster Weise durch die Kombination beider Substanzen beeinflusst wurde.

Das Ansprechen von FLT3-ITD jedoch nicht von FLT3-TKD positiven Zellen, auf die Kombination von FLT3 und SRC Inhibitoren unterstreicht die Bedeutung der individualisierten Therapie in der Behandlung von onkologischen Erkrankungen. Die genaue zytogenetische und molekularbiologische Analyse der zugrunde liegenden Erkrankung kann eine effektivere Planung der Therapie ermöglichen. Durch diese sollte es möglich sein zum einen die Nebenwirkungen für den Patienten so gering wie möglich zu gestalten, und im gleichen Zug die Prognose zu verbessern (Illmer und Ehninger, 2007; Mead *et al.*, 2007; Grimwade und Hills, 2009; Kindler *et al.*, 2010).

Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse dieser Studie die bedeutsame Rolle von SRC in der Pathogenese von hämatologischen und soliden malignen Neoplasien. Eine aktuelle Arbeit von Zhang *et al.* zeigt, dass SRC eine zentrale Funktion in der Resistenzentwicklung ERBB2 positiven Brustkrebspatienten besitzt (Zhang *et al.*, 2011). Zusätzlich konnte die Gruppe demonstrieren, dass die Inhibition von SRC bei Transduzumab resistenten Tumorzellen zu einer Sensitivierung gegenüber Transduzumab führt.

Zusammenfassend lässt sich aus den beschriebenen Experimenten der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass die Kombination eines FLT3- und eines SRC-Inhibitors eine effektive Therapiemöglichkeit für FLT3 ITD-positive AML-Patienten darstellen könnte. Das Potential und die Risiken dieser Therapieform sollten jedoch in weiteren Studien detaillierter untersucht werden.

6 Material

6.1 Chemikalien und biogene Substanzen

2-Mercaptoethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
5-Fluorouracil	<i>Medac, Wedel</i>
Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Agarose	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Ammoniumchlorid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ammoniumhydrogencarbonat	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Aqua ad injectabilia, steril	<i>B. Braun, Melsungen</i>
Bacto™ Agar	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Bacto™ Hefeextrakt	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Bacto™ Trypton	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
BSA, Fraktion V	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
Chloroform	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Promega, Heidelberg</i>
dNTP Mix, 10 mM	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Essigsäure	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Ethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethidiumbromid	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Formaldehyd, 37 %-ig	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Glycerol-2-phosphat	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Isopropanol	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Kaliumchlorid	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Kaliumhydrogencarbonat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Magnesiumchlorid	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Methanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumacetat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumazid	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Natriumchlorid	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Serva Elctrophoresis, Heidelberg</i>
Natriumdihydrogenphosphat	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumfluorid	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumorthovanadat	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Natriumpyrophosphat	<i>Fluka, Deisenhofen</i>
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
Polybren (Hexadimethrinbromid)	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Propidiumiodid	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Rotiphorese® Gel 30	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Salzsäure	<i>Merck, Darmstadt</i>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Trockenmilchpulver	<i>Fluka-Chemie, Deisenhofen</i>
Tween 20	<i>Fluka-Chemie, Deisenhofen</i>

6.2 Medien und Supplemente

2-Mercaptoethanol	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Amaxa® Nucleofector® Kits	<i>Lonza Cologne, Köln</i>
Dimethylsulfoxid	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Diphtherietoxin	<i>Calbiochem, La Jolla, CA, USA</i>
Doxycycline	<i>Clontech, Palo Alto, CA, USA</i>

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>PAA Laboratories , Cölbe</i>
Fetales Kälber-Serum Gold	<i>PAA Laboratories , Cölbe</i>
G418 Sulfat	<i>Calbiochem, Darmstadt</i>
Hank's Buffered Salt Solution	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Hygromycin B, 50mg/ml in PBS	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
L-Glutamin, 200 mM	<i>PAA Laboratories , Cölbe</i>
Lipofectamine 2000	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Methocult® 3234	<i>STEMCELL Technologies, Köln</i>
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5 %	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Opti-MEM® I Reduced Serum Media	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Penicillin/Streptomycin Lösung	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Phosphat buffered saline (PBS), 10x,	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	<i>Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen</i>
Puromycin Dihydrochlorid	<i>Calbiochem, Darmstadt</i>
rekombinantes, murines Interleukin-3 (IL-3)	<i>R&D Systems, Wiesbaden</i>
RPMI-1640 Medium	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>
Trypanblau	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Trypsin-EDTA-Lösung, 10x	<i>PAA Laboratories, Cölbe</i>

6.3 Membranen

PVDF Membran (Immobilon P)	<i>Millipore, Schwalbach</i>
----------------------------	------------------------------

6.4 Antikörper

Anti-β-Aktin (AC-15), monoklonal, Maus IgG1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Akt1/2 (N-19), polyklonal, Ziege IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Erk, p44/p42 MAP Kinase, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Frankfurt/ Main
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus FLT3, ICD, polyklonal, Kaninchen	Upstate Biotechnology,

IgG	New York, USA
Anti-Maus FLT3, ECD, polyklonal, Ziege IgG	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti-Phospho-Akt (Ser473), polyklonal, rabbit IgG	Cell Signaling, Frankfurt/ Main
Anti-Phospho-Erk, p44/p42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Frankfurt/ Main
Anti-Phospho-Tyrosin (4G10), monoklonal, Maus IgG	Upstate Biotechnology, New York, USA
Anti-Phospho-Tyrosin (pY20), monoklonal, Maus IgG	PharMingen, San Diego, USA
Anti-Phospho-Stat5 A/B (18E5), monoklonal, Maus IgG	Tom Wheeler, Hamilton, New Zealand (Wheeler <i>et al.</i> , 2001)
Anti-Stat5 A/B (C-17), polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg

6.5 Verbrauchsmaterialien und molekularbiologische Kitsysteme

Cell Line Nucleofector® Kits

Lonza Cologne, Köln

CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell

Proliferation Assay (MTS)

Promega, Mannheim

CL-XPosure™ Film

Thermo Scientific, Karlsruhe

DC Protein Assay, Proteinbestimmungskit

Bio-Rad, München

NucleoBond® Plasmid Maxi Kit

Machery-Nagel, Düren

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Kit

Fermentas, St. Leon-Rot

RNeasy Mini Kit

Qiagen, Hilden

SuperScript™ II Rnase H⁻Reverse Transcriptase

Invitrogen, Karlsruhe

SuperSignal West Pico, Dura und Femto

Perbio Science, Bonn

6.6 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ 1kb Plus Ladder	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
GeneRuler™ Ladder Mix	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>

6.7 Standard Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	<i>Biometra, Göttingen</i>
Analysenwaage BP 221S	<i>Satorius, Göttingen</i>
Binokular Stemi 2000-CS	<i>Zeiss, Jena</i>
Binokular-Lampe LL1500 LCD	<i>Zeiss, Jena</i>
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Digitalwaage LC 1200 S	<i>Satorius, Göttingen</i>
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	<i>Beckman-Coulter, Krefeld</i>
Elisa Reader Sunrise™	<i>Tecan, Crailsheim</i>
Entwickler Optimax	<i>Protec, Oberstenfeld</i>
Incubator-Shaker Innova 4000	<i>New Brunswick Scientific, Edison, USA</i>
Inkubator-Schüttler Certomat® BS-1	<i>B. Braun, Melsungen</i>
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosti Nalgene	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>
Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-14	<i>Beckman, Fullerton, USA</i>
Kühlzentrifuge 5417R	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	<i>Zeiss, Jena</i>
Magnetrührgerät CB162	<i>Carl Stuart Limited, Dublin, Irland</i>
Mini Protean® Tetra Cell	<i>Bio-Rad, München</i>
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	<i>Biometra, Göttingen</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Reichert, New York, USA</i>
PCR-Thermocycler Primus	<i>MWG-Biotech, Ebersberg</i>
pH-Meter inoLab®	<i>WTW, Weilheim</i>
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	<i>New Brunswick Scientific, Edison, USA</i>
Schüttler WT 12	<i>Biometra, Göttingen</i>
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	<i>Holten, Gydevang, Dänemark</i>
Stromgenerator PowerPac HC™, PowerPac 200,	

PowerPac 25	<i>Bio-Rad, München</i>
Sub-Cell® Model 192	<i>Bio-Rad, München</i>
TE Series Transphor Electrophoresis Unit	<i>Hoefler, Holliston, USA</i>
Tischzentrifuge 5415D	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
UV-Lampe TI 2	<i>Biometra, Göttingen</i>
Vortex Mixer 7-2020	<i>neoLab, Heidelberg</i>
Wasserbad 1083	<i>GFL, Burgwedel</i>
Zentrifuge Megafuge R 1.0	<i>Thermo Scientific, Karlsruhe</i>

6.8 Oligonukleotide

Alle unten aufgelisteten Oligonukleotid-Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben. Alle Oligonukleotide wurden bezogen von der Firma *Eurofins MWG Operon, Ebersberg*.

6.8.1 Sequenzierprimer

MSCV-MCS-5'
5'CGTTCGACCCCGCCTCGATCC3'

6.9 DNA-Konstrukte

MSCV MIG-R1	J. Miller and W. Pear, Philadelphia, USA (Pear <i>et al.</i> , 1998)
mFLT3-WT in pAL-MMSV	H. Serve, Münster (Mizuki <i>et al.</i> , 2000)
mFLT3-ITD in pAL-MMSV	H. Serve, Münster (Mizuki <i>et al.</i> , 2000)
mFLT3-WT in pcDNA 3.1/Zeo(+)	R. Grundler
mFLT3-ITD in pcDNA 3.1/Zeo(+)	R. Grundler
mFLT3 D838Y in pcDNA 3.1/Zeo(+)	R. Grundler
mFLT3-WT in MSCV MigR1	R. Grundler
mFLT3-ITD in MSCV MigR1	R. Grundler
mFLT3 D838Y in MSCV MigR1	R. Grundler

6.10 Tyrosinkinaseinhibitoren

PKC412	CGP 41251, N-Benzoylstaurosporin, Midostaurin (Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz)
Dasatinib	BMS-354825, (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, New Jersey, USA)
Sorafenib	BAY 43-9006, (American Chemicals Custom Corporation, San Diego USA)
Sunitinib	SU-11248 (Apotheke Klinikum rechts der Isar München, Germany)

6.11 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5 α TM: *Invitrogen, Karlsruhe*
 F-F80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*,
recA1, *endA1*, *hsdR17*(rK-, mK+), *phoA*, *supE44*,
l-thi-1, *gyrA96*, *relA1*

6.12 Eukaryotische Zelllinien

32D	murine, IL-3-abhängige Zelllinie, ursprünglich erhalten aus Knochenmark-Langzeitkulturen aus C3H/HeJ Mäusen
Ba/F3	murine, IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie, gewonnen aus Balb/C Mäusen
MV4-11	humane, zytokinunabhängige AML Zelllinie (M5)

Die Zelllinien 32D, Ba/F3 und MV4-11 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen) in Braunschweig bezogen. Die Verpackungs-Zelllinie Phoenix E wurde uns von Gary P. Nolan, Stanford, USA zur Verfügung gestellt.

6.13 Standard Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in A.d.
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	10 % Methanol 10 % Essigsäure in A.d.
DNA-Probenpuffer (10-fach):	50 % Glycerin 0,5 M EDTA in A.d.
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 1 % NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert
LB-Medium (fest):	1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl , 5 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4 % SDS in A.d.
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycin in A.d.

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in A.d. 20 % Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4 % SDS in A.d.

7 Methoden

7.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

7.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist es möglich, *in vitro* Nukleotidsequenzen enzymatisch zu vervielfältigen. Die PCR beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen DNA-Strang durch semikonservative Replikation zu verdoppeln. Möglich ist die PCR nur aufgrund der thermostabilen Eigenschaften der eingesetzten Polymerasen.

Zu Beginn jedes Amplifikationszyklus wird die doppelsträngige Matrizen-DNA (Template) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, so dass beim anschließenden Abkühlen auf die Anlagerungstemperatur Startermoleküle spezifisch an die Zielregion hybridisieren können (annealing). Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, welche die zu amplifizierende Region begrenzen. In der dritten Phase der Reaktion bindet eine hitzestabile DNA-Polymerase am Übergang zwischen doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA und synthetisiert unter Einbau von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) an das 3'-OH-Ende des Primers den neuen DNA-Doppelstrang (Extension). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase besitzt die Pfu-Polymerase neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität eine 3'-5'-Exonuklease-Prüffunktion (proofreading) (Lundberg *et al.*, 1991) und weist daher zwölfmal höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase auf. Durchgeführt wird die PCR in einem Thermozykler, dessen automatische Steuerung ein individuell programmierbares zyklisches Temperaturprogramm regelt. Neben der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente können Mutationen an doppelsträngiger DNA vorgenom-

men werden, die in Punktmutation, Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Aminosäuren resultieren. Außerdem ist es möglich, durch PCR-Mutagenese neue Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen oder rekombinationsfähige Sequenzen für die sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung in die Matrizen-DNA einzuführen.

7.1.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in DNA-Strängen und spalten an diesen Stellen doppelsträngige DNA spezifisch auf (Sambrook *et al.*, 1989). Dabei entstehen abhängig vom verwendeten Enzym komplementäre, überhängende Enden (sticky ends) oder stumpfe Enden (blunt ends). Bei der Wahl der Puffer und Inkubationsbedingungen wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt. Bevor die restriktionsverdauete DNA weiterverwendet werden kann, wird das Restriktionsenzym gemäß Herstellerangaben hitzeinaktiviert, um eine übermäßige und gegebenenfalls unspezifische Spaltung der DNA zu vermeiden.

7.1.3 Dephosphorylierung

Bei der Linearisierung von Plasmiden mit nur einem Restriktionsenzym liegt die Vektor-DNA nach dem Verdau mit kompatiblen 5'- und 3'-Enden vor. Diese werden von der Ligase bevorzugt religiert ohne ein DNA-Fragment einzufügen. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe mit alkalischer Phosphatase verhindert dies und verbessert so die Effizienz der Klonierung erheblich. Eine kovalente Verknüpfung ist dann nur mit dem Insert möglich, das eine intakte 5'-Phosphatgruppe besitzt.

Das diese Reaktion katalysierende Enzym benötigt ähnliche Pufferbedingung wie Restriktionsendonukleasen, daher kann es nach vollendeter Restriktionsspaltung dem Ansatz zugesetzt werden. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten bei 37° C. Anschließend wird die Phosphatase durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min inaktiviert.

7.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Beim Anlegen einer Spannung wandert DNA im Agarosegel aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die DNA-Banden werden

durch das interkalierende und fluoreszierende Ethidiumbromid unter UV-Licht in einem Photodokumentationsgerät sichtbar gemacht. Für präparative und analytische Zwecke werden 1 bis 2 % ige Agarosegele verwendet. Mit Hilfe eines DNA-Standards lässt sich die Molekülgröße von DNA-Fragmenten durch Vergleich der Laufstrecken abschätzen. Zur Herstellung des Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose (w/v) in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt ist, werden 2 µl Ethidiumbromid in einem horizontalen Gelbett mit Lochkamm verteilt und mit der flüssigen Agarose-Lösung aufgegossen. Blasenbildung sollte vermieden werden. Nach Erstarren wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt. Die Proben werden mit einem Fünftel ihres Volumens an Auftragspuffer für Agarosegele versetzt, das Gel beladen und die Elektrophorese bei 100 Volt durchgeführt. Bei dem Lauf durch das Gel interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und somit lassen sich die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) visualisieren.

TAE-Puffer (1 x): 40 mM Tris; 1 mM EDTA; 20 mM Essigsäure; pH 8.0

DNA-Probenpuffer (6x): 30 % Glycerin (v/v), 50 mM EDTA in A.d.

7.1.5 Gelextraktion

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten werden diese nach elektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Um Beschädigung der DNA in Form von Strangbrüchen und Dimerbildungen zu vermeiden, wird zur Visualisierung eine UV-Quelle mit geringer Wellenlänge verwendet und die Expositionszeit möglichst gering gehalten. Für die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wird das „NucleoSpin® Extract II Kit“ gemäß Vorgaben des Herstellers verwendet, zur Elution jedoch Aq. dest. verwendet. Die Aufreinigung dient dazu, Verunreinigungen wie Agarosereste, Enzyme, Nukleotide und Salze zu entfernen. Die DNA wird bei -20°C gelagert.

NucleoSpin® Extract II Kit

7.1.6 Ligation

Zur Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls werden der linearisierte Vektor mit dem zu klonierenden DNA-Stück (Insert-DNA) verknüpft (Sambrook *et al.*, 1989). Katalysiert wird die ATP-abhängige Reaktion durch die T4-Ligase, die 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verbindet. Idealerweise sollte ein molares Verhältnis zwischen Vektor und Insert-DNA von 1:3 vorliegen. Die DNA-Konzentrationen werden mittels NanoDrop

gemessen und die in die Ligation einzusetzenden Mengen an Vektor und Insert-DNA entsprechend angeglichen. Die Ligation erfolgt entsprechend den Herstellerangaben mit dem „Rapid Ligation Kit“ von Fermentas. Als Kontrolle fungiert ein Ligationsansatz, bei dem die Insert-DNA durch Wasser ersetzt wird. Der Ligationsansatz kann anschließend in kompetente Bakterien transformiert werden.

Rapid Ligation Kit

7.2 Arbeiten mit Bakterien

7.2.1 Kultivierung von Bakterien

Flüssig-Bakterienkulturen werden bei 37°C und 250 Upm in LB-Medium über Nacht inkubiert, Bakterienkolonien, ebenfalls bei 37°C über Nacht auf LB-Agarplatten. Durch Zusatz von Antibiotika können nur Zellen wachsen, die ein Resistenz-vermittelndes Plasmid enthalten, nicht transformierte Bakterien hingegen werden abgetötet.

LB-Medium:	1 % Bacto-Trypton; 1 % NaCl; 0,5 % Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert; pH 7,0
LB-Agarplatten:	1,5 % Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert
Antibiotika:	50 mg/ml Ampicillin bzw. 10 mg/ml Kanamycin

7.2.2 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von Fremd-DNA (z. B. rekombinanten Vektoren) auf Bakterien- oder Hefezellen. Gramnegative Bakterien wie *E. coli* sind unter normalen Umständen nicht in der Lage, DNA von außen mit ausreichender Effizienz aufzunehmen. Aus diesem Grund wird die Zellwand von *E. coli* durch Behandeln mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an zweiwertigen Metallkationen wie Ca^{2+} oder Rb^{2+} destabilisiert. Die Aufnahme wird somit gesteigert. Der Wirkungsgrad einer Transformation wird normalerweise durch einen Hitzeschock oder durch einen kurzen hohen Stromstoß erhöht.

Für die Transformation durch Hitzeschock wird die DNA-Lösung (max. 10 µl) zu 100 µl auf Eis aufgetauter kalziumkompetenter Bakterien (DH5α) pipettiert, 20 min auf Eis inkubiert und für 45 sec auf 42°C erhitzt. Anschließend wird für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert (Sambrook *et al.*, 1989) und die Bakteriensuspension auf LB-Platten ausplattiert. Wird ein

Plasmid transformiert, das eine Kanamycin-Resistenz kodiert, so müssen die Bakterien nach dem Hitzeschock für 60 Minuten bei 37°C in antibiotikafreiem LB-Medium inkubiert werden, da die Resistenz nicht sofort nach der Transformation eintritt. In diesem Fall wird der Ansatz bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Medium resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Von Einzelkolonien werden nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C Flüssigkulturen für Mini- und Maxipräparationen angeimpft.

7.2.3 Plasmid-Präparation

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in der Bakterienzelle sowie in Hefezellen unabhängig von der chromosomalen DNA vermehrt werden. Die hier verwendeten Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA beruhen auf den unterschiedlichen Eigenschaften der Plasmid-DNA und der chromosomalen DNA bei ihrer Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung. Beim raschen Absenken des pH-Wertes nach alkalischer Denaturierung renaturiert Plasmid-DNA und bleibt löslich, wohingegen chromosomale DNA an Zellwandbruchstücken und Proteinen haftet und mit diesen zentrifugiert werden kann.

7.2.3.1 Plasmid-Präparation (Mini-Ansatz)

Mit dem „NucleoSpin® Plasmid Kit“ von Machery-Nagel lassen sich innerhalb kurzer Zeit kleine Mengen (bis zu 40 µg bei 10 ml Übernacht-Kultur) Plasmid-DNA in hoher Reinheit aus Bakterien isolieren.

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll. Es werden bei *high-copy*-Plasmiden 5 ml, bei *low-copy*-Plasmiden 10 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen werden anschließend 10 Minuten bei 4°C und 4000 Upm pelletiert und die DNA nach Anleitung des Herstellers nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen.

7.2.3.2 Plasmid-Präparation (Maxi-Ansatz)

Die Plasmid-Maxipräparation erfolgt nach dem gleichen System wie die Plasmid-Minipräparation, lediglich im größeren Maßstab. Mit dem „NucleoBond® Plasmid Maxi Kit“ von Machery-Nagel lassen sich bis zu 1000 µg Plasmid-DNA isolieren. Mit einer 4 ml

Vorkultur der Bakterien werden 300 ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterien aus dieser Übernacht-Kultur (37°C) werden durch 15-minütige Zentrifugation bei 5000 Upm pelletiert und das Bakterien-Pellet gemäß Herstellerangaben lysiert und aufgearbeitet.

7.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wurde von der Firma *GATC Biotech* in Konstanz durchgeführt.

7.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

7.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C, 90 % relative Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

7.3.1.1 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Die Suspensionszellen Ba/F3, 32D und MV4-11 werden in RPMI-Medium kultiviert. Ba/F3- und 32D-Zellen benötigen als Wachstumsfaktor murines IL-3 (0,2 ng/ml). Die Suspensionszellen werden 3- bis 4-mal wöchentlich im Verhältnis 1:10 verdünnt und neues Medium wird zur weiteren Kultivierung zugeführt.

RPMI-Medium: RPMI 1640, 2 mM Glutamin, 1 % antibiotische Lösung, 10 % FCS

7.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut und weiterkultiviert werden. Dazu werden 1-10 x 10⁶ Zellen in 1 ml Medium in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium vermischt und sofort bei -80°C in einem Kryo-Einfriergerät eingefroren. Für dauerhafte Lagerung werden die Zellen nach 12-24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium 2-fach: 20 % FCS; 80 % DMSO

7.3.3 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff wird dieses sofort bei 37°C angetaut und schnellstmöglich in 10 ml Kulturmedium überführt. Durch Zentrifugation wird das enthaltene DMSO entfernt. Für die Kultivierung werden die Zellen anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in ein entsprechendes Zellkulturgefäß überführt.

7.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und die lebenden und demnach trypanblau-negativen Zellen ausgezählt. Hierfür werden gleiche Volumina der Zellsuspension und einer 0,5 %-igen Trypanblaulösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden vier Großquadrate ausgezählt, wobei nur viable Zellen berücksichtigt werden. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wird ermittelt, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

7.3.5 Transiente Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen. Sie wird eingesetzt, um Plasmide, Antisense-Oligonukleotide oder siRNA einzuschleusen. Die Fremd-DNA kann auf verschiedene Weisen in die Zielzelle eingebracht werden; durch virale Transfektion, Lipofektion oder durch Elektroporation. Die Anwendung der Lipofektion ist weitestgehend auf adhärente Zelllinien beschränkt. Nukleofektion eignet sich sowohl für adhärente Linien als auch für Suspensionszellen wie K562, 32D und Ba/F3. Der Gen-Transfer durch retrovirale Infektion schließlich eignet sich für die meisten Zellarten einschließlich primären Knochenmarkzellen; einzig ruhende, sich nicht teilende Zellen sind nicht durch Retroviren transfizierbar.

7.3.5.1 Lipofektion

Die Transfektion von Phoenix Zellen mit Lipofectamine™ 2000 erfolgt gemäß Herstellerangaben. Soll Virus generiert werden, werden 2 Millionen Phoenix E Zellen pro 6 cm

Zellkulturschale ausplattiert. 24 Stunden später wird das Medium durch 2 ml frisches DMEM-Medium ersetzt. Parallel werden 0,5 ml Opti-MEM®I mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 und 0,5 ml Opti-MEM®I mit 10 µg zu transfizierender DNA oder siRNA versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation werden die Ansätze vermischt und für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellkulturplatte aufgetropft. Die Expression der kodierten Proteine setzt etwa 16-24 h nach der Transfektion ein.

Lipofectamine™ 2000**Opti-MEM®I Serum reduziertes Medium**

7.3.6 Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion

Das retrovirale Gentransfersystem umfasst zwei Komponenten, den retroviralen Vektor und die Verpackungszelllinie. Der retrovirale Vektor ist ein Plasmid, das nicht für retrovirale Proteine kodiert, sondern nur über das Verpackungssignal Psi und die retroviralen 5'- und 3'-LTR verfügt, die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen und gegebenenfalls einen Selektionsmarker flankieren. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine (pol, gag, env) zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind. Die Verpackungszelllinie exprimiert zwar die retroviralen Strukturproteine, bei diesem Helfergenom ist jedoch das Verpackungssignal Ψ deletiert, so dass die virale RNA, die in der Verpackungszelllinie von dem Helfergenom abgelesen wird, nicht in Virionen verpackt wird. Je nach Art der vom Helfergenom exprimierten, retroviralen Hüllproteine wird zwischen ecotropen (infizieren nur Mäuse/Ratten) bzw. amphotropen (weites Wirtsspektrum, auch Mensch) Verpackungszelllinien unterschieden.

Nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA in neue Virionen verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie abgegeben werden. Mit Hilfe dieser Virionen, die in der Regel Replikationsdefekte aufweisen, können Zielzellen infiziert werden, in deren Genom sich das von der übertragenen retroviralen RNA umgeschriebene Provirus stabil integriert. Dort werden das zu übertragende Gen sowie gegebenenfalls der Selektionsmarker exprimiert.

7.3.6.1 Herstellung von Retroviren

Die Phoenix Zellen basieren auf der menschlichen, embryonalen Nieren-Zelllinie 293T. Generiert wurden sie von Nolan durch Einführung zweier Plasmide, eines kodiert für Kapsidproteine (gag) und die reverse Transkriptase (pol), das andere für Hüllproteine (env). Abhängig davon, ob die zu infizierende Zelle murinen oder humanen Ursprungs ist, muss die entsprechende ecotrophe oder amphotrophe Phoenix-Linie gewählt werden. Die Trennung der viralen Gene auf verschiedenen Plasmiden über nicht Moloney-basierende Promotoren dient dem Zweck, die Bildung replikationskompetenter Retroviren zu verhindern. Phoenix Zellen zeichnen sie sich durch eine hohe Transfektionseffizienz unter Verwendung der Calcium-Phosphat Methode oder der Lipofektions-Methode aus. Retrovirale Vektoren kodieren für ein Verpackungssignal Ψ . Transfiziert man nun Phoenix-Zellen mit einem retroviralen Vektor, so wird die DNA in genomische RNA umgeschrieben und in die virale Hülle verpackt. Die Phoenix-Zellen setzen dann die fertigen Virus-Partikel in das Kulturmedium frei.

Zur Herstellung der Retroviren werden einen Tag vor der Transfektion pro Ansatz 2×10^6 Phoenix E-Zellen in 3 ml DMEM-Medium pro 6 cm Zellkultur-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wird der retrovirale Vektor mittels Lipofektion in die Zellen eingebracht (Kapitel 7.3.5.1). Weitere 24 Stunden später wird das Medium durch frisches DMEM-Medium ersetzt und in 12 Stunden-Intervallen bis zu 3 mal der Retrovirus enthaltende Zellüberstand abgenommen, filtriert (0,45 μm) und bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

7.3.6.2 Retrovirale Infektion

Um Suspensionszellen retroviral zu infizieren, wird die Spin-Infektions-Methode angewandt. Hierfür werden 50000 Ba/F3- oder 32D-Zellen in 500 μl RPMI-Medium mit IL-3 in 24-Schalen-Platten ausgesät und 2 ml Retrovirus enthaltendes Medium zugegeben. Um die Bindung der Viren an die Zellmembran zu erleichtern, wird das Polykation Polybren in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und die Platte für 90 Minuten bei 32 °C und 24000 Upm zentrifugiert. Die Viruspartikel, gebunden an Phoenix-Zellfragmente, und die zu infizierenden Zellen werden hierdurch am Boden der Platte zusammengeführt und somit die Infektionseffizienz gesteigert. Im 12 Stunden-Turnus bis zu dreimal wird der virale Überstand entfernt und durch 2 ml frischen Virusüberstand und 500 μl frisches RPMI-Medium mit IL-3 ersetzt.

7.3.6.3 Selektion der Virusverpackungszelllinie

Phoenix E-Zellen sind mit den für die Virusproduktion essentiellen Genen gag, pol und env transient transfiziert. Um zu gewährleisten, dass jede Zelle funktionsfähige Retroviren generieren kann, müssen die Zellen vor der Transfektion mit dem zu verpackenden Plasmid für die Expression der Virusgene selektioniert werden. Gag und pol sind auf einem Plasmid zusammen mit einer Hygromycin-Resistenz kodiert, für env kann mit Diphtherie-Toxin selektioniert werden. Hierfür werden die Phoenix-Zellen über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen mit 300 µg/ml Hygromycin B- und 1 µg/ml Diphtherietoxin-Zusatz kultiviert.

7.3.7 Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse)

Die Transfektionseffizienz kann durchflusszytometrisch bestimmt werden, wenn der zur Transfektion verwendete Vektor für ein fluorochromes Protein kodiert. Bicistronische Vektoren können neben dem zu untersuchenden Gen ein zweites Gen beinhalten, das z. B. für ein Fluorochrom kodiert. Der verwendete MSCV MIG-RI Vektor beispielsweise kodiert für das grün fluoreszierende Protein GFP, der MSCV MIY Vektor für gelb fluoreszierende Protein (YFP). In beiden Vektoren wird das Fluorochrom über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES), die sich im 3' stromabwärts von dem zu untersuchenden Gen befindet, angesteuert. Somit werden beide Gene zu einer gemeinsamen mRNA transkribiert. Von diesem Transkript erfolgt die parallele Translation der beiden Gene zu einzelnen Proteinen, wobei die IRES die Translation des zweiten Gens vermittelt. Somit exprimieren alle erfolgreich transfizierten Zellen zusätzlich GFP und können darüber im Durchflusszytometer (FACScan) detektiert werden. Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, dass die Elektronen der Fluorochrome, angeregt durch einen Argon-Laser, auf ein höheres Energieniveau gehoben werden und unter Abgabe von Energie in Form von Licht spezifischer Wellenlänge auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen. Die Zellen fließen einzeln in einem Trägerstrom durch ein Rohr, wobei das emittierte Licht von einem Detektor erfasst wird. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge des Fluorochroms. Somit können auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens gezogen werden. Zusätzlich werden über die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im *forward scatter*, FS) und die Granularität der Zelle (im *sideward scatter*, SS) gewonnen. Um den Anteil der GFP-positiven Zellen nach Lipofektion, Elektroporation oder retroviraler Transduktion zu bestimmen, werden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in PBS aufgenommen, durch ein Zellsieb (40 µm) pipettiert und im Durchflusszytometer

gemessen. Der Anteil der GFP-positiven Zellen wird nach der Messung als Punktwolkendiagramm oder Histogramm dargestellt.

7.3.8 Selektion mit Puromycin

Sowohl durch transiente als auch durch retrovirale Transfektion können nur in den seltensten Fällen Transfektionseffizienzen von über 90 % erreicht werden. Für viele Versuchsansätze wird jedoch eine reine Population an transfizierten Zellen benötigt. Trägt das transfizierte Plasmid einen Fluoreszenzmarker, so können die Zellen durch durchflusszytometrische Methoden sortiert werden. Kodiert das Plasmid für eine Antibiotikaresistenz, werden durch Zugabe des Antibiotikums zum Kulturmedium die nichttransfizierten Zellen getötet und die transfizierten Zellen auf diese Weise selektioniert. Die optimale Konzentration eines jeden Antibiotikums muss für jede Zelllinie mittels Verdünnungsreihen ermittelt werden. Hier wurde Puromycin für 32D- und Ba/F3-Zellen in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt.

7.3.9 Herstellung von Einzelklonen

Infiziert man Zellen mit Retroviren, so erhält man eine Mischkultur, einen so genannten Massenklon. Die einzelnen Zellen dieser Kultur exprimieren das transduzierte Gen unterschiedlich stark, abhängig davon, wie häufig das retrovirale Konstrukt ins Zell-Genom integriert ist und auch an welcher Stelle. Die Lokalisierung von großer Wichtigkeit, da die Integration in Regionen starker oder schwacher Transkription erfolgen kann. Je nachdem, ob eine starke oder eine schwache Expression des transduzierten Genes erforderlich ist, müssen stark oder schwach exprimierende Einzelklone generiert werden. Hierfür wird die Zellzahl des Massenklangs bestimmt und eine Konzentration von 0,5 Zellen/200 µl Kulturmedium hergestellt. Je 200 µl der Suspension werden pro Schale auf 96-Schalen-Platten ausplattiert.

7.4 Proteinbiochemische Methoden

7.4.1 Herstellung von Zellysaten

Nach Zentrifugation der zu lysierenden Zellen wird das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen direkt der Lyse zugeführt oder für spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Pellet wird in frisch hergestelltem, eiskaltem Lysis-Puffer resuspendiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 Upm, 20 min, 4°C) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung durchgeführt (Kapitel 7.4.2). Im Anschluss werden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine die Lösung 5 min bei 95°C gekocht. Nach kurzer Zentrifugation kann das Proteingemisch durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 7.4.3) aufgetrennt werden.

Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100; 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM Natriumfluorid; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Proteaseinhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d
SDS-Probenpuffer (2x):	1 M Tris/HCl, pH 6,8; 200 mM DTT; 4 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycin in A.d.

7.4.2 Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinmenge der Zellysate wird mit der Methode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) mit Hilfe des *DC Protein Assay* Proteinbestimmungskits nach Herstellerangaben bestimmt. Für den Einsatz in die Reaktion wird das Lysat 1:5 mit frischem Lysispuffer verdünnt.

Diese Methode beruht darauf, dass die Proteine zunächst mit einem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. In einem nachfolgenden Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit dem Cu^{2+} komplexierten Proteine. Der Kupfer-Protein Komplex bewirkt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat von der Wertigkeitsstufe VI zur Wertigkeitsstufe IV. Die Reduktion des Folin-Reagenzes erfolgt, nachdem vermutlich Cu^{2+} im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert wird. Die aromatischen Aminosäurereste

Tyrosin und Tryptophan reduzieren darüber hinaus das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexierung mit dem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz. Die Reduktion führt zu einem Farbumschlag des Folin-Reagenz von gelb nach blau. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt.

DC Protein Assay Proteinbestimmungskit

7.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Das Gel setzt sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammen. Der Auftrennungsbereich der Proteine kann durch Variation der Trenngelporengröße, also durch variierende Polyacrylamid-Konzentration (5-15 %), festgelegt werden. Dem Gel wird Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, das sehr fest an Proteine bindet und sie in eine stabähnliche Form entfaltet (denaturiert).

Sofort nach dem Gießen wird das Trenngel mit Isopropanol oder überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation bei Raumtemperatur wird das Isopropanol abgegossen und die Reste mit einem saugfähigen Tuch entfernt. Anschließend wird das Gel mit einem Sammelgel überschichtet und sofort ein Kamm eingesetzt. Das Gel wird senkrecht in die entsprechende Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Das Pufferreservoir für die Kathode und die Anode wird mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die vorbereiteten hitzedenaturierten Proteine (aus den Kapiteln 2.2.4.1 und 2.2.4.2) werden in die Probenaschen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung (25-140 Volt) aufgetrennt. Ein Molekulargewichtsmarker, der aus farbstoffmarkierten Proteinen definierten Molekulargewichts besteht, wird zum Molekulargewichtvergleich auf einer Spur des Gels aufgetragen. Nach dem Lauf wird das Gel aus der Kammer entnommen und die Proteine werden auf eine PVDF-Membran transferiert (Kapitel 7.4.4).

Trenngel:	5-15 % Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,3 % APS; 0,1 % TEMED
Sammelgel:	5 % Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,3 % APS; 0,1 % TEMED
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS in A.d.

7.4.4 Transfer von Proteinen auf PVDF Membranen (Westernblot)

Unter Western Blot versteht man den Transfer von zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Proteinbindende Membran. In dieser Arbeit wurde das *wet blot*-Verfahren angewendet. Hierfür wird eine in Methanol equilibrierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und zwischen zwei Schichten aus Zellulosefilterkarton (*Whatmann-Papier*) in der Vorrichtung eingespannt. Diese wird entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei konstanter Stromstärke von 1 A. Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine (etwa 1 min pro kDa).

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol in A.d.

7.4.5 Immunihistochemischer Nachweis von transferierten Proteinen

Bei der Immunfärbung werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert, der wiederum mittels eines Chemolumineszenz-Systems nachgewiesen werden kann. Die Membran wird in PBST-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C in Blockierlösung inkubiert. Das Blocken dient der Minimierung unspezifischer Signale bei dem immunchemischen Nachweis durch Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen auf der Membran. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgt über Nacht bei 4°C. Danach wird die Membran dreimal für je 10 min in PBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wird die Membran bei RT mit einem gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert.

Nach erneutem Waschen wird die Membran mit Chemolumineszenz-Substrat-Lösung (*SuperSignal West*) inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt. Das so erzeugte Signal kann einen Hyperfilm belichten, der das Ergebnis dokumentiert.

PBS-Tween-(PBST)-Puffer: 0,1 % Tween 20 in PBS

Blockierlösung: 10 % Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS-Tween-Puffer;
5 % BSA in PBS-Tween-Puffer

SuperSignal West

7.5 Biologische Untersuchungen

7.5.1 Messung der proliferativen Aktivität

Die Messung der proliferativen Aktivität wird mit dem „CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft, viabler, proliferierender, metabolisch aktiver Zellen, die Substanz MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazoliumsalz) zu Formazan reduzieren zu können. Hierbei kommt es zu einem bei 490 nm messbaren Farbumschlag von gelb zu braun.

Für jede Probe und jeden Messzeitpunkt werden Dreifachwerte angefertigt. Hierzu werden 3000 Ba/F3- oder 32D-Zellen pro Loch in Flachboden-96-Loch-Platten ausgesät und im Inkubator bei normalen Zellkulturbedingungen gelagert. Der Leerwert wird in Kavitäten bestimmt, die nur mit Medium ohne Zellen beschickt sind. Um die proliferative Aktivität der Zellen zu messen, werden zum jeweiligen Messzeitpunkt 20 µl MTS pro Loch zugegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 490 nm wird anschließend mit dem Elisareader ausgelesen.

CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay

7.5.2 Methylzellulose-Assay

Die Transformationskapazität FLT3 ITD oder FLT3 TKD positiver Zellen kann mit Hilfe des CFU-Ansatzes bestimmt werden. Hierfür wird die Zellzahl genau bestimmt und eine Zellsuspension entsprechend 10000 Zellen/ml in Hank's BSS hergestellt. Diese Zellen werden in einer Konzentration von 500 Zellen/ml in Methylzellulosemedium in 6-Loch-Platten ausgesät und 5 bis 10 Tage bei 37°C im Brutschank inkubiert.

Transformierende Zellen besitzen die Fähigkeit, sich selbst in Medium ohne Zytokin-Zusatz zu wachsen, während normale Zellen abhängig sind von zugesetzten Zytokinen. Im semisoliden Methylzellulose-Medium können sich diese Zellen jedoch nicht verteilen. Somit entstehen Zellhaufen, die nach entsprechender Inkubationszeit mit einem inversen Mikroskop ausgezählt werden können. Weiterhin können dem Medium spezifische Inhibitoren zur Untersuchung ihrer Wirksamkeit auf onkogene Transformation zugesetzt werden.

Methocult® 3234

8 Literaturverzeichnis

Abu-Duhier, F.M., Goodeve, A.C., Wilson, G.A., Care, R.S., Peake, I.R. und Reilly, J.T. (2001) Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *Br J Haematol* 113(4): 1076-7.

Abu-Duhier, F.M., Goodeve, A.C., Wilson, G.A., Gari, M.A., Peake, I.R., Rees, D.C., Vandenberghe, E.A., Winship, P.R. und Reilly, J.T. (2000) FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 111(1): 190-5.

Appelbaum, F.R. (2001) Who should be transplanted for AML? *Leukemia* 15(4): 680-2.

Auclair, D., Miller, D., Yatsula, V. *et al.* (2007) Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia* 21(3): 439-45.

Bennett, J.M., Andersen, J.W. und Cassileth, P.A. (1991) Long term survival in acute myeloid leukemia: the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) experience. *Leuk Res* 15(4): 223-7.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. und Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33(4): 451-8.

Blume-Jensen, P. und Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411(6835): 355-65.

Bohmer, F.D., Karagoyozov, L., Uecker, A., Serve, H., Botzki, A., Mahboobi, S. und Dove, S. (2003) A single amino acid exchange inverts susceptibility of related receptor tyrosine kinases for the ATP site inhibitor STI-571. *J Biol Chem* 278(7): 5148-55.

Buchner, T., Hiddemann, W., Schoch, C., Haferlach, T., Sauerland, M.C. und Heinecke, A. (2001) Acute myeloid leukaemia (AML): treatment of the older patient. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(1): 139-51.

- Burnett, A., Wetzler, M. und Lowenberg, B. (2011) Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 29(5): 487-94.
- Camps, C., Felip, E., Sanchez, J.M., Massuti, B., Artal, A., Paz-Ares, L., Carrato, A., Alberola, V., Blasco, A., Baselga, J., Astier, L., Voi, M. und Rosell, R. (2005) Phase II trial of the novel taxane BMS-184476 as second-line in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 16(4): 597-601.
- Carow, C.E., Levenstein, M., Kaufmann, S.H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Borowitz, M.J., Civin, C.I. und Small, D. (1996) Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 87(3): 1089-96.
- Cassileth, P.A., Harrington, D.P., Appelbaum, F.R., Lazarus, H.M., Rowe, J.M., Paietta, E., Willman, C., Hurd, D.D., Bennett, J.M., Blume, K.G., Head, D.R. und Wiernik, P.H. (1998) Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 339(23): 1649-56.
- Chantry, A.D., Snowden, J.A., Craddock, C., Peggs, K., Roddie, C., Craig, J.I., Orchard, K., Towson, K.E., Pearce, R.M. und Marks, D.I. (2006) Long-term outcomes of myeloablation and autologous transplantation of relapsed acute myeloid leukemia in second remission: a British Society of Blood and Marrow Transplantation registry study. *Biol Blood Marrow Transplant* 12(12): 1310-7.
- Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Bohmer, F.D., Berdel, W.E., Muller-Tidow, C. und Serve, H. (2007) Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 110(1): 370-4.
- Choudhary, C., Muller-Tidow, C., Berdel, W.E. und Serve, H. (2005) Signal transduction of oncogenic Flt3. *Int J Hematol* 82(2): 93-9.
- Choudhary, C., Olsen, J.V., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P.N., Bohmer, F.D., Gerke, V., Schmidt-Arras, D.E., Berdel, W.E., Muller-Tidow, C., Mann, M. und Serve, H. (2009) Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell* 36(2): 326-39.
- Chu, S.C., Tang, J.L. und Li, C.C. (2006) Dasatinib in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 355(10): 1062-3; author reply 1063-4.
- Cortes, J. (2009) AC220, a potent, selective second generation FLT3 receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor, in a first in human (FIH) phase 1 AML study. *Blood* 114(114).
- Dash, A. und Gilliland, D.G. (2001) Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 14(1): 49-64.
- Dos Santos, C., Demur, C., Bardet, V., Prade-Houdellier, N., Payrastre, B. und Recher, C. (2008) A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood* 111(4): 2269-79.
- Druker, B.J. (2001) Imatinib: A Viewpoint by Brian J. Druker. *Drugs* 61(12): 1775-1776.

Estey, E. und Dohner, H. (2006) Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368(9550): 1894-907.

Fabbro, D., Ruetz, S., Bodis, S., Pruschy, M., Csermak, K., Man, A., Campochiaro, P., Wood, J., O'Reilly, T. und Meyer, T. (2000) PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer Drug Des* 15(1): 17-28.

Faivre, S., Delbaldo, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., Bello, C., Deprimo, S., Brega, N., Massimini, G., Armand, J.P., Scigalla, P. und Raymond, E. (2006) Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 24(1): 25-35.

Fenski, R., Flesch, K., Serve, S., Mizuki, M., Oelmann, E., Kratz-Albers, K., Kienast, J., Leo, R., Schwartz, S., Berdel, W.E. und Serve, H. (2000) Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol* 108(2): 322-30.

Fiedler, W., Serve, H., Dohner, H. *et al.* (2005) A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* 105(3): 986-93.

Fischer, T., Stone, R.M., Deangelo, D.J. *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. *J Clin Oncol* 28(28): 4339-45.

Frohling, S., Schlenk, R.F., Breittruck, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Dohner, H. und Dohner, K. (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.

Furukawa, Y., Vu, H.A., Akutsu, M., Odgerel, T., Izumi, T., Tsunoda, S., Matsuo, Y., Kirito, K., Sato, Y., Mano, H. und Kano, Y. (2007) Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines. *Leukemia* 21(5): 1005-14.

Gilliland, D.G. und Griffin, J.D. (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100(5): 1532-42.

Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J. und Saxena, K. (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 13(2): 169-78.

Grimwade, D. und Hills, R.K. (2009) Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 385-95.

Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C. und Duyster, J. (2005) FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 105(12): 4792-9.

- Grundler, R., Thiede, C., Miething, C., Steudel, C., Peschel, C. und Duyster, J. (2003) Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3 receptor. *Blood* 102(2): 646-51.
- Guerrouahen, B.S., Wieder, E., Blanchard, E.G., Lee, F.Y., Aplenc, R. und Corey, S.J. (2009) Flow cytometric determination of Src phosphorylation in pediatric patients treated with dasatinib. *Pediatr Blood Cancer* 53(6): 1132-5.
- Haferlach, T. und Schoch, C. (2002) [WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS)]. *Dtsch Med Wochenschr* 127(9): 447-50.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. und Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241(4861): 42-52.
- Heiss, E., Masson, K., Sundberg, C., Pedersen, M., Sun, J., Bengtsson, S. und Ronnstrand, 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.
- Horiike, S., Yokota, S., Nakao, M., Iwai, T., Sasai, Y., Kaneko, H., Taniwaki, M., Kashima, K., Fujii, H., Abe, T. und Misawa, S. (1997) Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia* 11(9): 1442-6.
- Ikezoe, T., Nishioka, C., Tasaka, T., Yang, Y., Komatsu, N., Togitani, K., Koeffler, H.P. und Taguchi, H. (2006) The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther* 5(10): 2522-30.
- Illmer, T. und Ehninger, G. (2007) FLT3 kinase inhibitors in the management of acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 8 Suppl 1: S24-34.
- Jaffe, E.S. (2009) The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 523-31.
- Kancha, R.K., Grundler, R., Peschel, C. und Duyster, J. (2007) Sensitivity toward sorafenib and sunitinib varies between different activating and drug-resistant FLT3-ITD mutations. *Exp Hematol* 35(10): 1522-6.
- Kelly, L.M., Liu, Q., Kutok, J.L., Williams, I.R., Boulton, C.L. und 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.
- Kindler, T., Lipka, D.B. und Fischer, T. (2010) FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood* 116(24): 5089-102.

Kiyoi, H. und Naoe, T. (2002) FLT3 in human hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 43(8): 1541-7.

Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H. und 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* 12(9): 1333-7.

Konig, H., Holtz, M., Modi, H., Manley, P., Holyoake, T.L., Forman, S.J. und Bhatia, R. (2008) Enhanced BCR-ABL kinase inhibition does not result in increased inhibition of downstream signaling pathways or increased growth suppression in CML progenitors. *Leukemia* 22(4): 748-55.

Kopetz, S., Lesslie, D.P., Dallas, N.A., Park, S.I., Johnson, M., Parikh, N.U., Kim, M.P., Abbruzzese, J.L., Ellis, L.M., Chandra, J. und Gallick, G.E. (2009) Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res* 69(9): 3842-9.

Kottaridis, P.D., Gale, R.E., Frew, M.E., Harrison, G., Langabeer, S.E., Belton, A.A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D.T., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. und Linch, D.C. (2001) The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98(6): 1752-9.

Lee, B.H., Williams, I.R., Anastasiadou, E., Boulton, C.L., Joseph, S.W., Amaral, S.M., Curley, D.P., Duclos, N., Huntly, B.J., Fabbro, D., Griffin, J.D. und Gilliland, D.G. (2005) FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. *Oncogene* 24(53): 7882-92.

Levis, M., Allebach, J., Tse, K.F., Zheng, R., Baldwin, B.R., Smith, B.D., Jones-Bolin, S., Ruggeri, B., Dionne, C. und Small, D. (2002) A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 99(11): 3885-91.

Lombardo, L.J., Lee, F.Y., Chen, P. *et al.* (2004) Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 47(27): 6658-61.

Lowenberg, B., Downing, J.R. und Burnett, A. (1999) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341(14): 1051-62.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-75.

Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. und Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108(1): 1-6.

Masson, K. und Ronnstrand, L. (2009) Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cell Signal* 21(12): 1717-26.

Mead, A.J., Linch, D.C., Hills, R.K., Wheatley, K., Burnett, A.K. und Gale, R.E. (2007) FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 110(4): 1262-70.

Metzelder, S., Wang, Y., Wollmer, E., Wanzel, M., Teichler, S., Chaturvedi, A., Eilers, M., Enghofer, E., Neubauer, A. und Burchert, A. (2009) Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 113(26): 6567-71.

Meyer, T., Regenass, U., Fabbro, D., Alteri, E., Rosel, J., Muller, M., Caravatti, G. und Matter, A. (1989) A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. *Int J Cancer* 43(5): 851-6.

Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H. *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.

Mollgard, L., Deneberg, S., Nahi, H., Bengtzen, S., Jonsson-Videsater, K., Fioretos, T., Andersson, A., Paul, C. und Lehmann, S. (2008) The FLT3 inhibitor PKC412 in combination with cytostatic drugs in vitro in acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 62(3): 439-48.

Moreno, I., Martin, G., Bolufer, P., Barragan, E., Rueda, E., Roman, J., Fernandez, P., Leon, P., Mena, A., Cervera, J., Torres, A. und Sanz, M.A. (2003) Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 88(1): 19-24.

Motzer, R.J., Bolger, G.B., Boston, B. *et al.* (2006) Kidney cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 4(10): 1072-81.

O'Farrell, A.M., Abrams, T.J., Yuen, H.A. *et al.* (2003) SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101(9): 3597-605.

Pear, W.S., Miller, J.P., Xu, L., Pui, J.C., Soffer, B., Quackenbush, R.C., Pendergast, A.M., Bronson, R., Aster, J.C., Scott, M.L. und Baltimore, D. (1998) Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92(10): 3780-92.

Polo, S., Pece, S. und Di Fiore, P.P. (2004) Endocytosis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 16(2): 156-61.

Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., Jones, D., Nicaise, C., O'Brien, S., Giles, F., Talpaz, M. und Cortes, J. (2007) Dasatinib (BMS-354825) is active in Philadelphia chromosome-

positive chronic myelogenous leukemia after imatinib and nilotinib (AMN107) therapy failure. *Blood* 109(2): 497-9.

Ravandi, F., Cortes, J.E., Jones, D. *et al.* Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28(11): 1856-62.

Ravandi, F., Cortes, J.E., Jones, D. *et al.* (2010) Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28(11): 1856-62.

Razumovskaya, E., Masson, K., Khan, R., Bengtsson, S. und Ronnstrand, L. (2009) Oncogenic Flt3 receptors display different specificity and kinetics of autophosphorylation. *Exp Hematol* 37(8): 979-89.

Reindl, C., Bagrintseva, K., Vempati, S., Schnittger, S., Ellwart, J.W., Wenig, K., Hopfner, K.P., Hiddemann, W. und Spiekermann, K. (2006) Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 107(9): 3700-7.

Robinson, L.J., Xue, J. und Corey, S.J. (2005) Src family tyrosine kinases are activated by Flt3 and are involved in the proliferative effects of leukemia-associated Flt3 mutations. *Exp Hematol* 33(4): 469-79.

Rocnik, J.L., Okabe, R., Yu, J.C., Lee, B.H., Giese, N., Schenkein, D.P. und Gilliland, D.G. (2006) Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 108(4): 1339-45.

Rosnet, O., Buhring, H.J., deLapeyriere, O., Beslu, N., Lavagna, C., Marchetto, S., Rappold, I., Drexler, H.G., Birg, F., Rottapel, R., Hannum, C., Dubreuil, P. und Birnbaum, D. (1996) Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol* 95(3-4): 218-23.

Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O. und Birnbaum, D. (1991) Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 6(9): 1641-50.

Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M.J., Marchetto, S., Tonnel, C., Toiron, Y., Birg, F. und Birnbaum, D. (1993) Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82(4): 1110-9.

Roszkiewicz, F., Garidi, R., Vaida, I., Royer, B., Parcelier, A., Marolleau, J.P. und Damaj, G. (2009) Tyrosine kinase inhibitors and solid tumours: case report and review of the literature. *Pharmacology* 84(1): 38-41.

Rowe, J.M. (2009) Closer to the truth in AML. *Blood* 113(18): 4129-30.

Rowe, J.M. (2010) The evolving paradigm of prognostic factors in AML: Introduction to the Acute Leukemia Forum 2010. *Best Pract Res Clin Haematol* 23(4): 453-6.

- Rowe, J.M. und Tallman, M.S. (2010) How I treat acute myeloid leukemia. *Blood* 116(17): 3147-56.
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E.F. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sawyers, C.L., Hochhaus, A., Feldman, E. *et al.* (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99(10): 3530-9.
- Schessl, C., Rawat, V.P., Cusan, M. *et al.* (2005) The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* 115(8): 2159-68.
- Schittenhelm, M.M., Shiraga, S., Schroeder, A., Corbin, A.S., Griffith, D., Lee, F.Y., Bokemeyer, C., Deininger, M.W., Druker, B.J. und Heinrich, M.C. (2006) Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res* 66(1): 473-81.
- Schlenk, R.F., Dohner, K., Krauter, J., Frohling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A. und Dohner, H. (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358(18): 1909-18.
- Schmidt-Arras, D., Bohmer, S.A., Koch, S., Muller, J.P., Blei, L., Cornils, H., Bauer, R., Korasikha, S., Thiede, C. und Bohmer, F.D. (2009) Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood* 113(15): 3568-76.
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Loffler, H., Sauerland, C.M., Serve, H., Buchner, T., Haferlach, T. und Hiddemann, W. (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100(1): 59-66.
- Serve, H. (2010) Sorafenib In Combination with Standard Induction and Consolidation Therapy In Elderly AML Patients: Results From a Randomized, Placebo-Controlled Phase II Trial. *Blood*.
- Shewchuk, L.M., Hassell, A.M., Ellis, B., Holmes, W.D., Davis, R., Horne, E.L., Kadwell, S.H., McKee, D.D. und Moore, J.T. (2000) Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail. *Structure* 8(11): 1105-13.
- Shipley, J.L. und Butera, J.N. (2009) Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 37(6): 649-58.
- Smith, B.D., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K.M., Dausess, T., Allebach, J. und Small, D. (2004) Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows

biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 103(10): 3669-76.

Stone, R.M., DeAngelo, D.J., Klimek, V. *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.

Strumberg, D. (2005) Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)* 41(12): 773-84.

Talpaz, M., Shah, N.P., Kantarjian, H. *et al.* (2006) Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 354(24): 2531-41.

Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schakel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhauser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. und Illmer, T. (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99(12): 4326-35.

Tse, K.F., Mukherjee, G. und Small, D. (2000) Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 14(10): 1766-76.

Vempati, S., Reindl, C., Wolf, U., Kern, R., Petropoulos, K., Naidu, V.M., Buske, C., Hiddemann, W., Kohl, T.M. und Spiekermann, K. (2008) Transformation by oncogenic mutants and ligand-dependent activation of FLT3 wild-type requires the tyrosine residues 589 and 591. *Clin Cancer Res* 14(14): 4437-45.

Wei, G., Rafiyath, S. und Liu, D. (2010) First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J Hematol Oncol* 3: 47.

Weisberg, E., Boulton, C., Kelly, L.M., Manley, P., Fabbro, D., Meyer, T., Gilliland, D.G. und Griffin, J.D. (2002) Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 1(5): 433-43.

Wheeler, T.T., Broadhurst, M.K., Sadowski, H.B., Farr, V.C. und Prosser, C.G. (2001) Stat5 phosphorylation status and DNA-binding activity in the bovine and murine mammary glands. *Mol Cell Endocrinol* 176(1-2): 39-48.

Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L. *et al.* (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64(19): 7099-109.

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y. *et al.* (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97(8): 2434-9.

Yanada, M., Matsuo, K., Suzuki, T., Kiyoi, H. und Naoe, T. (2005) Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 19(8): 1345-9.

Yeatman, T.J. (2004) A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4(6): 470-80.

Yee, K.W., Schittenhelm, M., O'Farrell, A.M., Town, A.R., McGreevey, L., Bainbridge, T., Cherrington, J.M. und Heinrich, M.C. (2004) Synergistic effect of SU11248 with cytarabine or daunorubicin on FLT3 ITD-positive leukemic cells. *Blood* 104(13): 4202-9.

Yokota, S., Kiyoi, H., Nakao, M., Iwai, T., Misawa, S., Okuda, T., Sonoda, Y., Abe, T., Kahsima, K., Matsuo, Y. und Naoe, T. (1997) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 11(10): 1605-9.

Zhang, S., Huang, W.C., Li, P., Guo, H., Poh, S.B., Brady, S.W., Xiong, Y., Tseng, L.M., Li, S.H., Ding, Z., Sahin, A.A., Esteva, F.J., Hortobagyi, G.N. und Yu, D. (2011) Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* 17(4): 461-9.

Zhang, W., Konopleva, M., Ruvolo, V.R., McQueen, T., Evans, R.L., Bornmann, W.G., McCubrey, J., Cortes, J. und Andreeff, M. (2008) Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia* 22(4): 808-18.

9 **Abbildungsverzeichnis**

Tab. 1: Altersverteilung von AML Patienten in Deutschland (nach Hellenbrecht A 2003).	4
Tab.2: Klassifikation der AML.....	6
Abb. 2.1: <i>Two-hit</i> Hypothese der AML Pathogenese	7
Abb. 2.2: Der Aufbau und die Aktivierung von FLT3.....	8
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der FLT3-Struktur und die Lokalisation der zwei häufigsten aktivierenden Mutationen bei AML Patienten.	10
Abb. 2.4: Strukturformel von PKC412	12
Abb. 2.5: Strukturformel von Dasatinib.....	13
Abb. 2.6: Strukturformel von Sorafenib	14
Abb. 2.7: Strukturformel von Sunitinib.....	15
Abb. 4.1: FLT3 ITD und FLT3 TKD Mutationen führen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors.	19
Abb. 4.2: Der Transkriptionsfaktor STAT5 wird durch FLT3 ITD jedoch nicht durch FLT3 TKD aktiviert.	20
Abb. 4.3: Proliferation unterschiedlicher FLT3 Mutanten in 32D oder MV4-11 Zellen (FLT3 ITD positiv).....	21
Abb. 4.4: Einfluss des Inhibitors PKC412 auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.....	22

Abb. 4.5: Einfluss des Inhibitors Dasatinib auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.....	23
Abb. 4.6: Einfluss des Inhibitors Sorafenib auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.....	24
Abb. 4.7: Einfluss des Inhibitors Sunitinib auf die proliferative Aktivität FLT3 ITD- und FLT3 TKD-positiver humaner und muriner Zellen.....	26
Abb. 4.8: Einfluss der Kombination von Sorafenib und Dasatinib auf FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-positive Zellen.	28
Abb. 4.9: Einfluss der Kombination von Sunitinib und Dasatinib auf FLT3 ITD- oder FLT3 TKD-positive Zellen.	29
Abb. 4.10: Koloniebildung FLT3 ITD-positiver muriner 32D-Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.	31
Abb. 4.11: Koloniebildung FLT3 TKD-positiver muriner 32D-Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.	31
Abb. 4.12: Koloniebildung FLT3 ITD-positiver humaner MV4-11 Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.	32
Abb. 4.13: Koloniebildung von parentalen, IL3-stimulierten, murinen 32D-Zellen unter PKC412- und Dasatinib-Behandlung.....	33

10 Danksagung

Da diese Arbeit ohne eine Menge an Menschen nicht möglich gewesen wäre, möchte ich versuchen, mich in den folgenden Zeilen bei allen zu bedanken:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die aktive Betreuung dieser Arbeit, im Rahmen derer meine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten geweckt und gefördert wurde.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel möchte ich mich dafür bedanken, diese Dissertation im Hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München anfertigen zu dürfen.

Ohne meine Betreuerin Frau Dr. Rebekka Grundler, die mir nicht nur immer mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern u.a. initial ein essentielles Verständnis für wissenschaftliches Arbeiten vermittelte, wäre ich heute nicht da, wo ich bin.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen AG Duyster bedanken. Vielen Dank für Eure Freundlichkeit, Fachwissen und Hilfsbereitschaft!

Dr. Corinna Albers angemessen zu danken würde den Rahmen dieser Promotion sprengen, weshalb ich mich einfach von Herzen bei Dir bedanken möchte.

Meiner Familie gebührt mein Dank, denn ohne Eure Unterstützung und Einfluss, direkt oder indirekt, wäre ich nicht die Wege gegangen bzw. hätte sie gehen können, die ich gegangen bin!

11 Publikationen

Leischner H, Grundler R, Albers C, Götze K, Peschel C and Duyster J.

„Combination of c-SRC and FLT3 inhibitors has an additive inhibitory effect on FLT3 ITD but not on FLT3 TKD positive cells.“ 52nd ASH Annual Meeting and Exposition Orlando Florida