

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Charakterisierung von AML-assoziierten FLT3-Rezeptortyrosinkinasevarianten im Zell- und Mausmodell

Rebekka Grundler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 17.05.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 22.09.2005 angenommen.

Meinen Eltern
und Torsten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Signaltransduktion	1
1.2	Proteinkinasen	2
1.3	Rezeptortyrosinkinasen	3
1.3.1	Einteilung und Struktur der Rezeptortyrosinkinasen	3
1.3.2	Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen	4
1.3.3	Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinasen	5
1.4	Die Rezeptortyrosinkinase FLT3	6
1.4.1	Struktur und Regulation des FLT3-Rezeptors	6
1.4.2	FLT3 in der Hämatopoese	7
1.4.3	Bedeutung von FLT3 bei leukämischen Erkrankungen	9
1.4.4	Mutationen des FLT3-Rezeptors bei leukämischen Erkrankungen	10
1.4.4.1	FLT3 <i>internal tandem duplications</i> (FLT3-ITD)	10
1.4.4.2	Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von FLT3	11
1.4.5	FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren	12
1.5	Aufgabenstellung	13
2	Materialien und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Chemikalien und biogene Substanzen	15
2.1.2	Medien und Supplemente für die Zellkultur	16
2.1.3	Enzyme	17
2.1.4	Antikörper	18
2.1.5	Zelllinien	18
2.1.6	Vektoren und DNA-Konstrukte	19
2.1.7	Bakterienstämme	20
2.1.8	Tyrosinkinaseinhibitoren	20
2.1.9	Oligonukleotide zur Einführung von Mutationen in DNA-Konstrukte	20
2.1.10	Oligonukleotide für die RT-PCR	20
2.1.11	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	21
2.1.12	Mäuse und tierexperimentelle Materialien	21
2.1.13	Molekularbiologische Kitsysteme	21
2.1.14	Standard Geräte	22
2.1.15	Standard Lösungen und Puffer	23
2.2	Methoden	25
2.2.1	Molekularbiologische Arbeitstechniken	25
2.2.1.1	Restriktionsverdau	25
2.2.1.2	5'-Dephosphorylierung von DNA	25
2.2.1.3	Agarosegelelektrophorese	26
2.2.1.4	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen	26

2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.2.1.7	Isolierung genomischer DNA aus murinen Zellen	28
2.2.1.8	Transfer von DNA auf eine Nylon-Membran (Southern-Blot)	28
2.2.1.9	Hybridisierung der Membran mit [α - 32 P] dCTP markierter DNA-Sonde	29
2.2.1.10	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	29
2.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.2.2	Arbeiten mit Bakterien	32
2.2.2.1	Kulturbedingungen.....	32
2.2.2.2	Kompetente Bakterien	32
2.2.2.3	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	33
2.2.2.4	Kultivierung der transformierten Bakterien	33
2.2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi Präparation).....	33
2.2.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien	34
2.2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	34
2.2.3.2	Kryokonservierung von Zellen	35
2.2.3.3	Auftauen von Zellen.....	35
2.2.3.4	Bestimmung der Zellzahl	35
2.2.3.5	Transfektionsmethoden	35
2.2.3.6	Selektion der Virusverpackungszelllinie	38
2.2.3.7	Durchflusszytometrische Messung der EGFP-Expression (FACS-Analyse) ..	38
2.2.3.8	Titerbestimmung	39
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.4.1	Herstellung von Zelllysaten.....	39
2.2.4.2	Immunpräzipitation	40
2.2.4.3	SDS-Gelelektrophorese.....	40
2.2.4.4	Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot).....	41
2.2.4.5	Immunchemischer Nachweis von transferierten Proteinen	42
2.2.4.6	Entfernen gebundener Antikörper von der Membran	42
2.2.5	Biologische Untersuchungen	43
2.2.5.1	Messung der proliferativen Aktivität.....	43
2.2.5.2	Apoptose-Messung.....	43
2.2.6	Tiermodell	44
2.2.6.1	Präparation von Knochenmarkzellen aus Spendermäusen.....	44
2.2.6.2	Prästimulation von murinen Knochenmarkzellen.....	44
2.2.6.3	Retrovirale Transduktion der Knochenmarkzellen	45
2.2.6.4	Knochenmarktransplantation	45
2.2.6.5	Überwachung der transplantierten Mäuse.....	45
2.2.6.6	Hypotone Lyse von Erythrozyten.....	46
2.2.6.7	Aufbereitung von Organen transplantierte Mäuse	46
2.2.6.8	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Charakterisierung verschiedener Mutanten des FLT3-Rezeptors im Zellmodell	48
3.1.1	Herstellung der FLT3-Rezeptormutanten	48
3.1.2	Konstitutive Aktivierung der mutierten FLT3-Rezeptoren	50
3.1.3	Transformierende Aktivität der FLT3 I839-Mutanten in Ba/F3- und 32D-Zellen.	52
3.1.3.1	Selektion durch kompetitiven Proliferationsvorteil	52

3.1.3.2	Faktorunabhängige Proliferation.....	54
3.1.4	Aktivierung von Signalwegen durch die FLT3 I839-Mutanten in Ba/F3-Zellen...	55
3.1.5	Variable Sensitivität verschiedener FLT3-Rezeptormutanten gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren	57
3.1.5.1	Sensitivität gegenüber AG1296	57
3.1.5.2	Sensitivität gegenüber PKC412.....	61
3.1.5.3	Sensitivität gegenüber SU5614	64
3.2	Koexpression von FLT3-WT und FLT3-ITD	68
3.3	Charakterisierung verschiedener Mutanten des FLT3-Rezeptors im Mausmodell	72
3.3.1	Das murine Knochenmarktransplantationsmodell	72
3.3.2	Retroviraler Gentransfer	73
3.3.3	Die FLT3-Expression korreliert mit der Transduktionseffizienz	75
3.3.4	Übersicht der FLT3-ITD Transplantationsexperimente.....	77
3.3.5	FLT3-ITD induziert eine myeloproliferative Erkrankung im Mausmodell	78
3.3.6	Die Anzahl transplanteder Zellen und die Expressionsintensität des FLT3-Proteins beeinflusst die Latenzzeit einer FLT3-induzierten myeloproliferativen Erkrankung	82
3.3.7	FLT3 TKD-Mutanten induzieren im Mausmodell lymphatische Erkrankungen mit unterschiedlicher hämatologischer Manifestierung.....	84
3.3.8	Vergleich der durch FLT3-ITD und FLT3 TKD-Mutanten induzierten Erkrankungen	90
4	Diskussion	96
4.1	Untersuchung der transformierenden Eigenschaften im Zellmodell	96
4.2	Untersuchung der Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren	100
4.3	Koexpression von FLT3-WT in FLT3-ITD exprimierenden Zellen	102
4.4	Vergleichende Untersuchung des onkogenen Potentials verschiedener FLT3-Mutanten im murinen Knochenmarktransplantationsmodell.....	104
5	Zusammenfassung.....	108
6	Literaturverzeichnis	110
7	Abbildungsverzeichnis	125
8	Danksagung.....	127
9	Publikationen.....	128

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
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
BBMM	<i>Basal Bone Marrow Medium</i>
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFU-GM	<i>Granulocytic-monocytic colony forming unit</i>
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CML	chronisch myeloische Leukämie
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
D	Aspartat
del	Deletion
DISK-PAGE	diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion

ECD	extrazelluläre Domäne
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
F	Farad
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	FLT3-Ligand
FLK	<i>fetal liver kinase</i>
FLT	<i>fms-like tyrosine kinase</i>
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
5-FU	5-Fluoruracil
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Gy	Gray (1 Gy=1 J/kg)
h	human / Stunde
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
ITD	interne Tandemduplikation (<i>internal tandem duplication</i>)
JMD	juxtamembranäre Domäne
kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
LB	Luria-Bertani
lin	linear
log	logarithmisch
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	murin
M	Marker / Methionin

mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
mM (mmol/l)	10 ⁻³ Mol/Liter
min	Minute(n)
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
nM (nmol/l)	10 ⁻⁹ Mol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PE	Phycoerythrin
pH	pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PTB	Phosphotyrosin-bindend (<i>phosphotyrosine binding</i>)
PVDF	Polyvinylidifluorid
pY	Phosphotyrosin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SH	<i>Src-homology</i>
SS	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STI	<i>Signal Transduction Inhibitor</i>
STK	<i>Stem cell kinase</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TKD	Tyrosinkinasedomäne

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Jede lebende Zelle besitzt die Fähigkeit, auf exogene und endogene Reize zu reagieren. Die adäquate Anpassung an die Umgebungseinflüsse und den Entwicklungsstand der Zelle ist nur durch die Verknüpfung verschiedener Signaltransduktionskaskaden zu Netzwerken möglich. Nach Übertragung der Signale über die Membran in den Zellkern wird dort die Genexpression reguliert. Abhängig vom auslösenden Stimulus werden in der Zelle unter anderem Mechanismen zur Differenzierung, Proliferation oder Apoptose (programmierter Zelltod) aktiviert. Andere Signalübertragungswege rekrutieren posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, welche die Zellteilungsaktivität beeinflussen oder den programmierten Zelltod einleiten können (Karin, 1992). Dem kontrollierten Ablauf dieser Signalweiterleitung und -verarbeitung kommt eine große medizinische Bedeutung zu. Eine deregulierte Signaltransduktion kann unter anderem durch Erhöhung der Zellteilungsrate und Inaktivierung der Differenzierungsfähigkeit der Zelle zur Ausbildung einer malignen Erkrankung beitragen (Hunter, 1997). Hierbei spielen Protoonkogene eine wichtige Rolle. Häufig kodieren diese Gene für Proteine, die an der Weiterleitung promotogener Signale beteiligt sind. Durch Mutationen, Deletionen oder Translokationen können aus Protoonkogenen Onkogene entstehen. Die daraus resultierenden Proteine sind der normalen zellulären Regulation entzogen und können konstitutiv promotogene und/ oder antiapoptotische Signale vermitteln (Cantley *et al.*, 1991; Rieger, 2004).

Der Empfang von extrazellulären Signalen und die Weiterleitung über die Membran ins Zellinnere erfolgt durch membranständige Rezeptoren. Diese werden auf Grund ihrer molekularen Struktur verschiedenen Rezeptorfamilien zugeordnet. Sie sind unterteilt in die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, die Familie der Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren, die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und die Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle. Die Signalkaskade wird durch Interaktion des für den jeweiligen Rezeptor spezifischen Liganden mit der extrazellulären Domäne des Rezeptors eingeleitet. Die Weiterleitung des Signals in das Zellinnere erfolgt durch receptorspezifische Mechanismen. G-Protein gekoppelte Rezeptoren übermitteln das Signal durch eine Konformationsänderung an ein guaninnukleotidbindendes Protein (G-Protein), welches das Signal über nachgeschaltete Signalkaskaden weiterleitet (Strader *et al.*, 1994). Bei Liganden-gesteuerten Ionenkanälen führt die Bindung des Liganden zur Öffnung einer Kanalpore. Auf Grund der daraus resultierenden Durchlässigkeit des Kanals kommt es zum Ein- oder Ausstrom von Ionen, was als Signal registriert und weitergeleitet wird (Barnard, 1992). Bei den Rezeptor-Tyrosinkinasen handelt es sich um Transmembranrezeptoren mit intrinsischer

Tyrosinkinaseaktivität. Im Gegensatz dazu sind bei Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren Rezeptor und Kinasedomäne nicht auf dem selben Protein lokalisiert. Auf die Signaltransduktion von Tyrosinkinasen wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen. Nach Einleitung der Signalkaskade durch Stimulation des Rezeptors und entsprechender Weiterleitung des Signals an intrazelluläre Signalmoleküle werden definierte, für Zelltyp und Rezeptor charakteristische Signalwege aktiviert (Hunter, 2000). Dabei haben die Signalelemente die Eigenschaft, verschiedene Proteine binden zu können. Somit ergibt sich zum einen die Möglichkeit, eine Vielzahl von nachgeschalteten Kaskaden zu aktivieren. Zum anderen ist dadurch die Vernetzung oder Kopplung mehrerer Signalwege möglich (Jordan *et al.*, 2000). Die zelltypspezifische Antwort auf einen Stimulus wird durch die in der Zelle vorhandenen Signalproteine definiert (Pawson und Nash, 2000).

1.2 Proteinkinasen

Die Phosphorylierung von Proteinen zählt zu einem der wichtigsten Mechanismen zur Erzeugung und Weiterleitung von Signalen in der Zelle. Hierbei katalysieren Proteinkinasen die Übertragung des γ -Phosphatrests von Adenosintri-phosphat (ATP) auf eine Hydroxylgruppe des Substratproteins. Anhand der Substratspezifität können Proteinkinasen in drei Familien eingeteilt werden. Die Phosphatübertragung auf die alkoholische Gruppe von Serin oder Threonin wird von den Serin/Threoninkinasen katalysiert, während Tyrosinkinasen die phenolische Hydroxylgruppe von Tyrosin mit dem Phosphat verestern. Ferner gibt es Proteinkinasen, die beide Reaktionen katalysieren können (Hunter, 1991).

Derzeit sind im Humangenom 518 Gene bekannt, die für Proteinkinasen kodieren (Manning *et al.*, 2002). Davon kodieren 90 Gene für Tyrosinkinasen, die wiederum in 58 Rezeptortyrosinkinasen und 32 cytoplasmatische Tyrosinkinasen unterteilt sind (Robinson *et al.*, 2000).

Die Aktivierung von Tyrosinkinasen stellt einen essentiellen Bestandteil promotogener Signalkaskaden dar. Durch Mutationen deregulierte Tyrosinkinasen sind oft Ursache zellulärer Transformation und können dadurch zur Entstehung von Neoplasien beitragen (Rodrigues und Park, 1994; Hunter, 1997; Robertson *et al.*, 2000; Blume-Jensen und Hunter, 2001).

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

1.3.1 Einteilung und Struktur der Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind transmembranäre Proteine mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne. Die Einteilung der RTK in 20 Subfamilien (Klassen) basiert auf der Sequenz der Kinasedomänen, ist jedoch indirekt auch mit der molekularen Struktur assoziiert (Ullrich und Schlessinger, 1990; Robinson *et al.*, 2000). Somit unterscheiden sich die RTK-Familien vor allem in den strukturellen Motiven der extrazellulären Domäne (Abb. 1). Einige RTK-Klassen sind nach dem natürlichen Liganden eines ihrer Mitglieder benannt.

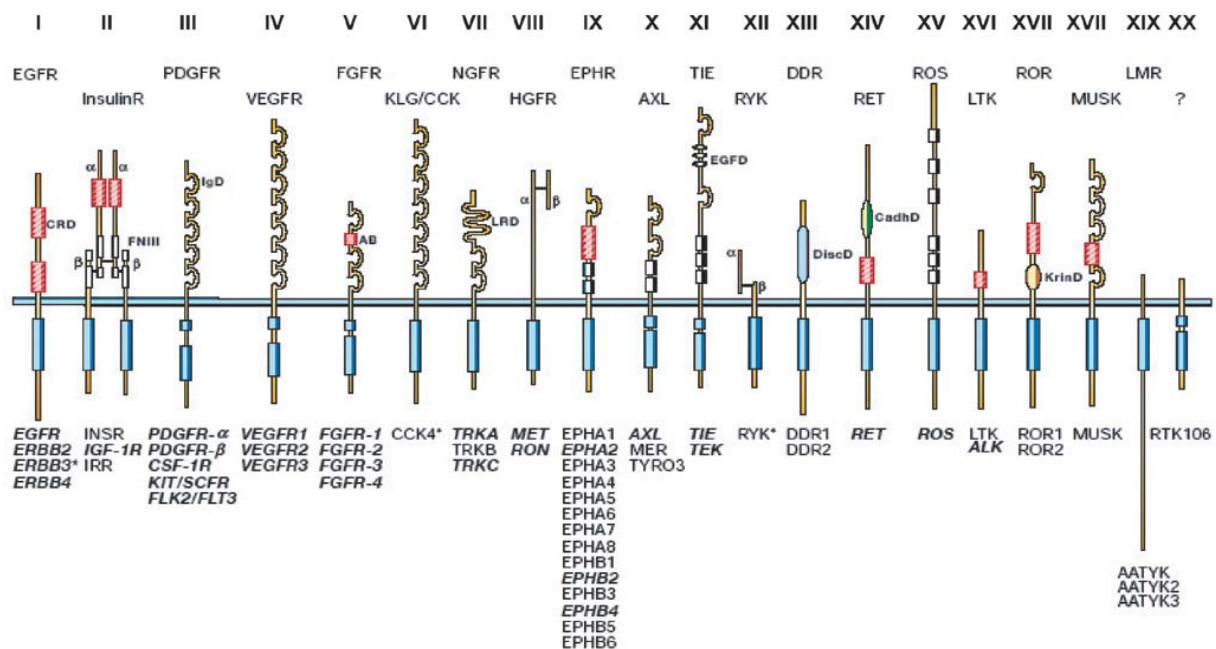


Abb. 1: Einteilung der humanen Rezeptortyrosinkinasen (nach Blume-Jensen und Hunter, 2001)

Die Nummerierung der Klassen erfolgt in römischen Ziffern von links nach rechts. Der Rezeptorprototyp jeder Klasse ist oberhalb der Abbildung angegeben, die Mitglieder der jeweiligen Familie sind darunter aufgelistet. Die kursiv gedruckten RTK stehen im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen.

Intrazellulär befindet sich bei Rezeptortyrosinkinasen eine juxtamembranäre Domäne (JMD), welche die transmembranäre Domäne von der Tyrosinkinasedomäne trennt. Bei einigen Rezeptortyrosinkinasen übernimmt die juxtamembranäre Domäne in unphosphoryliertem Zustand eine autoinhibitorische Funktion, welche durch Phosphorylierung spezifischer darin lokalisierter Tyrosinreste aufgehoben werden kann (Wybenga-Groot *et al.*, 2001; Irusta *et al.*, 2002). Die Kinasedomänen sind innerhalb der Proteinkinasen hochkonserviert (Hanks *et al.*, 1988). Sie beinhalten drei Proteindomänen: Die Aktivierungsschleife (*Activation-Loop*, *A-loop*), deren Konformation die Kinaseaktivität reguliert, die ATP-Bindungstasche (*ATP-binding pocket*) und die katalytisch aktive Kinaseschleife (*catalytic loop*). Die Konformation

der Aktivierungsschleife wird über die Phosphorylierung darin lokalisierter Tyrosinreste reguliert. Im inaktiven (geschlossenen) Zustand blockiert die Aktivierungsschleife die ATP-Bindungstasche und verhindert zusätzlich die Anlagerung des Substrats. Bei einigen Rezeptortyrosinkinasen ist die Kinasedomäne durch ein hydrophobes Kinaseinsert unterteilt, dessen Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist. In der C-terminalen Domäne sind häufig Autophosphorylierungsstellen lokalisiert, welche essentiell für die Signalweiterleitung sind. Ferner wird dieser Domäne eine autoinhibitorische Funktion zugeschrieben (Shewchuk *et al.*, 2000).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden im hämatopoetischen Gewebe Rezeptoren der RTK-Klassen II-V, VII, XI und XIV nachgewiesen (Gupta *et al.*, 2002). Neben ihrer Funktion in der normalen Hämatopoese ist von einigen dieser Rezeptoren eine Assoziation mit hämatologischen Erkrankungen bekannt (Robertson *et al.*, 2000; Reilly, 2003).

1.3.2 Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen

Die meisten Rezeptortyrosinkinasen liegen in ihrer unstimulierten Form als Monomer vor. Die Konformation in der inaktiven Form bedingt eine sterische Inhibition der Dimerisierung und verhindert dadurch die Aktivierung des Rezeptors (Abb. 2, links). Daran ist vor allem die Aktivierungsschleife, bei einigen Rezeptortyrosinkinasen aber auch die juxtamembranäre oder die C-terminale Domäne beteiligt (Huse und Kuriyan, 2002).

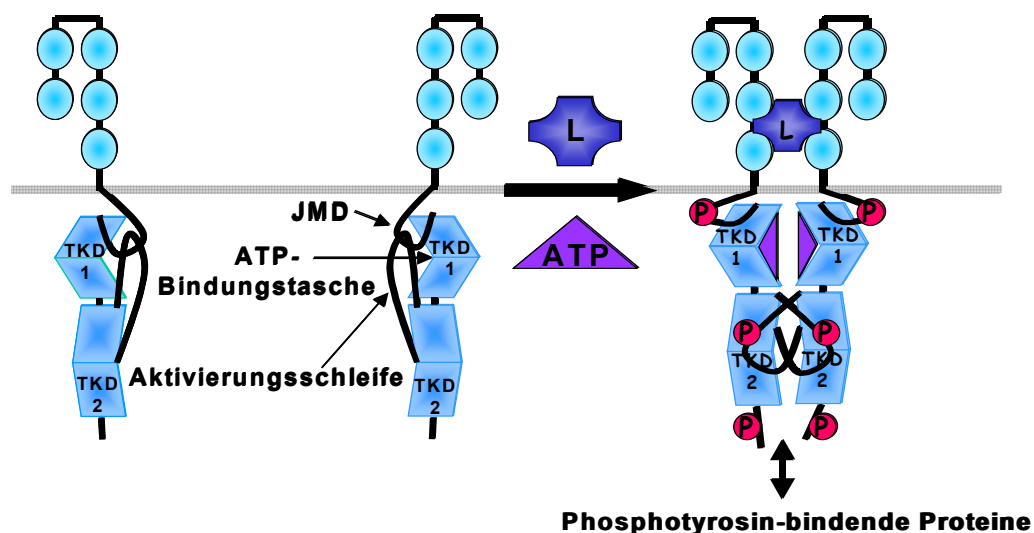


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen

Die Dimerisierung der im inaktiven Zustand vorliegenden Monomere wird durch die Konformation von JMD, Aktivierungsschleife und C-terminaler Domäne verhindert. Durch Interaktion der extrazellulären Domäne mit dem Liganden dimerisiert der Rezeptor, wodurch es zur Aktivierung der Kinase kommt. Es folgt die Autophosphorylierung des Rezeptors an spezifischen Tyrosinresten, was zum einen der Stabilisierung der aktiven Konformation und zum anderen der Schaffung von Bindungsstellen für Phosphotyrosin-bindende Effektorproteine dient.

JMD: Juxtamembranäre Domäne; TKD: Tyrosinkinasedomäne; L: Ligand; P: Phosphatrest

Die Aktivierung gliedert sich in drei Schritte: Bindung des Liganden, Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors (Abb. 2). Eingeleitet wird die Aktivierung durch eine Wechselwirkung der extrazellulären Domäne des Rezeptors mit seinem Liganden. Das induziert die Dimerisierung des Rezeptors und stabilisiert das Rezeptordimer. Neben der Aktivierung der Kinase durch Aufhebung der autoinhibitorischen Funktion führt die Dimerisierung zu einer Konformationsänderung der Aktivierungsschleife. Dadurch kann ATP am Rezeptor binden und ermöglicht so die Autophosphorylierung des Rezeptors. Diese erfolgt durch eine gegenseitige Transphosphorylierung der beiden Protomere. Abhängig vom phosphorylierten Tyrosinrest hat die Autophosphorylierung zwei Folgen. Zum einen wird durch Phosphorylierung von Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife deren offene Konformation stabilisiert und gestattet damit eine Anlagerung von Substraten. Zum anderen werden durch Tyrosinphosphorylierung Bindungsstellen für Effektorproteine der Signaltransduktionskaskaden geschaffen (Ullrich und Schlessinger, 1990; Lemmon und Schlessinger, 1994; Heldin, 1995; Schlessinger, 2000).

1.3.3 Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinasen

Die Phosphotyrosinreste des autophosphorylierten Rezeptors dienen als Bindungsstellen für Proteine, die über eine phosphotyrosinbindende Domäne verfügen. Zu diesen zählt unter anderem die SH2- (*Src-homology 2*-) und die PTB- (*Phosphotyrosine binding*-) Domäne.

SH2-Domänen binden spezifisch an Aminosäuremotive, die durch bis zu 6 Aminosäuren C-terminal des Tyrosins definiert sind (Songyang *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu erkennen PTB-Domänen die spezifisch zu bindenden Phosphotyrosine im Kontext mit den 3 bis 5 N-terminal gelegenen Aminosäureresten (Margolis, 1999). Beide Domänen befinden sich einzeln oder in Kombination mit weiteren proteinbindenden Domänen sowohl in Adaptormolekülen ohne intrinsische Kinaseaktivität als auch in katalytisch aktiven Proteinen. Die Bindung zwischen dem Effektorprotein und der aktivierten Rezeptortyrosinkinase dient der Signalweiterleitung. Diese erfolgt durch die Übertragung des γ -Phosphatrests von ATP auf das Effektorprotein, welches wiederum Kinaseaktivität besitzt und somit das Signal in Form eines Phosphatrests weiterleiten kann. Adapterproteine vermitteln hierbei gezielt die räumliche Nähe zwischen Kinase und Substrat, ohne selbst die Phosphatübertragung zu katalysieren.

Da eine Rezeptortyrosinkinase mehrere Substratbindungsmotive enthält, ist es möglich, je nach Verfügbarkeit und Aktivität von Effektorproteinen unterschiedliche Signalkaskaden zu aktivieren. Da die Effektormoleküle wiederum mehrere Proteinbindungsdomänen enthalten können, resultiert aus der Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten eine große Variabilität der Kopplungsmöglichkeiten verschiedener Signalproteine (Cohen *et al.*, 1995; Pawson, 1995).

1.4 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) wurde in den frühen neunziger Jahren aus murinen fetalen Leberzellen (Matthews *et al.*, 1991) bzw. murinen Plazentazellen kloniert (Rosnet *et al.*, 1991a). Nur kurze Zeit später folgte die Klonierung des humanen Homologs (Rosnet *et al.*, 1993a; Small *et al.*, 1994). Das FLT3-Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 13q12, im murinen auf Chromosom 5 lokalisiert. FLT3 ist ein Mitglied der Klasse III Rezeptortyrosinkinase-Familie (PDGFR-Familie) (Rosnet *et al.*, 1991b), der auch die Rezeptoren für den *Platelet derived growth factor* (PDGFR), den Stammzellofaktor (SCFR, c-KIT) und den *Colony stimulating factor* (CSF1R, c-FMS) angehören (Abb. 1). Der FLT3-Rezeptor ist auch als FLK2 (*fetal liver kinase 2*) oder STK1 (*human stem cell kinase 1*) bekannt. Als Oberflächenantigen auf hämatopoetischen Zellen wird das FLT3-Protein als CD135 bezeichnet.

Das humane FLT3-Gen kodiert für ein Protein, das aus 993 Aminosäuren aufgebaut ist (Rosnet *et al.*, 1993a), während der murine FLT3-Rezeptor aus 1000 Aminosäuren besteht (Rosnet *et al.*, 1991a). Auf Aminosäureebene besteht zwischen dem humanem und dem murinem FLT3 eine Homologie von 85% (Rosnet *et al.*, 1993b). Nach der Translation liegt FLT3 zunächst als lösliches, nicht membrangebundenes Protein mit einer Größe von 130-143 kD vor. Daraus entsteht durch posttranslationale Glykosylierung die reife, membrangebundene Form mit einer Größe von 158-160 kD (Lyman *et al.*, 1993; Maroc *et al.*, 1993).

1.4.1 Struktur und Regulation des FLT3-Rezeptors

Das FLT3-Protein weist eine strukturelle Homologie zu den weiteren Mitgliedern der Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen auf (Agnes *et al.*, 1994). Diese sind charakterisiert durch einen extrazellulären Teil (ECD), der aus 5 immunoglobulinähnlichen Domänen besteht, eine transmembranäre Domäne (TMD), eine juxtamembranäre Domäne (JMD), einer zweigeteilten Kinasedomäne, die durch einen hydrophoben Kinaseeinschub (KI) unterbrochen ist und einer abschließenden C-terminalen Domäne (CTD) (Rosnet und Birnbaum, 1993). In der N-terminalen Kinasedomäne (TKD1) ist die ATP-Bindungstasche lokalisiert. Die Aktivierungsschleife und die katalytisch aktive Kinaseschleife befinden sich in der C-terminalen Kinasedomäne (TKD2) (Abb. 3a).

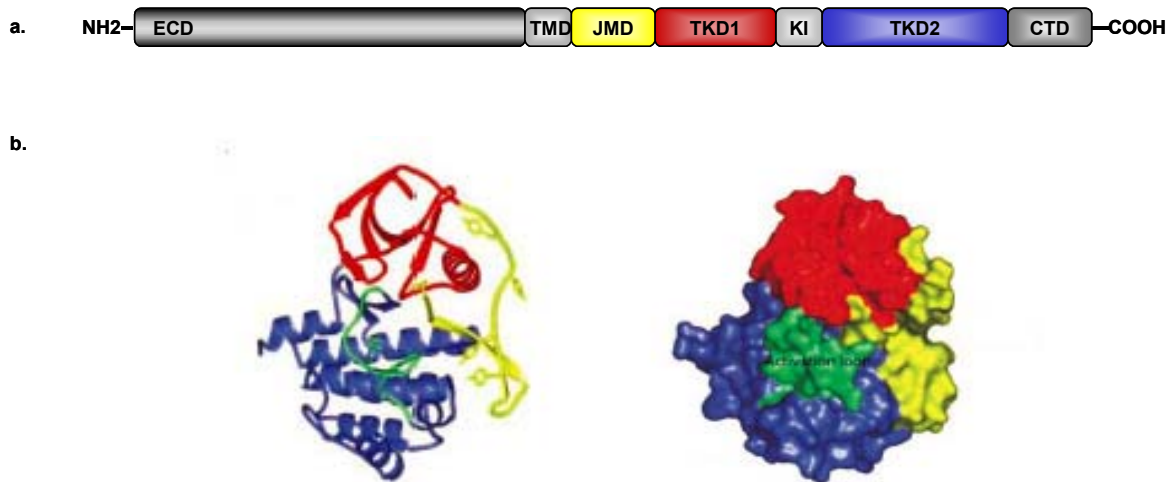


Abb. 3: Struktur der FLT3-Rezeptortyrosinkinase

a.: Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors.

ECD: extrazelluläre Domäne; TMD: Transmembranäre Domäne; JMD: Juxtamembranäre Domäne; TKD: Tyrosinkinasedomäne; KI: Kinaseinsert; CTD: C-terminale Domäne.

b.: Kristallstruktur des intrazellulären Teils von FLT3 in autoinhibierter Form (nach Griffith *et al.*, 2004).

Die Aktivierungsschleife (grün) liegt in geschlossener Konformation vor, wodurch sie sich in der Spalte zwischen TKD1 (rot) und TKD2 (blau) befindet. In dieser Form ist die Bindung von ATP und Substraten aus sterischen Gründen nicht möglich. Die juxtamembranäre Domäne (gelb) verhindert durch ihre Konformation das Öffnen der Aktivierungsschleife.

Die Kinaseaktivität des FLT3-Rezeptors ist streng reguliert. Die Kristallstruktur des intrazellulären Teils gibt einen Hinweis auf die autoinhibitorischen Mechanismen der FLT3-Rezeptortyrosinkinase (Abb. 3b). Die Aktivierungsschleife liegt in ihrer geschlossenen (inaktiven) Konformation eingebettet zwischen N- und C-terminaler Kinasedomäne. Das Öffnen der Aktivierungsschleife ist zusätzlich durch die Lage der juxtamembranären Domäne sterisch inhibiert. Durch diese Konformation wird im inaktiven Zustand des Rezeptors die ATP-Bindungstasche blockiert und zusätzlich die Anlagerung des Substrats verhindert (Griffith *et al.*, 2004).

Nach Aktivierung des Rezeptors nimmt die Aktivierungsschleife die offene Konformation an und ermöglicht damit die Bindung von ATP. Die daraus resultierende Autophosphorylierung des Tyrosin 842 bewirkt eine Stabilisierung der offenen Konformation der Schleife. Die Phosphorylierung eines oder mehrerer in der JMD lokalisierten Tyrosinreste (Y589, Y591, Y599) ist wahrscheinlich für die Konformationsänderung und Aufhebung der autoinhibitorischen Funktion dieser Domäne verantwortlich (Griffith *et al.*, 2004).

1.4.2 FLT3 in der Hämatopoese

In normalen hämatopoetischen Zellen kann FLT3-Expression vor allem bei frühen myeloiden und lymphatischen Progenitoren, jedoch nicht bei Megakaryozyten, Mastzellen oder Zellen der erythroiden Reihe nachgewiesen werden (Abb. 4) (Gabbianelli *et al.*, 1995; Hjertson *et al.*, 1996; Ratajczak *et al.*, 1996; Rosnet *et al.*, 1996).

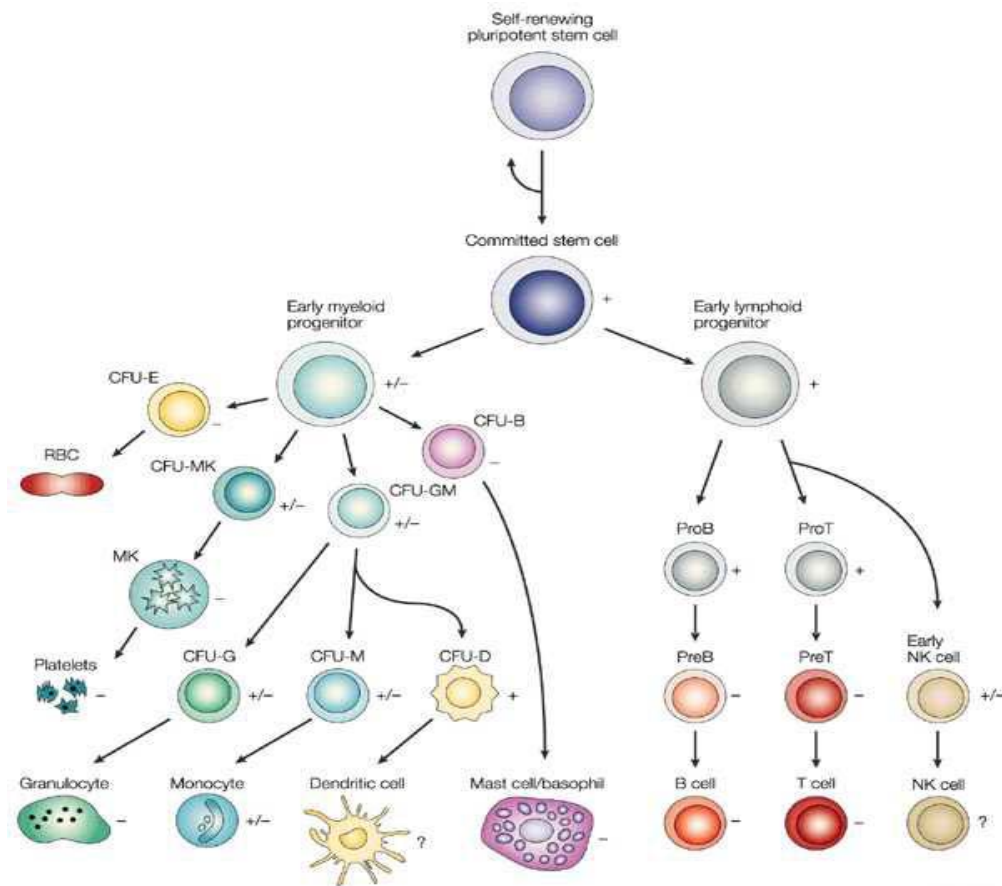


Abb. 4: Expression von FLT3 in der normalen Hämatopoese (nach Stirewalt und Radich, 2003)

Darstellung der Reifung und Differenzierung normaler hämatopoetischer Zellen. Die Symbole (+, -, ?) zeigen den FLT3-Expressionsstatus der jeweiligen Zellen an. CFU: Kolonie bildende Einheiten (*colony forming units*); B: basophil; D: dendritisch; E: erythroid; GM: granulozytär-monozytär; MK: megakaryozytär; NK cell: natürliche Killerzelle (*natural killer cell*); RBC: Erythrozyt (*red blood cell*).

Die Stimulation des FLT3-Rezeptors durch seinen Liganden fördert *in vitro* die Proliferation früher hämatopoetischer Progenitoren (Ray *et al.*, 1996; Veiby *et al.*, 1996). FLT3 vermittelte Effekte in hämatopoetischen Zellen sind sehr stark abhängig vom Zelltyp und von den kostimulatorischen Wachstumsfaktoren. Während die ausschließliche Stimulation mit dem FLT3-Liganden (FL) eine Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen in Monozyten begünstigt ohne die Proliferation anzuregen, bewirkt die Kombination von FL mit anderen Wachstumsfaktoren eine starke proliferative Aktivität und eine Anreicherung von Progenitoren der granulozytär-monozytären Reihe (CFU-GM) (Gabbianelli *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1996). Dabei hat sich die Kombination aus FL, dem Stammzellofaktor (SCF, c-KIT Ligand) und Interleukin 3 (IL-3) als starker proliferativer Stimulus für myeloide Progenitoren erwiesen (Rusten *et al.*, 1996). Die Aktivierung des FLT3-Rezeptors spielt auch in der Lymphopoese eine wichtige Rolle. Die gleichzeitige Stimulation von humanen pro-B-Zellen mit FL und Interleukin 7 (IL-7) begünstigt die Stromazell-unabhängige Proliferation und fördert die Differenzierung der pro-B- zu pre-B-Zellen (Namikawa *et al.*, 1996). In der frühen

T-Zell-Entwicklung hat die Aktivierung des FLT3-Rezeptors ebenfalls Einfluss auf Differenzierung und Proliferation (Hannum *et al.*, 1994; Moore und Zlotnik, 1997).

Zwischen den biologischen Auswirkungen der Stimulation hämatopoetischer Zellen mit FL und SCF (c-KIT-Ligand) scheint eine gewisse Redundanz zu bestehen. Während FLT3-Rezeptor defiziente Mäuse nur eine geringfügige Veränderung der B-Zell-Entwicklung zeigen, führt ein FLT3/c-KIT Doppel-Knockout zu einem Phänotyp, der durch eine Abnahme der absoluten Zellzahl aller hämatopoetischen Reihen, eine relative Verringerung der lymphatischen Progenitorfrequenz und hohe neonatale Mortalität charakterisiert ist (Mackarechtschian *et al.*, 1995).

Diese Daten weisen darauf hin, dass der FLT3-Rezeptor in Kombination mit anderen Wachstumsfaktorrezeptoren eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielt, eine therapeutische Inhibition von FLT3 mit selektiven Inhibitoren (siehe Kapitel 1.4.5) jedoch möglicherweise auf Grund der redundanten biologischen Effekte anderer Wachstumsfaktoren ohne schwerwiegende Nebeneffekte auf die Hämatopoese möglich ist (Stirewalt und Radich, 2003).

1.4.3 Bedeutung von FLT3 bei leukämischen Erkrankungen

Sowohl bei 70-100% der akut myeloischen Leukämien (AML) als auch bei einem Großteil akut lymphatischer Leukämien (ALL) kann auf blastären Zellen (Vorläuferzellen) eine übermäßig starke FLT3-Expression nachgewiesen werden (Birg *et al.*, 1992; Carow *et al.*, 1996; Rosnet *et al.*, 1996). Diese Daten weisen darauf hin, dass FLT3 möglicherweise Einfluss auf das Überleben und die Proliferation leukämischer Blasten hat. *In vitro* Untersuchungen zeigen eine starke Proliferation myeloider Blasten nach Stimulation mit dem FLT3-Liganden, während blastäre Zellen aus akut lymphatischen Leukämien trotz starker FLT3-Überexpression nach FLT3-Stimulation keine proliferative Aktivität aufweisen (Drexler, 1996). Akut lymphatische Leukämien, die mit Translokationen des *mixed-lineage leukemia* (MLL) Gens assoziiert sind, gehen häufig mit FLT3-Überexpression einher (Armstrong *et al.*, 2002). Überdies wurden hohe Level der FLT3 mRNA in einer Vielzahl leukämischer Zelllinien myeloiden und lymphatischen Ursprungs detektiert, während in denselben Linien keine Expression des Stammzelleffektor-Rezeptors (c-KIT) festgestellt wurde (DaSilva *et al.*, 1994). In einigen Zelllinien sowie primären leukämischen Blasten konnte eine gleichzeitige Expression des FLT3-Rezeptors und des FLT3-Liganden nachgewiesen werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Proliferation leukämischer Blasten auch durch autokrine, intrakrine oder parakrine FLT3-Stimulation gefördert wird und FLT3 auf diese Weise zur Pathogenese von Leukämien beiträgt (Meierhoff *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2004).

1.4.4 Mutationen des FLT3-Rezeptors bei leukämischen Erkrankungen

1.4.4.1 FLT3 *internal tandem duplications* (FLT3-ITD)

Längenmutationen (*internal tandem duplications*, ITD) der juxtamembranären Domäne von FLT3 wurden erstmals Mitte der neunziger Jahre in AML-Patienten identifiziert (Nakao *et al.*, 1996). Die *internal tandem duplications* des FLT3-Rezeptors entstehen durch Verdoppelung von Nukleotiden der Sequenz, die für die juxtamembranäre Domäne kodieren. Da diese Mutationen den Leserahmen nicht verändern, resultiert daraus auf Proteinebene eine Verlängerung der juxtamembranären Domäne. Die Länge der ITD variiert hierbei von einer bis über 130 Aminosäuren (Schnittger *et al.*, 2002).

Durch die veränderte Primärstruktur kann die autoinhibitorische Konformation der JMD nicht aufrecht erhalten werden. Es kommt zu einer Dimerisierung des Rezeptors ohne vorherige Stimulation mit seinem Liganden (Kiyoi *et al.*, 1998; Kiyoi *et al.*, 2002). Daraus resultiert die konstitutive Autophosphorylierung des Rezeptors und eine deregulierte Aktivierung verschiedener physiologischer und nicht physiologischer Signalkaskaden. Die im Zellmodell nachgewiesenen transformierenden Eigenschaften von FLT3-ITD bilden die Grundlage für die Annahme eines kausalen Zusammenhangs zwischen FLT3-ITD Expression und der Entwicklung myeloischer Leukämien (Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000). Unterstützt wird diese Hypothese durch die hohe Expressionshäufigkeit von FLT3-ITD in malignen hämatopoetischen Erkrankungen. ITD-Mutationen des FLT3-Rezeptors können bei durchschnittlich 25% aller Patienten mit AML (Kiyoi *et al.*, 1997; Kottaridis *et al.*, 2001; Thiede *et al.*, 2002) sowie bei 5-10% der Patienten mit Myelodysplasie (MDS) nachgewiesen werden (Horiike *et al.*, 1997; Yokota *et al.*, 1997; Fenaux, 2001). Im Gegensatz dazu treten sie bei akut lymphatischen Leukämien (ALL) nur selten (Nakao *et al.*, 1996; Yokota *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Brown und Small, 2004) und in normalen hämatopoetischen Zellen nie auf (Ishii *et al.*, 1999).

In der AML ist das Vorliegen von FLT3-ITD mit peripherer Leukozytose und hohem Blastenanteil im Knochenmark assoziiert (Kottaridis *et al.*, 2001). Die klinische Prognose für AML-Patienten mit ITD-Mutation ist signifikant schlechter als für Patienten, die diesen genetischen Defekt nicht tragen (Kiyoi *et al.*, 1999; Abu-Duhier *et al.*, 2000; Rombouts *et al.*, 2000; Kottaridis *et al.*, 2001; Meshinchi *et al.*, 2001; Schnittger *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002). Der zusätzliche Verlust des FLT3 Wildtyp-Allels, zum Beispiel durch den Verlust eines Chromosoms 13, hat eine weitere Verschlechterung der Prognose zur Folge (Whitman *et al.*, 2001). Trotz dieser Daten geht man derzeit davon aus, dass die Mutation des FLT3-Rezeptors nicht die alleinige Ursache für die Entstehung einer FLT3-ITD positiven AML ist, sondern noch zusätzliche, die Differenzierung beeinflussende Mutationen notwendig sind, um eine AML zu induzieren („2-Hit“-Hypothese) (Gilliland und Griffin, 2002). Diese Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass FLT3-ITD im Mausmodell keine AML, sondern eine

myeloproliferative Erkrankung hervorruft (Kelly *et al.*, 2002b). Im Gegensatz dazu, verursacht FLT3-ITD in Kooperation mit PML-RAR α , dem Produkt der chromosomalen Translokation t(15;17), eine AML-ähnliche Erkrankung in der Maus (Kelly *et al.*, 2002a). Die Translokation t(15;17) ist die einzige chromosomale Aberration, von der eine Korrelation mit der Expression von FLT3-ITD gezeigt werden konnte. Die meisten FLT3-ITD positiven AML-Patienten weisen jedoch einen normalen Karyotyp auf (Schnittger *et al.*, 2002). Es scheint daher wahrscheinlich, dass bei FLT3-ITD positiven AML-Patienten noch zusätzliche, zytogenetisch nicht nachweisbare Mutationen vorliegen.

1.4.4.2 Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von FLT3

Punktmutationen innerhalb der für die Aktivierungsschleife kodierenden Sequenz sind als zweithäufigste Mutation des FLT3-Gens beschrieben. Diese Mutationen führen auf Proteinebene zu einem Austausch von Aminosäureresten, die zur Stabilisierung der geschlossenen Konformation der Schleife notwendig sind (Griffith *et al.*, 2004). Die Konsequenz ist eine Aufhebung der autoinhibitorischen Funktion der Aktivierungsschleife. Daraus resultiert die konstitutive Phosphorylierung der FLT3-Rezeptortyrosinkinase und eine deregulierte Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (Fenski *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001). Das Codon mit der höchsten Mutationsrate (Aspartat 835, D835) ist innerhalb der Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen hoch konserviert. So führt ein Austausch der homologen Aminosäure im Stammzellofaktorrezeptor (D816) und im CSF-Rezeptor (D802) ebenfalls zur Liganden-unabhängigen Aktivierung dieser Rezeptoren (Furitsu *et al.*, 1993; Piao und Bernstein, 1996; Morley *et al.*, 1999).

Seltener werden in FLT3 aktivierende Mutationen der Aminosäuren Isoleucin 836 (I836) und Asparagin 841 (N841) sowie Deletions- oder Insertionsmutationen innerhalb der C-terminalen Tyrosinkinasedomäne (TKD2) des FLT3-Rezeptors detektiert (Yamamoto *et al.*, 2001; Spiekermann *et al.*, 2002a; Thiede *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004).

TKD-Mutationen des FLT3-Rezeptors können bei durchschnittlich 7% der Patienten mit AML, in 3-5% der myelodysplastischen Syndrome (MDS) sowie bei 3% aller ALL-Fälle nachgewiesen werden (Griffin, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Thiede *et al.*, 2002). Ferner wurden FLT3 TKD-Mutanten auch bei Kindern mit MLL, einer Form der akut lymphatischen Leukämie (ALL), und bei Patienten mit T-Zell-Leukämie detektiert (Armstrong *et al.*, 2004; Paietta *et al.*, 2004; Taketani *et al.*, 2004).

Tyrosinkinasedomäne-Mutationen im FLT3-Rezeptor scheinen jedoch im Gegensatz zu FLT3-ITD keinen Einfluss auf die klinische Prognose von AML-Patienten zu haben (Frohling *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003; Thiede *et al.*, 2003).

Zusammengenommen können also bei über 30% der AML-Patienten aktivierende Mutationen im FLT3-Rezeptor nachgewiesen werden. Damit ist FLT3 das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen bei akut myeloischen Leukämien (Gilliland und Griffin, 2002). Obwohl FLT3 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht das alleinige verantwortliche Protoonkogen für die Induktion einer AML ist, scheint es trotzdem eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf der Erkrankung zu spielen. Selektive Hemmstoffe gegen diese Kinase stellen somit eine neue Option für die Behandlung FLT3-positiver leukämischer Erkrankungen dar.

1.4.5 FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren

Das Wirkprinzip der meisten Kinaseinhibitoren besteht darin, sich reversibel in der ATP-Bindungstasche anzulagern, damit die enzymatische Wirkung der Kinase zu blockieren und letztlich die pathologisch verstärkte Signalweiterleitung gezielt zu unterdrücken. Der Einsatz von Kinaseinhibitoren könnte sowohl bei Überexpression der Zielkinase als auch bei deren deregulierter Aktivität sinnvoll sein (Brown und Small, 2004). Ein Problem bei der Entwicklung selektiver Tyrosinkinaseinhibitoren ist die hohe Homologie der ATP-Bindungstaschen verschiedener Kinasen. Eine unspezifische Hemmung mehrerer Tyrosinkinasen könnte zahlreiche Nebenwirkungen zur Folge haben (Cools *et al.*, 2004).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine Vielzahl selektiver FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt und in präklinischen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese durch 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 (Levis *et al.*, 2001; Tse *et al.*, 2001; Levis *et al.*, 2002; Weisberg *et al.*, 2002). Die klinische Relevanz der FLT3-Inhibition wurde im FLT3-ITD Mausmodell bestätigt. Die Behandlung von FLT3-ITD positiven Mäusen mit FLT3-Kinaseinhibitoren führte zu einem signifikant verlängerten Überleben der Tiere (Kelly *et al.*, 2002c; Levis *et al.*, 2002; Weisberg *et al.*, 2002).

Die prinzipielle Wirksamkeit einiger FLT3-Kinaseinhibitoren wurde vor kurzem in klinischen Phase I/II-Studien bestätigt. So konnte in Patienten mit FLT3-positiver Leukämie durch selektive Kinaseinhibition eine partielle Remission erreicht werden (Smith *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2005; Wadleigh *et al.*, 2005).

1.5 Aufgabenstellung

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Da in verschiedenen hämatologischen Neoplasien aktivierende Mutationen innerhalb des Rezeptors nachgewiesen wurden, geht man davon aus, dass FLT3 an der Pathogenese dieser Erkrankungen beteiligt ist. Sowohl ITD (*internal tandem duplication*)-Mutationen der juxtamembranären Domäne als auch Punktmutationen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne (TKD) des FLT3-Rezeptors führen zur konstitutiven, Liganden-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors (Kiyoi *et al.*, 1998; Fenski *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001; Kiyoi *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Fragestellungen bearbeitet:

1. Im ersten Teil der Arbeit sollten zwei vor kurzem in AML-Patienten identifizierte FLT3-Mutanten (Thiede *et al.*, 2002) charakterisiert und ihr onkogenes Potential mit dem bereits bekannter Mutanten im Zellmodell verglichen werden. Dafür wurden die Mutanten kloniert und in verschiedenen Zelllinien exprimiert. In diesen Linien wurde der Aktivierungsstatus sowie die transformierenden Eigenschaften der mutierten FLT3-Rezeptoren untersucht. Die Behandlung der FLT3-exprimierenden Zellen mit FLT3-Kinaseinhibitoren sollte aufklären, ob die Art der Mutation die Sensitivität gegenüber Kinaseinhibitoren beeinflusst.
2. Die klinische Prognose für AML-Patienten mit einer ITD-Mutation des FLT3-Rezeptors ist signifikant schlechter als für Patienten, die diesen Defekt nicht tragen (Kiyoi *et al.*, 1999; Abu-Duhier *et al.*, 2000; Rombouts *et al.*, 2000; Kottaridis *et al.*, 2001; Meshinchi *et al.*, 2001; Schnittger *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002). Der zusätzliche Verlust des FLT3 Wildtyp-Allels, zum Beispiel durch den Verlust eines Chromosoms 13, hat eine weitere Verschlechterung der Prognose zur Folge (Whitman *et al.*, 2001). Basierend auf diesen Daten wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit ein Zellmodell erstellt, das den heterozygoten FLT3-WT/FLT3-ITD und den hemizygoten FLT3-ITD Genotyp imitiert. Dieses Modell sollte Aufschluss über die Auswirkungen der Koexpression von FLT3-WT in FLT3-ITD exprimierenden Zellen auf deren proliferative Aktivität geben.
3. Während FLT3-ITD als negativer prognostischer Faktor für den Verlauf einer akut myeloischen Leukämie gilt, scheinen Tyrosinkinasedomäne-Mutationen im FLT3-Rezeptor keinen Einfluss auf die Prognose von AML-Patienten zu haben (Frohling *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003; Thiede *et al.*, 2003). Die TKD-Mutanten des Rezeptors werden jedoch häufig bei Kindern mit MLL, einer Form der akut lymphatischen Leukämie (ALL), und bei Patienten mit T-Zell-Leukämie nachgewiesen (Armstrong *et al.*, 2004; Paietta *et al.*, 2004; Taketani *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu tritt FLT3-ITD in lymphatischen Leukämien nur selten auf (Nakao *et al.*, 1996; Yokota *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Xu *et al.*,

2000; Brown und Small, 2004). Im dritten Teil dieser Arbeit wurde ein murines Knochenmarktransplantationsmodell verwendet, um die potentiell unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen FLT3-Mutanten im Hinblick auf die Induktion verschiedener Erkrankungen zu untersuchen. Von besonderem Interesse war die Charakterisierung der Punktmutanten im Vergleich zu FLT3-ITD sowie die Beeinflussung des Phänotyps durch transplantierte Zellzahl und FLT3-Proteinexpressionsstärke.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
5-Fluorouracil (5-FU, Ribofluor®)	Ribosepharm GmbH, München
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Fluka, Deisenhofen
Glycerol-2-phosphat	Aldrich Chemical Company, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Hank's balanced salt solution (HBBS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumdextransulfat	Farmacia, Freiburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Protein A Sepharose -Lösung	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein G PLUS-Agarose	Santa Cruz, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen

2.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
Hygromycin B, 50mg/ml in PBS	Clontech, Palo Alto, CA, USA
IMDM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Muriner, rekombinanter FLT3-Ligand (FL)	R&D Systems, Wiesbaden

Muriner, rekombinanter Stammzellfaktor (SCF)	R&D Systems, Wiesbaden
Murines, rekombinantes Interleukin (IL)-3	R&D Systems, Wiesbaden
Murines, rekombinantes Interleukin (IL)-6	R&D Systems, Wiesbaden
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5%	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Opti-MEM®I, Serum-reduziertes Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNAClean™	Hybaid, Milford, MA, USA
RPMI 1640, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zeocin, 100 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme:

<i>DpnI</i> , 20 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
<i>EcoRI</i> , 100 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
<i>HindIII</i> , 20 U/μl	Roche, Mannheim
<i>HpaI</i> , 10 U/μl	Roche, Mannheim
<i>NheI</i> , 5 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach
<i>PmeI</i> , 10 U/μl	New England Biolabs, Schwalbach

Polymerasen:

<i>Pfu-Turbo</i>	Statagene, La Jolla, USA
AMV Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Tgo DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

Alkalische Phosphatase:

<i>CIAP</i> , 20-30 U/μl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
--------------------------	----------------------------

Proteinasen:

Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Pronase E	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

2.1.4 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 CD4 (L3T4), PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD8a (53-6.7), Ly-2, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD11b (M1/70), Mac1, Integrin α_M chain, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD16/CD32 (2.4G2), Fc γ III/II Receptor, Ratte IgG (Maus BD Fc Block™)	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD45 (30-F11), LCA, Ly-5, PE-Cy5-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD45/B220 (RA3-6B2), B220, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD90.2 (53-2.1), Thy-1.2, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus FLT3, ICD, polyklonal, Kaninchen IgG	Upstate Biotechnology, New York, USA
Anti-Maus FLT3, ECD, polyklonal, Ziege IgG	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus Ly-6G (Gr-1)/Ly-6C (RB6-8C5), Gr-1, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
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

2.1.5 Zelllinien

Suspensionszellen:

32D	murine Knochenmark-Zelllinie
Ba/F3	murine pre-B-Zelllinie

Adhärente Zellen:

NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie
ΦNX-Eco (Phoenix E)	retrovirale ecotrope Verpackungs-Zelllinie (Helfervirus-frei); 293T (humane embryonale Nierenkarzinom)-Zellen, stabil transfiziert mit Moloney <i>GagPol-IRES-Lyt2</i> Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promotors (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney <i>ecotropic envelope</i> Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors (Selektion mit Diphtherietoxin)

Die Zelllinien 32D, Ba/F3 und NIH3T3 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.

2.1.6 Vektoren und DNA-KonstrukteVektoren:

<u>Name</u>	<u>Resistenzen</u>	<u>Firma</u>
pcDNA 3.1/Zeo(+)	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Leek, Niederlande
MSCV MigR1	Ampicillin	J. Miller/ W. Pear, Philadelphia, USA (Pear <i>et al.</i> , 1998)

DNA-Konstrukte:

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(+)	
mFLT3-ITD in pcDNA 3.1/Zeo(+)	
mFLT3 D838Y in pcDNA 3.1/Zeo(+)	
mFLT3 I839del in pcDNA 3.1/Zeo(+)	
mFLT3 I839M+R in pcDNA 3.1/Zeo(+)	
mFLT3-WT in MSCV MigR1	
mFLT3-ITD in MSCV MigR1	
mFLT3 D838Y in MSCV MigR1	
mFLT3 I839del in MSCV MigR1	
mFLT3 I839M+R in MSCV MigR1	

2.1.7 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5 α TM Invitrogen GmbH, Karlsruhe

F- Φ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*,
recA1, *endA1*, *hsdR17*(*r_K⁻*, *m_K⁺*), *phoA*, *supE44*,
 λ -*thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

Epicurian ColiTM XL-1Blue Supercompetent Cells Stratagene, Heidelberg

recA1, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*,
relA1, *lac* [F'*proAB*, *lacI^q*Z Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

2.1.8 Tyrosinkinaseinhibitoren

AG1296	6,7-Dimethoxy-3-phenylquinoxalin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
PKC412	CGP 41251, N-Benzoylstaurosporin, Midostaurin (Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz)
SU5614	5-Chloro-3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylen]-2-indolinon (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

2.1.9 Oligonukleotide zur Einführung von Mutationen in DNA-Konstrukte

Name	Sequenz
FLT3 D838Y 3'	5'-GTCGCTCAGGATGTATCGGGCTAGCCCAAAGTC-3'
FLT3 D838Y 5'	5'-GACTTTGGGCTAGCCCGATACATCCTGAGCGAC-3'
FLT3 I839del 3'	5'-GGAGTCGCTCAGGTCTCGGGCTAGCCCAAAGTC-3'
FLT3 I839del 5'	5'-GACTTTGGGCTAGCCCGAGACCTGAGCGACTCC-3'
FLT3 I839M+R 3'	5'-GGAGTCGCTCAGGCGCATGTCTCGGGCTAGCCCAA AGTC-3'
FLT3 I839M+R 5'	5'-GACTTTGGGCTAGCCCGAGACATGCGCCTGAGCGA CTCC-3'

2.1.10 Oligonukleotide für die RT-PCR

Name	Sequenz
RT-PCR ITD 3'	5'-CACCATAGCAACAATATTCAAAAATC-3'
RT-PCR ITD 5'	5'-GGGCACGTCTTGCGAAACCATC-3'

GAPDH 3' 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

GAPDH 5' 5'-CCATCACCATCATCCAGGAG-3'

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert.

2.1.11 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rainbow Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Braunschweig

2.1.12 Mäuse und tierexperimentelle Materialien

Mausstamm:

Balb/C	Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln
--------	----------------------------------

Tierexperimentelle Materialien:

Animal Bedding Fibre	Altromin GmbH, Lage-Lippe
Caesium 137- Strahlenquelle (33300 GBq)	Buchler GmbH, Braunschweig
Discardit™ II Spritze, steril	Becton-Dickinson, Heidelberg
EDTA-Kapillaren (20µl)	Sarstedt, Mümbrecht
Falcon™ Zellsieb (100 µm)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Global Rodent Breeding (25 kGy bestrahlt)	Harlan Teklad, Blackthorn, England
Infrarotlampe	Royal Philips Elektronik, Hamburg
Käfigsystem	Thoren, PA, USA
Microlance™ Injektionskanüle, steril (27G 3/4)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Objektträger (ISO Norm 8037/1)	Roth, Karlsruhe
S-Monovette®, EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Sub-Q, sterile PP Spritze, 1ml, 26G 1/2	Becton-Dickinson, Heidelberg
Vet abc Blood Counter	Scil, Viernheim

2.1.13 Molekularbiologische Kitsysteme

CellTiter®AQ _{ueous} Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WI, USA
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick® Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Penzberg
Rediprime® II DNA Labelling System	Amersham Biosciences, Braunschweig
Titan One Tube RT-PCR Kit	Roche, Penzberg

2.1.14 Standard Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Elisa Reader Emax	Molecular Devices, MWG-Biotech, Ebersberg
Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
IBI geneZapper 450/2500 Elektroporator	Eastman Kodak, New Haven, USA
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter Φ 32	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydewang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hoefer, San Fransisco, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen

Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

2.1.15 Standard Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in A.d.
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	10% Methanol 10% Essigsäure in A.d.
Basales Knochenmarksmedium (BBMM):	325 ml IMDM 150 ml FCS 25 ml BSA (10% in IMDM) 5 ml L-Glutamin- Lösung (200mM) 100 µM 2-Mercaptoethanol 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
DNA-Probenpuffer (10-fach):	50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 0,5 M EDTA in A.d.
FACS-Puffer:	1% BSA in PBS
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 NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
RBC (Red Blood Cell)-Puffer:	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH7.3 in 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.
SSC-Puffer (20-fach): (Standard Saline Citrat)	0,3 M Natriumcitrat/HCl (pH 7,0) 3 M NaCl
Prästimulationsmedium:	BBMM 10 ng/ml mL-3 12 ng/ml mL-6 50 ng/ml mSCF
SOC-Medium:	2% Bacto-Trypton 0,55% Bacto-Hefeextrakt 0,5% 1M NaCl 0,5% 1M KCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert 1% 2M Glukose (frisch zugegeben) 1% 2M MgCl ₂ (frisch zugegeben) sterilfiltriert (0,2µm Filter)
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8) in A.d.
TNE-Puffer:	10 mM Tris (pH 8) 100 mM NaCl 1 mM EDTA
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.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen ermöglichen die sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Dabei entstehen abhängig vom verwendeten Enzym komplementäre, überhängende Enden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*). Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in *Units* (U) angegeben. Eine *Unit* entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig zu schneiden. Eine quantitative Spaltung der DNA wird sichergestellt, indem die Restriktionsnukleasen im Überschuss zugesetzt werden. Um die DNA in definierte Fragmente zu zerlegen, wird sie mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in der vom Hersteller empfohlenen Pufferlösung inkubiert. Die für das jeweilige Enzym optimierten Inkubationsbedingungen werden vom Hersteller angegeben. In der Regel erfolgt die Inkubation bei 37°C für 2 h. Nach erfolgter Reaktion wird das Enzym durch Erhitzen auf 65°C denaturiert oder durch Aufreinigung im Agarosegel (Kapitel 2.2.1.3) aus dem Reaktionsansatz entfernt.

2.2.1.2 5'-Dephosphorylierung von DNA

Wird für die Linearisierung von Plasmiden nur ein Restriktionsenzym eingesetzt, liegt die Vektor-DNA nach dem Verdau mit identischen Restriktionserkennungssequenzen an 5'- und 3'- Ende vor. Diese werden von der Ligase bevorzugt religiert, ohne ein DNA-Fragment einzufügen. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe verhindert die Religation des Klonierungsvektors, wodurch die Effizienz der Klonierung erheblich verbessert wird, da eine Ligation dann nur zwischen den freien 5'-Phosphatgruppen der Fremd-DNA und den 3'-OH-Enden des Plasmids möglich ist. Die Hydrolyse der freien 5'-Phosphatreste wird von der alkalischen Phosphatase *CiAP* katalysiert. Die Dephosphorylierung kann direkt im Restriktionsansatz durchgeführt werden, indem dieser mit 10-fachem Dephosphorylierungspuffer und A.d. verdünnt und mit 2-5 U Phosphatase versetzt wird. Die Inkubation erfolgt 1 bis 2 h bei 37°C. Anschließend wird das Enzym durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA in A.d.

DNA-Probenpuffer: 50% (m/V) Glycerol, 0,5% (m/V) Bromphenolblau, 0,5 M EDTA in A.d.

Agarosegelelektrophorese ist die Standardmethode für die Auftrennung, Identifizierung, Reinigung und präparative Isolierung von linearen DNA-Fragmenten. Unter den geleelektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat der Nucleinsäuren ionisiert, so dass die Polydesoxynucleotide als Polyanionen vorliegen. Die DNA-Fragmente wandern somit im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist und ihre Beweglichkeit weitgehend von der Molekülgröße bzw. -länge abhängt. Agarose, ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid, bildet nach Aufkochen in Pufferlösung beim anschließenden Abkühlen eine Matrix aus, die bewirkt, dass kleinere DNA-Fragmente leichter und schneller durch sie hindurch wandern als größere. Durch Variation der Agarosekonzentration können unterschiedliche Trennbereiche erzielt werden. Mit niedrigprozentigen Gelen lassen sich größere DNA-Fragmente separieren, während hochprozentigere Gele der Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente dienen. Die Zugabe DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid, ermöglicht die Visualisierung der DNA-Fragmente nach Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm. Zur Größenbestimmung müssen bei der elektrophoretischen Trennung Größenstandards (DNA-Molekulargewichtsmarker) mit aufgetrennt werden.

Für die Herstellung eines Agarosegels wird die Agarose in TAE-Puffer vorsichtig aufgekocht, bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf 50°C wird die Lösung mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen. Bei Raumtemperatur erstarrt das Gel innerhalb von 30-60 min. Die Auftrennung der mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Fragmente erfolgt in einer mit TAE-Puffer gefüllten DNA-Elektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 20-210 V. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Nucleinsäuremoleküle visualisiert und fotografisch dokumentiert oder zur präparativen Isolierung (Kapitel 2.2.1.4) ausgeschnitten.

2.2.1.4 Extraktion von Nucleinsäuren aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten können diese nach elektrophoretischer Auftrennung mit einem sterilen Einmalskalpell unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Um Veränderungen der DNA in Form von Strangbrüchen und Dimerbildungen zu vermeiden, wird eine UV-Quelle mit geringer Bestrahlungsstärke verwendet und die Expositionszeit der DNA in UV-Licht möglichst gering gehalten. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgt nach dem Protokoll des „QIAquick® Gel

Extraction Kit“. Die DNA wird je nach erwünschter Konzentration mit 20-50µl Elutionspuffer oder A.d. von der Säule eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt werden. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen in wässriger Lösung bei 280 nm liegt, ist es außerdem möglich, durch eine Messung der Extinktion E bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu überprüfen. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit. Je größer der Quotient aus spezifischem (E_{260}) zu unspezifischem Signal (E_{280}) ist, desto reiner ist die Nukleinsäureprobe. Ist der Quotient kleiner als 1,7, so liegen Verunreinigungen vor. Bei Werten zwischen 1,7 und 2,0 handelt es sich um eine reine Nukleinsäurelösung. Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Extinktion beträgt eins ($E_{260}=1$) für doppelsträngige DNA der Konzentration 50 µg/ml und einzelsträngige RNA der Konzentration 40 µg/ml. Die Konzentrationsbestimmung der verwendeten Nukleinsäuren erfolgt mit dieser Methode.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle wird die linearisierte Vektor-DNA mit dem Restriktionsfragment der Fremd-DNA kovalent verknüpft (Sambrook *et al.*, 1989). Das Schließen der Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende wird von der ATP-abhängigen T4-Ligase katalysiert. Vektor- und Fragment-DNA liegen bei der Ligation in einem Verhältnis von 1:3-1:7 vor. Die Menge der eingesetzten DNA wird photometrisch bestimmt oder mittels Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Ligation wird nach dem Protokoll des „Rapid DNA Ligation Kit“ durchgeführt. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit gleicher Menge an linearisiertem Vektor ohne einzufügende Fremd-DNA. Nach erfolgter Ligation kann die rekombinante DNA zur Transformation von kompetenten Bakterien (Kapitel 2.2.2.3) eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.7 Isolierung genomischer DNA aus murinen Zellen

TNE-Puffer: 10 mM Tris, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA

Pronase E: 10 mg/ml Pronase E in 10 mM Tris und 10 mM NaCl (Selbstverdau: 1h; 37°C)

Proteinase K: 10 mg/ml in A.d.

Aufschlusspuffer: 1ml TNE-Puffer; 10 µl Proteinase K; 25 µl Pronase E; 100 µl SDS 10%

Für die Extraktion genomischer DNA aus murinen Zellen werden 10-20 x 10⁶ Zellen in 20-50 µl PBS resuspendiert und der Suspension 500 µl Aufschlusspuffer zugesetzt. Der Ansatz wird zunächst 2 h bei 37°C und anschließend bei 56°C über Nacht schüttelnd (500 Upm) inkubiert. Am nächsten Tag wird die Lösung mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, stark gevortext und anschließend bei 14000 Upm 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und die darin gelöste DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 2 Volumina eiskaltem Ethanol (100%) gefällt. Die DNA wird zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Sedimentvolumen in 50-500 µl A.d. aufgenommen. Die Konzentration kann, wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben, bestimmt werden.

2.2.1.8 Transfer von DNA auf eine Nylon-Membran (Southern-Blot)

SSC-Puffer (2-fach): 300 mM NaCl; 30 mM Natriumcitrat/HCl (pH 7,0)

Der Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Membran erfolgt nach der von E. M. Southern entwickelten Methode (Southern, 1975). Dazu werden zunächst jeweils 10 µg der isolierten genomischen DNA (Kapitel 2.2.1.7) mit je 50 Units eines geeigneten Restriktionsenzym über Nacht verdaut. Die DNA-Fragmente werden anschließend in einem 1%-igen Agarosegel nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.1.3). Um die DNA-Fragmente mit einer DNA-Sonde hybridisieren zu können, muss die doppelsträngige DNA vor dem Transfer in Einzelstrang-DNA überführt werden. Dazu wird das Gel zur Depurinierung der DNA für 30 min mit 0,25 N HCl auf einem Schüttler inkubiert und nach einmaligem Waschen mit A.d. zur Denaturierung der DNA 20 min mit 0,4 N NaOH behandelt. Die positiv geladene Nylonmembran wird zunächst kurz in A.d. getaucht und dann 15 min in 0,4 N NaOH equilibriert. Eine Schale wird mit 0,4 N NaOH gefüllt, eine Glasplatte darüber gelegt und Cellulosefilterkarton (*Whatman-Paper*) so positioniert, dass beide Enden in das NaOH-Reservoir eintauchen. Das Gel wird auf den mit NaOH getränkten Cellulosefilterkarton gelegt und mit der auf Gelgröße zugeschnittenen, equilibrierten Membran so abgedeckt, dass sich zwischen Gel und Membran keine Luftblasen befinden. Nach Abdecken der Membran mit zwei in NaOH getränkten, exakt zugeschnittenen Cellulosekartons wird darauf ein Stapel saugfähiger Papierhandtücher und darüber zum Beschweren ein 1-2 kg schweres Gewicht gelegt. Der Transfer erfolgt durch Kapillarkräfte innerhalb von 4-20 Stunden. Nach dem Transfer wird die Membran in zweifachem SSC-

Puffer gewaschen. Die DNA kann durch dreiminütiges Bestrahlen mit UV-Licht kovalent an die Membran gebunden werden. Die Darstellung bestimmter DNA-Fragmente erfolgt durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (Kapitel 2.2.1.9).

2.2.1.9 Hybridisierung der Membran mit [α - 32 P] dCTP markierter DNA-Sonde

Hybridisierlösung: 50 g Natrium-Dextransulfat; 50 ml SDS (10%); 29 g NaCl in 423 ml A.d

10 mg/ml Salmon-Sperm-DNA

Waschlösung 1: SSC-Puffer (1-fach); 0,1% SDS

Waschlösung 2: SSC-Puffer (0,1-fach); 0,1% SDS

Zur Herstellung einer DNA-Sonde wird ein geeignetes DNA-Fragment durch Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.1.1), Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.3) und anschließende Extraktion (Kapitel 2.2.1.4) vorbereitet. Die Markierung der DNA-Sonde mit [α - 32 P] dCTP erfolgt nach dem Protokoll des „Rediprime® II DNA Labelling System“.

Die Membran wird vor der Hybridisierung 1 h bei 55°C mit Hybridisierungslösung unter Rotation vorinkubiert. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wird durch Aufkochen denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und zur vorinkubierten Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 55°C unter Rotation. Nach Entfernen der radioaktiven Lösung wird die Membran zweimal 15 min mit Waschlösung 1 und anschließend zweimal 10 min bei 65°C mit Waschlösung 2 gewaschen. Die Membran wird in Folie eingeschweißt und die Banden durch Exposition auf einem „Phospho-Imager-Screen“ detektiert.

2.2.1.10 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt nach der Vorschrift des „RNAClean™“-Systems, welches auf einer von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode basiert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierbei werden jeweils 10^7 Zellen mit der „RNAClean™“-Lösung versetzt und durch Vortexen in Lösung gebracht. Die Lösung kann für spätere Verarbeitung bei -80°C gelagert werden. Nach Zugabe von Chloroform und starkem Vortexen bildet sich eine Suspension, die nach 5-minütiger Inkubation auf Eis in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert wird. Der wässrige Überstand wird abgenommen, mit eiskaltem Isopropanol versetzt und zur Fällung der RNA bei -20°C 15 min inkubiert. Die präzipitierte RNA wird bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment nach Waschen mit Ethanol (70%) und Trocknen in 10-50 μ l Wasser aufgenommen. Da RNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse ist, wird sie bei -80°C gelagert.

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist es möglich, *in vitro* Nukleotidsequenzen enzymatisch zu vervielfältigen (Mullis *et al.*, 1986). Die PCR beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen DNA-Strang durch semikonservative Replikation zu verdoppeln, und ihrer Thermostabilität. 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. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase bei Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) den neuen DNA-Doppelstrang (*extension*). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert. Die thermostabile, aus dem marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* gewonnene *Pfu*-Polymerase besitzt neben der 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität eine 3'→5'-Exonuclease-Prüffunktion (*proofreading*) (Lundberg *et al.*, 1991). Die *Pfu*-Polymerase arbeitet mit einer zwölfmal höheren Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase, da sie aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität am 3'-Ende falsch eingebaute Nucleotide entfernt und an deren Stelle das richtige Nucleotid einsetzt. 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 vorgenommen werden, die in Punktmutation, Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Aminosäuren resultieren. Außerdem ist es möglich, durch PCR-Mutagenese neue Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in die Matrizen-DNA einzuführen.

2.2.1.11.1 PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese wird unter Verwendung des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ durchgeführt. Die für den Austausch von Basenpaaren eingesetzten Primer sind komplementär zueinander. Die auszutauschende Sequenz befindet sich in der Mitte der 25 bis 40 Basenpaare langen Oligonukleotide. Optimale Primer haben einen GC-Anteil von mindestens 40% und eine Schmelztemperatur von 78°C (10°C über der optimalen Reaktionstemperatur für die *Pfu*-Polymerase). Da die Primer eine entgegengesetzte Orientierung aufweisen und sich an der gleichen Stelle im Plasmid anlagern, werden nur ringförmige Matrizen effizient amplifiziert.

PCR-Ansatz:	5 μ l	10x Reaktionspuffer
	50 ng	dsDNA-Matrize
	125 ng	3'-Primer
	125 ng	5'-Primer
	2,5 mM	dNTP-Mix
	2,5 U	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
	ad 50 μ l	A.d.

Vor dem ersten Zyklus wird eine Denaturierung durchgeführt, um zu gewährleisten, dass alle Matrizenmoleküle einzelsträngig vorliegen. Nach dem letzten Zyklus schließt sich ein zehnmütiger Polymerisationsschritt an, um der Polymerase zu ermöglichen, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen. Die zu wählende Zyklenzahl hängt von der Art der einzuführenden Mutation ab. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer.

Ablauf der PCR-Reaktion:	1x	95°C, 30 sec	
	16-18x	$\left\{ \begin{array}{l} 95^\circ\text{C}, 30 \text{ sec} \\ 55\text{-}62^\circ\text{C}, 1 \text{ min} \\ 68^\circ, 2 \text{ min/kb Matrizen-DNA} \end{array} \right.$	(Denaturierung)
			(Hybridisierung)
			(Polymerisation)
	1x	68°C, 10 min	

Nach Ablauf der gesamten Reaktion weisen alle Amplifikate die durch die eingesetzten Primer festgelegte Mutation auf. DNA-Moleküle, die mittels PCR vervielfältigt wurden, sind im Gegensatz zu *in vivo* amplifizierten DNA-Plasmiden nicht methyliert. Um die methylierte Matrizen-DNA aus dem Gemisch zu entfernen, wird dieses für 1 h bei 37°C mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* inkubiert, die ausschließlich methylierte DNA schneidet. Anschließend wird die mutierte Plasmid-DNA mit dem „QIAquick® Spin Purification Kit“ aufgereinigt. Für die Transformation werden „Epicurian Coli™ XL-1 Blue“- Bakterien eingesetzt. Dieser Bakterienstamm ist in der Lage, die nicht ligierten Stellen der amplifizierten Plasmide („nicks“), die durch Anheftung der Polymerase bei der Mutagenese entstanden sind, zu reparieren. Außerdem fehlen diesem Stamm die Restriktionssysteme, die nicht methylierte DNA abbauen würden. Die Transformation erfolgt wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben. Zur Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese wird von der Firma „GATC-Biotech, Konstanz“ eine Sequenzanalyse durchgeführt.

2.2.1.11.2 Reverse-Transkriptase PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Es erfolgt zuerst eine cDNA-Einzelstrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR mit spezifischen Primern, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Für die Einzelstrangsynthese können Oligo(dT)- oder „Random“-Primer eingesetzt werden. Die 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primer hybridisieren im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA. „Random“-Primer sind Hexanucleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung. So können sie entsprechend ihrer Sequenz an den verschiedensten Stellen eines mRNA-Moleküls hybridisieren und damit eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten. Außerdem ist es möglich, bereits für die cDNA-Synthese spezifische Primer zu verwenden.

Für die RT-PCR wird das „Titan One Tube RT-PCR Kit“ eingesetzt. Dieses beinhaltet einen Enzymmix, der es erlaubt, die reverse Transkription und die PCR nacheinander in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Für die Einzelstrangsynthese werden dieselben spezifischen Primer wie für die anschließende PCR verwendet. Nach 30-minütiger RT-Reaktion bei 50°C folgt eine PCR mit 35 Zyklen. Die Produkte werden zur Analyse auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, mittels UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Kulturbedingungen

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

Ampicillin-Stammlösung (1000x): 50 mg/ml in A.d., sterilfiltriert

Das Luria-Bertani (LB)- Medium wird entsprechend der Vorschrift angesetzt. Mit Natronlauge wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird das Medium autoklaviert. Das Selektionsmedium enthält zusätzlich 50 µg/ml Ampicillin. Die Anzucht einer Bakterienkultur sollte in Gegenwart eines Antibiotikums stattfinden, um sicherzustellen, dass nur Zellen wachsen können, die ein Resistenz-vermittelndes Plasmid enthalten. Flüssigkulturen werden bei 37°C mit 250 Upm geschüttelt. Für Kulturplatten werden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (m/V) Bactoagar zugesetzt. Nach Abkühlen auf 50°C und Zusatz des entsprechenden Antibiotikums werden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen.

2.2.2.2 Kompetente Bakterien

Nicht behandelte Bakterienzellen nehmen zirkuläre Fremd-DNA nur in geringem Maße auf. Um Bakterien effizient transformieren zu können, muss deshalb die Bakterienwand durch chemische oder physikalische Behandlung durchlässig gemacht werden. Die auf diese Art

behandelten Bakterien werden als „kompetent“ bezeichnet. Kompetente Bakterien müssen bei -80°C gelagert und immer auf Eis aufgetaut werden, da sie sonst die Fähigkeit verlieren DNA aufzunehmen. Die verwendeten Stämme DH5 α und Epicurian XL1-Blue wurden bereits kompetent erworben.

2.2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

SOC-Medium: 2% Bacto-Trypton; 0,55% Bacto-Hefeextrakt; 0,5% 1M NaCl; 0,5% 1M KCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt; autoklaviert
1% 2M Glukose (frisch zugegeben); 1% 2M MgCl₂ (frisch zugegeben); sterilfiltriert

Durch kurzzeitige Hitzebehandlung kann Vektor-DNA in chemisch kompetente Bakterien eingeschleust werden. Dazu werden 50 μl des kompetenten Bakterienstamms auf Eis aufgetaut, mit 0,5 μg Plasmid-DNA (Retransformation) oder 5 μl Ligationsansatz (Kapitel 2.2.1.6) vorsichtig gemischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Durch die Kälte lagern sich die Plasmide an der Zellwand an. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 37°C (DH5 α) bzw. 42°C (Epicurian XL1-Blue) für 45 Sekunden. Durch die schlagartige Erwärmung werden die Plasmide in die Zelle aufgenommen. Danach inkubiert man die Bakterien 2 min auf Eis. Eine Retransformation wird anschließend direkt auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen, während mit Ligationsansatz transformierte Bakterien zunächst für 1 h bei 225 Upm und 37°C in SOC-Medium inkubieren. Die Bakterien werden bei 3000 Upm zentrifugiert und der Überstand bis auf 50 μl verworfen. Das Sediment wird in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die anschließende Inkubation der Platten bei 37°C sollte 12-16 h nicht überschreiten, da sich bei längerer Inkubation Satellitenkolonien bilden können. Durch das auf dem Plasmid befindliche β -Lactamasegen sind nur erfolgreich transformierte Bakterienzellen in der Lage, auf ampicillinhaltigem Nährboden Kolonien zu bilden.

2.2.2.4 Kultivierung der transformierten Bakterien

Die durch die Transformation entstandenen Kolonien werden zur Anreicherung in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Dazu impft man das Medium mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte an und lässt die Bakterienkultur über Nacht bei 37°C und 225 Upm schütteln. Anschließend kann die Vektor-DNA wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben isoliert werden.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi Präparation)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Kulturen erfolgt je nach erwünschter DNA-Menge mit unterschiedlichen Präparationskits. Kleinere Mengen ($<20 \mu\text{g}$), die nur zu

analytischen Zwecken benötigt werden, können mit Hilfe des „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ isoliert werden. Dazu impft man den Klon, der das zu amplifizierende Plasmid enthält in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum an und kultiviert die Bakterien über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C. Mit dem „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ können bis zu 500 µg Plasmid-DNA gewonnen werden, indem man den entsprechenden Klon nach 1-4 h Vorkultur in 200 ml LB-Selektionsmedium überimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wird bei 5000 Upm 5 min abzentrifugiert und das Sediment dem entsprechenden Protokoll folgend aufgearbeitet.

2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

DMEM-Kulturmedium: DMEM; 10% FCS

RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640, 2mM Glutamin; 2% Penicillin/Streptomycin-Lösung; 10% FCS

Zytokin: murines IL-3

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Die adhärennten Zelllinien NIH3T3 und Phoenix E werden in DMEM-Kulturmedium in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert. Bei 90%-iger Konfluenz werden die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung durch enzymatischen Abbau vom Boden abgelöst. Dazu wäscht man die Zellen vorsichtig mit sterilem PBS, versetzt sie anschließend mit einigen Tropfen der Trypsin/EDTA-Lösung und inkubiert die Zellen 1-5 min bei 37°C. Die Inkubationszeit sollte nicht überschritten werden, da die Zellen sonst durch Anverdau der Zellmembran Schaden nehmen können. Nach sichtbarem Ablösen der Zellen werden diese mit Medium abgespült und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Durch das im Medium enthaltene FCS und die Verdünnung wird das Trypsin inaktiviert. Danach werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt. NIH3T3-Zellen werden auf diese Weise alle 4-6 Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Da Phoenix E-Zellen sehr empfindlich auf zu geringe und zu hohe Zelldichte reagieren, müssen diese jeden Tag auf die Hälfte verdünnt werden.

Die Suspensionszelllinien Ba/F3 und 32D werden alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Diese Linien wachsen in RPMI-Kulturmedium in stehenden Zellkulturflaschen und benötigen als Wachstumsfaktor 0,2 ng/ml murines IL-3.

2.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

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

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren werden. Bei Bedarf werden die Dauerkulturen wieder aufgetaut und weiterkultiviert.

Von einer dichten Zellsuspension wird 1 ml entnommen, in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium vermischt und sofort bei -80°C eingefroren. Für längere Lagerung können die Zellen nach 12 h in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.2.3.3 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff wird dieses sofort in ein 37°C -Wasserbad überführt und die Zellen darin aufgetaut. Die Zellsuspension wird vorsichtig in Kulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation wird das enthaltene DMSO entfernt. Für die Kultivierung werden die Zellen anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen werden diese mit Trypanblau inkubiert und in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopiert. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen im mikroskopischen Bild hell, während tote Zellen und Zelltrümmer mit Trypanblau tiefblau gefärbt werden.

Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0,5%-igen Trypanblaulösung werden gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden 4 Großquadrate ausgezählt, wobei man nur vitale, nicht angefärbte Zellen berücksichtigt. Die Zellkonzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) wird ermittelt, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

2.2.3.5 Transfektionsmethoden

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen, wie beispielsweise die liposomale Transfektion (Lipofektion), die Elektroporation oder die retrovirale Transduktion. Die jeweils verwendete Transfektionsmethode ist sowohl von der zu transfizierenden Zelllinie, als auch von deren weiteren Verwendung abhängig. So eignet sich die Lipofektion (Kapitel 2.2.3.5.1), um Plasmid-DNA transient, d.h. vorübergehend, in adhärente Zellen einzubringen, während Suspensionszellen effizienter durch Elektroporation

(Kapitel 2.2.3.5.2) transfiziert werden können. Um ohne Selektion eine stabile Integration der DNA in das Zellgenom zu erreichen, transduziert man die Zielzellen retroviral (Kapitel 2.2.3.5.3).

2.2.3.5.1 Lipofektion adhärenter Zellen

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

Bei der Lipofektion verwendet man kationische Lipide, um die negativ geladenen DNA-Moleküle zu binden und in die Zellen einzuschleusen. Die Komplexe verschmelzen mit der lipophilen Zellmembran oder werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen.

Lipofectamine™2000 wird für die Transfektion der Virus-Produktions-Zelllinie Phoenix E verwendet. Dafür werden die Zellen am Vorabend so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 90-95% aufweisen. Auf einer 60 mm Kulturschale plattiert man 2×10^6 Phoenix E Zellen aus und kultiviert diese über Nacht. Die hohe Dichte ist vor allem dann notwendig, wenn Retrovirus generiert werden soll. Für die Transfektion einer 60 mm Platte werden jeweils 500 μ l Opti-MEM®I mit 20 μ l Lipofectamine™2000 in einem Reaktionsgefäß und mit 10 μ g Plasmid-DNA in einem anderen Reaktionsgefäß gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Ansätze werden miteinander vermischt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Medium auf den Zellen gewechselt, indem man das alte Medium absaugt und durch 3 ml frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt. Anschließend wird der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Für proteinbiochemische Untersuchungen können die Zellen 24-48 h nach der Transfektion geerntet und weiterverarbeitet oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden. Für die Gewinnung von Retroviren (Kapitel 2.2.3.5.3) muss das Transfektionsmedium nach 24 h gewechselt werden und die Zellen werden weiter in Kultur gehalten.

2.2.3.5.2 Elektroporation

Elektroporationsmedium: RPMI 1640; 25% FCS

Bei der Elektroporation werden Zellen in einer DNA-haltigen Lösung einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, der für eine kurze Zeit in der Cytoplasmamembran Poren erzeugt (Neumann *et al.*, 1982; Potter, 1988). Durch diese Poren kann Plasmid-DNA sowohl passiv durch Diffusion als auch elektrophoretisch in die Zelle gelangen (Sukharev *et al.*, 1994).

Die in Suspension wachsenden Zelllinien Ba/F3 und 32D werden durch Elektroporation und anschließende Selektion stabil mit Plasmid-DNA transfiziert. Dafür werden 5×10^6 exponentiell wachsende Zellen aus der Kultur entnommen, bei 1200 Upm 5 min zentrifugiert

und in 400 µl Elektroporationsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine Biorad-Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt und mit 20 µg Plasmid-DNA versetzt. Anschließend werden die Zellen zweimal bei 400 Volt und 950 µF für 5 msec elektroporiert. Für die Weiterkultivierung überführt man die Zellen in 5 ml RPMI-Kulturmedium mit IL-3. Nach 48 h wird mit der Selektion begonnen. Bei Verwendung des Vektors pcDNA 3.1/Zeo (+) kann diese mit 0,5 mg/ml Zeocin erfolgen. Da das Plasmid MSCV MigRI kein Resistenzgen für die Selektion in eukaryotischen Zellen enthält, können MigRI elektroporierte Zellen nur durch durchflußzytometrisches Sortieren (FACSORT) der EGFP-positiven Zellen oder Faktorentzug selektioniert werden. Proliferation und Überleben der murinen Zelllinien Ba/F3 und 32D ist abhängig von IL-3. Wird den Zellen das Zytokin entzogen, gehen diese in Apoptose (Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990). Onkogene sind in der Lage, diese Zelllinien zur IL-3-Unabhängigkeit zu transformieren. Somit können Zellen, welche erfolgreich mit einem Onkogen transfiziert wurden, von nicht transfizierten Zellen durch Faktorentzug getrennt werden.

2.2.3.5.3 Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion

Das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen mit Hilfe von Retroviren wird als retrovirale Transduktion bezeichnet. Retroviren sind in der Lage, ihr einzelsträngiges RNA-Genom nach Infektion einer Zielzelle in komplementäre doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Das virale Hüllprotein (*envelope*) besteht aus einem Transmembranprotein und einem Oberflächenprotein, welches spezifisch mit dem Virusrezeptor an der Oberfläche der Zielzelle interagiert und somit die Virusaufnahme vermittelt. Die Anwesenheit eines geeigneten Rezeptors auf der Zielzelle legt fest, ob die Zelle von dem Virus infiziert werden kann. Das ecotrope Oberflächenprotein interagiert mit einem Aminosäure-Transporterprotein, das nur von Mauszellen exprimiert wird (Wang *et al.*, 1991), was bedingt, dass durch Viruspartikel mit ecotropem Hüllprotein nur murine Zellen transduziert werden können. Die Virusverpackungszelllinie Phoenix E trägt ein retrovirales Provirus, das die für die viralen Proteine kodierenden Gene enthält. Transfiziert man diese Zellen mit einem retroviralen Vektor, der neben dem zu transduzierenden Gen das Verpackungssignal ψ enthält, produzieren die Zellen retrovirale Partikel, die in das Kulturmedium sezerniert werden.

Um Retrovirus zu generieren, werden Phoenix E-Zellen, wie in Kapitel 2.2.3.5.1 beschrieben, transfiziert. 24 h nach der Lipofektion wird das Transfektionsmedium abgenommen und durch 3 ml DMEM-Kulturmedium ersetzt. Der retrovirale Überstand wird 36 und 48 h nach der Transfektion gesammelt, filtriert (0,45 µm) und bei 4°C gelagert. Da die Hüllproteine ecotroper Viren sehr empfindlich gegenüber mechanischer und thermischer Belastung sind,

sollte der retrovirale Überstand nicht erwärmt oder eingefroren werden. Der Virustiter kann wie in Kapitel 2.2.3.8 beschrieben bestimmt werden. Die Transduktion von murinen Zielzellen durch Retrovirus erfolgt durch Inkubation der Zellen mit retroviralem Überstand, welchem zuvor 4 µg/ml Polybren zugesetzt wurde. Das Polykation Polybren verbessert die Interaktion zwischen viralem Oberflächenprotein und zellulärem Virusrezeptor, wodurch eine höhere Transduktionseffizienz erzielt wird (Conti *et al.*, 1991; Arcasoy *et al.*, 1997). Die Transduktionseffizienz kann nach zwei Tagen durchflusszytometrisch bestimmt werden (Kapitel 2.2.3.7).

2.2.3.6 Selektion der Virusverpackungszelllinie

Wie bereits beschrieben, trägt die Verpackungszelllinie Phoenix E ein retrovirales Provirus und stellt somit die viralen Strukturproteine und Enzyme zur Verfügung. Werden die Zellen über längere Zeit kultiviert, kann das zum Verlust des Provirus führen, wodurch die Verpackungseffizienz geringer wird. Die proviralen Gene beinhalten als Selektionsmarker Resistenz vermittelnde Gene für Hygromycin und Diphtherietoxin. Um eine Verringerung des retroviralen Titers zu vermeiden, wird die Zelllinie regelmäßig selektioniert. Dazu werden die Zellen nach 4-6 Wochen Kultur eine Woche unter Zusatz von 300 µg/ml Hygromycin und 2 µg/ml Diphtherietoxin zum DMEM-Kulturmedium kultiviert.

2.2.3.7 Durchflusszytometrische Messung der EGFP-Expression (FACS-Analyse)

Die Transfektionseffizienz kann durchflusszytometrisch bestimmt werden, wenn der zur Transfektion verwendete Vektor für ein fluorochromes Protein kodiert. Bicistronische Vektoren tragen neben dem zu untersuchenden Gen ein zweites Gen, das z.B. für ein Fluorochrom kodiert. Bei dem verwendeten Plasmid MSCV MigRI handelt es sich hierbei um das für das grün fluoreszierende Protein EGFP kodierende Gen. Zwischen den Genen befindet sich die Sequenz für eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES). Beide Gene werden 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 EGFP 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 EGFP-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 EGFP-positiven Zellen wird nach der Messung als Punktwolkendiagramm oder Histogramm dargestellt.

2.2.3.8 Titerbestimmung

Der Virustiter im Überstand der Virusverpackungszelllinie Phoenix E (Kapitel 2.2.3.5.3) wird mittels standardisierter retroviraler Transduktion der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 bestimmt. Dazu werden für jeden zu titrierenden Überstand drei Schalen einer 6-Schalen-Zellkulturplatte mit jeweils $2,5 \times 10^4$ NIH3T3-Zellen beschickt. Nach der durchschnittlichen Verdopplungszeit der Fibroblasten (ca. 14 h) erfolgt die Titerbestimmung in einer Verdünnungsreihe. Der retrovirale Überstand wird im Verhältnis von 1:20, 1:200 und 1:500 mit 4 $\mu\text{g/ml}$ Polybren-haltigem DMEM-Kulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 48-72 h wird die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt (Kapitel 2.2.3.7). Die Berechnung der Einzeltiter (infektiöse retrovirale Partikel pro ml) erfolgt durch Multiplikation von 5×10^4 (Zellzahl bei Infektion) mit dem Verdünnungsfaktor (20, 200 oder 500) und dem prozentualen Anteil der EGFP-positiven Zellen der jeweiligen Verdünnungsstufe. Der Virustiter (CFU/ ml, *colony forming units/ ml*, infektiöse retrovirale Partikel/ ml) entspricht dem Mittelwert der drei unabhängig ermittelten Einzeltiter.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

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 NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/ 10 ml 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.

Nach Zentrifugation der zu lysierenden Zellen wird das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Herstellung von Zelllysaten wird das Sediment in frisch hergestelltem, eiskaltem Lysis-Puffer resuspendiert 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 mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wird die Lösung 10 min bei 95°C gekocht. Nach kurzer Zentrifugation kann das Proteingemisch durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.3) aufgetrennt werden. Alternativ dazu können vor Zugabe des Probenpuffers durch Immunpräzipitation (Kapitel 2.2.4.2) einzelne Proteine aus dem Lysat isoliert werden.

2.2.4.2 Immunpräzipitation

Lysis-Puffer
Protein A-Sepharose-Lösung/ Protein G PLUS- Agarose
Spezifische Antikörper
SDS-Probenpuffer (2-fach)

Durch Immunpräzipitation können einzelne Proteine aus einem Zelllysate isoliert werden. Dabei bindet ein spezifischer Antikörper ein Antigen des zu präzipitierenden Proteins. Die Präzipitation erfolgt durch Adsorption des Antikörper-Protein-Konjugats an Sepharose-gekoppeltes Protein A bzw. Agarose-gekoppeltes Protein G (Protein A/G-*Beads*). Aufgrund der Masse der Sepharose/Agarose lassen sich die Komplexe durch Zentrifugation aus dem Lysat separieren.

Die Zellen werden wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben in 1 ml Lysispuffer lysiert und zur Abtrennung der Zelltrümmer 20 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 20 µl Protein A/G-*Beads* versetzt und 30 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert, um unspezifisch an Protein A/G bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Die *Beads* werden bei 14.000 Upm abzentrifugiert und verworfen. Der verbleibende Überstand wird mit 2 µg des spezifischen Antikörpers versetzt und bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert. Als Negativ-Kontrolle kann die Hälfte des Lysats mit der gleichen Menge eines unspezifischen Antiserums gleichermaßen behandelt werden. Anschließend werden die Lysate mit 30 µl Protein A/G-Lösung bei 4°C 30 min auf dem Rollrad inkubiert. Die gebundenen Immunkomplexe werden 2 min bei 14.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und dreimal mit jeweils 500 µl Lysis-Puffer gewaschen. Das verbleibende Sediment wird mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt, um die präzipitierten Proteine zu denaturieren und sie von den *Beads* abzulösen. Nach kurzer Zentrifugation können die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.3) weiterverarbeitet werden.

2.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED
Sammegel: 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.

Die Wandergeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld hängt von ihrer Größe, Form und elektrischen Ladung ab. Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-

elektrophorese (SDS-DISK-PAGE) werden die Proteine bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer denaturiert und durch den Zusatz des anionischen Detergens SDS die Eigenladung der Proteine dahingehend verändert, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (Laemmli, 1970). Niedermolekulare Thiole bewirken eine Reduktion der Disulfidbrücken in den Polypeptiden. Somit werden Proteine bei der SDS-PAGE ausschließlich nach ihrer molaren Masse aufgetrennt. Im diskontinuierlichen System passieren sie zunächst das Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und des Sammelgels bewirkt eine Fokussierung des Proteingemisches im Sammelgel. Beim Einwandern der Proteine in das Trenngel, das eine geringere Porengröße und einen höheren pH-Wert als das Sammelgel besitzt, werden die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Der Auftrennungsbereich der Proteine kann durch Variation der Trenngelporengröße, also durch variierende Polyacrylamid-Konzentration (5-15%), festgelegt werden.

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels wird das Trenngel je nach gewünschter Auftrennung der Proteine mit 5-15% Polyacrylamid-Lösung angesetzt, luftblasenfrei in die Gelvorrichtung gegossen und mit 500 µl Methanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels, wird das Methanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Kamm entfernt und das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wird die Kammer mit Elektrophoresepuffer 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 (25-120 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, wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben, auf eine PVDF-Membran transferiert.

2.2.4.4 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

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

Nach Abschluss der Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.3) erfolgt der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran unter Verwendung des „*Wet-Blot*“-Verfahrens. Die zugeschnittene PVDF-Membran wird mit Methanol benetzt und in Transferpuffer überführt. Das SDS-Gel wird in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale luftblasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen zwei Schichten Cellulosefilterkarton (*Whatman-Paper*) eingespannt. Anschließend werden die Schichten 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 konstantem Stromfluss (1000 mA). Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine.

2.2.4.5 Immunochemischer Nachweis von transferierten Proteinen

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

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

Bei der Immunfärbung werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert und mittels eines Chemolumineszenz-Systems nachgewiesen. Dazu wird die Membran unmittelbar nach dem Transfer (Kapitel 2.2.4.4) in PBST-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C in Blockier-Puffer inkubiert. Das Blockieren dient dazu, überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Da einige Milchproteine in phosphorylierter Form vorliegen und somit eine Reaktion mit phosphospezifischen Antikörpern eingehen können, wird bei Detektion phosphorylierter Proteine Blockier-Puffer mit BSA verwendet. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird entsprechend der Angaben des Herstellers in Blockier-Puffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgt innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Nach Inkubation mit Primärantikörper wird die Membran dreimal 10 min mit PBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend inkubiert man die Membran bei Raumtemperatur mit einem gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine weitere Stunde. Die Membran wird daraufhin zweimal mit PBST-Puffer sowie einmal mit PBS gewaschen und zur Detektion mit Chemolumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt. Das erzeugte Signal wird auf einen Hyperfilm übertragen und dokumentiert.

2.2.4.6 Entfernen gebundener Antikörper von der Membran

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 10 % Essigsäure; 10 % Methanol in A.d.

Um die an eine Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, wird die Membran zweimal 15 min mit Amidoschwarz-Entfärbelösung schüttelnd inkubiert und anschließend mit A.d. gewaschen. Eine auf diese Weise behandelte Membran kann erneut, wie in Kapitel 2.2.4.5 beschrieben, geblockt und mit Antikörper inkubiert werden.

2.2.5 Biologische Untersuchungen

2.2.5.1 Messung der proliferativen Aktivität

Über eine Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen kann die Proliferation von Zellen quantitativ bestimmt werden. Das gelbe Substrat MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazoliumsalz) wird von metabolisch aktiven Zellen zu einem braunen Formazan reduziert, dessen Absorptionsmaximum bei 490 nm liegt. Die durch Absorptionsmessung bei 490 nm bestimmte Menge des Produkts ist direkt proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen.

Die Messung der proliferativen Aktivität erfolgt nach der Vorschrift des „CellTiter®AQ_{ueous} Cell Proliferation Assay“-Systems. Dazu werden die Zellen in Flachboden-96-Loch-Mikrotitrationsplatten in einem Volumen von 100 µl pro Kavität kultiviert. Die Zellzahl pro Loch ist abhängig von der eingesetzten Zelllinie und der Dauer der Messung. Für jeden Messzeitpunkt wird eine Platte angesetzt. 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 40 µl MTS (10 mg/ml) pro Loch zugegeben und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 25 µl SDS-Lösung (10%) abgestoppt und die Absorption bei 490 nm gemessen.

2.2.5.2 Apoptose-Messung

Bindungs-Puffer: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂ in A.d.
FITC-konjugiertes Annexin V
Propidiumiodid-Lösung: 50 µg/ml PI in PBS

Im frühen Stadium der Apoptose kommt es zur Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin und wird deshalb verwendet, um apoptotische Zellen zu identifizieren. Durch Konjugation von Annexin V mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC ist die Detektion im Durchflusszytometer möglich. Nach Ablauf des programmierten Zelltods verliert die Membran der Zellen ihre Integrität und der DNA-interkalierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) kann in die Zellen eindringen. Die Zellen können nach Behandlung mit Annexin V-FITC/ PI im Durchflusszytometer gemessen und in verschiedene Stadien des programmierten Zelltods eingeordnet werden. Zellen, die nur FITC-positiv sind, befinden sich in einem frühen Stadium der Apoptose, während sich doppelt positive Zellen im Endstadium des programmierten Zelltods befinden (Abb. 5; blaue Markierung). Nekrotische Zellen werden nur noch durch Propidiumiodid angefärbt (Abb. 5; grüne Markierung) Für beide Farbstoffe negative Zellen werden als viabel angesehen (Abb. 5; rote Markierung).

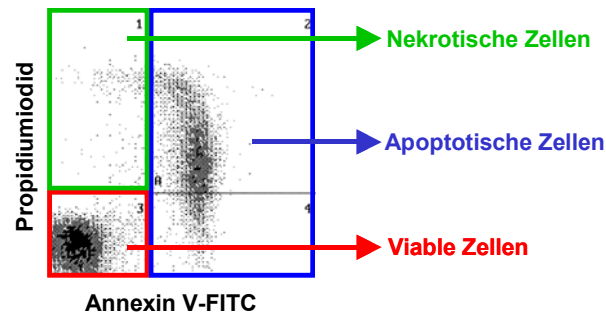


Abb. 5: Darstellung der Apoptose-Messung durch Annexin V-FITC/ PI-Färbung

Für die Apoptose-Messung werden 1×10^6 Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Bindungs-Puffer resuspendiert. 100 μ l dieser Zellsuspension werden mit 5 μ l Annexin V-FITC und 10 μ l Propidiumiodid versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss werden 400 μ l Bindungs-Puffer pro Ansatz zugegeben. Die anschließende durchflusszytometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde stattfinden.

2.2.6 Tiermodell

2.2.6.1 Präparation von Knochenmarkzellen aus Spendermäusen

Basales Knochenmarksmedium (BBMM): 325 ml IMDM; 150 ml FCS; 25 ml BSA (10% in IMDM); 5 ml L-Glutamin-Lösung (200mM); 100 μ M 2-Mercaptoethanol; 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung

Zur Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark männlicher Balb/C-Mäuse, wird diesen 5-Fluorouracil (150 mg/kg) intravenös verabreicht (Spain und Mulligan, 1992). Nach 4 Tagen werden die Spendermäuse durch zervikale Dislokation getötet und Femur und Tibia beider Beine chirurgisch entnommen. Anschließend wird das Knochenmark mit BBMM unter Verwendung einer Injektionskanüle (27G 3/4) aus den Knochen gespült und durch ein Zellsieb der Porenweite 100 μ m pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zentrifugation erfolgt bei 1000 Upm für 6 min.

2.2.6.2 Prästimulation von murinen Knochenmarkzellen

Prästimulationsmedium: BBMM; 10 ng/ml mIL-3; 12 ng/ml mIL-6; 50 ng/ml mSCF

Retrovirale Transduktion ist ausschließlich bei sich teilenden Zellen möglich. Deshalb ist es notwendig, die Knochenmarkzellen vor der Infektion zu stimulieren. Dazu werden diese direkt nach der Präparation (Kapitel 2.2.6.1) in Prästimulationsmedium aufgenommen und ca. 20 h bei 37°C kultiviert.

2.2.6.3 Retrovirale Transduktion der Knochenmarkzellen

Vor Infektion der Knochenmarkzellen wird der durch Transfektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix E gewonnene retrovirale Überstand (Kapitel 2.2.3.5.3) wie in Kapitel 2.2.3.8 beschrieben titriert. Für die Knochenmarkinfektion eignen sich retrovirale Überstände, deren Virustiter über 1×10^5 CFU/ml liegt. Der retrovirale Gentransfer in die Knochenmarkzellen wird mit Hilfe der „Spin“-Infektion durchgeführt. Bei dieser Methode werden die prästimulierten Zellen nach Zentrifugation in BBMM (1/4 des Gesamtvolumens) aufgenommen und die Zellsuspension mit retroviralem Überstand (3/4 des Gesamtvolumens) vermischt. Nach Supplementierung des Gemisches mit 10 ng/ml mL-3, 12 ng/ml mL-6, 50 ng/ml mSCF und 4 µg/ml Polybren wird der Infektionsansatz in eine 12-Schalen-Mikrotiterplatte verteilt und diese bei 1200 x g und 32°C 90 min zentrifugiert („Spin“-Infektion). Anschließend werden die Zellen bei den üblichen Bedingungen weiterkultiviert. Die „Spin“-Infektion wird insgesamt viermal im Abstand von 12 h durchgeführt, wobei vor jedem Zentrifugationsschritt Medium, retroviraler Überstand und Supplemente erneuert werden. Nach weiterer 12-stündiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen zentrifugiert, in HBSS resuspendiert und transplantiert (Kapitel 2.2.6.4). Vor Transplantation der Empfängermause mit den transduzierten Zellen, wird der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Kapitel 2.2.3.7).

2.2.6.4 Knochenmarktransplantation

Die 6 - 8 Wochen alten, weiblichen Balb/C- Empfängermause werden vor der Knochenmarktransplantation mit einer Dosis von 800 rad (8 Gy) letal bestrahlt. Durch diese myeloablative Bestrahlung ist gewährleistet, dass deren Hämatopoese nach der Transplantation ausschließlich von den Spenderzellen ausgeht. Die Transplantation erfolgt durch intravenöse Injektion der Knochenmarkzellen in die Schwanzvene der Mäuse. Das Volumen der Zellsuspension pro Injektion sollte 200 µl nicht überschreiten. Eine Rekonstitution der letal bestrahlten, transplantierten Mäuse ist nach etwa 10 Tagen zu erwarten.

2.2.6.5 Überwachung der transplantierten Mäuse

Um die Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung zu erkennen und den Verlauf einer solchen zu überwachen, wird ab dem Zeitpunkt der Rekonstitution in regelmäßigen Abständen peripheres Blut aus der Schwanzvene abgenommen und analysiert.

Ein Blutbild wird aus 20 µl peripherem Blut erstellt. Um Gerinnung zu verhindern, entnimmt man das Blut mit einer EDTA-beschichteten Kapillare. Zur Analyse wird es in das Blutbildgerät (VetABC-Blood-Counter) überführt. Ein Tropfen peripheres Blut wird verwendet,

um einen Blutausschlag anzufertigen. Hierbei wird das Blut auf die untere Hälfte eines Glasobjektträgers getropft und mit der Kante eines zweiten Trägers ausgestrichen. Für Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop werden die Ausschläge direkt nach Anfertigung verwendet. Lichtmikroskopische Untersuchungen werden nach Pappenheimfärbung durchgeführt. Die Blutausschläge wurden freundlicherweise vom „Hämatologischen Routinelabor“ gefärbt.

Für eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung (Kapitel 2.2.6.8) des peripheren Bluts werden 100-200 µl Blut in ein EDTA-gefülltes Röhrchen abgenommen und die Erythrozyten durch hypotone Lyse entfernt (Kapitel 2.2.6.6).

2.2.6.6 Hypotone Lyse von Erythrozyten

RBC (Red Blood Cell)-Puffer: 150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA, pH7.3 in A.d.

Das frisch entnommene periphere Blut wird im zehnfachen Volumen RBC-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Durch den hypotonen Puffer schwellen die Erythrozyten an und lysieren. Nach Zentrifugation (1000 Upm, 8 min) wird der Überstand verworfen und das Sediment, das die Leukozyten enthält, mit PBS gewaschen.

2.2.6.7 Aufbereitung von Organen transplantierte Mäuse

Nach Versterben der Mäuse infolge einer hämatologischen Erkrankung, werden diese auf pathologische Veränderungen der Organe untersucht. Nach Eröffnen von Abdomen und Thorax erfolgt eine Splenektomie und das Entfernen von Femur und Tibia. Falls weitere Organe (Thymus, Lymphknoten, etc.) pathologisch vergrößert sind oder sich Tumoren gebildet haben, werden auch diese entnommen. Alle Gewebe und Organe werden gewogen und vermessen und bis zur weiteren Verarbeitung in HBSS aufbewahrt. Die Knochenmarkszellen werden, wie in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben, gewonnen. Von allen Organen wird ein kleiner Teil zur späteren histologischen Untersuchung in Formaldehyd-Lösung (4% in PBS) konserviert. Der Rest wird mit einem Skalpell zerkleinert und zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen durch ein 100 µm Zellsieb gespült. Ein Teil der so gewonnenen Zellen wird durchflusszytometrisch immunphänotypisiert (Kapitel 2.2.6.8), während die verbleibenden Zellen für spätere Analytik viabel kryokonserviert werden (Kapitel 2.2.3.2).

2.2.6.8 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

FACS-Puffer: 0,1% BSA in PBS

Bei der Immunphänotypisierung werden zellspezifische Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten spezifischen Antikörpern markiert und in einem

Durchflusszytometer analysiert (vgl. 2.2.3.7). Da die Antikörper spezifische Antigene erkennen, ist die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Antigendichte auf der jeweiligen Zelle. Durch Kombination mehrerer mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelter Antikörper können auch Subpopulationen gemessen werden.

Zur Phänotypisierung werden die aufgearbeiteten Zellen (aus den Kapiteln 2.2.6.6 und 2.2.6.7) in FACS-Puffer aufgenommen und in eine 96-Loch-Mikrotitrierplatte verteilt. Pro spezifischem Antikörper und Zellart verwendet man eine Vertiefung. Das Volumen pro Kavität beträgt 200 μ l. Die F_c-Block™-Lösung und alle Antikörperlösungen werden im Verhältnis von 1:10 mit FACS-Puffer verdünnt eingesetzt. Jedem Loch werden zum Maskieren unspezifischer Bindungsstellen 3 μ l F_c-Block™-Lösung zugesetzt. Nach Zugabe von 3 μ l des CyChrome™-gekoppelten CD45-Panleukozytenmarkers pipettiert man jeweils 3 μ l der Phycoerythrin (PE)-gekoppelten, spezifischen Antikörper zu. Der Ansatz inkubiert unter Ausschluss von Licht mindestens 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Platte bei 4°C und 1450 Upm 5 min zentrifugiert, und die Zellen werden dreimal mit jeweils 200 μ l FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen werden in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Vor der Analyse im Durchflusszytometer wird jedem Ansatz 1 μ g/ml Propidiumiodid zugesetzt, um den Ausschluss toter Zellen in der Auswertung zu ermöglichen.

Die Auswertung erfolgt wie in Abb. 6 schematisch dargestellt.

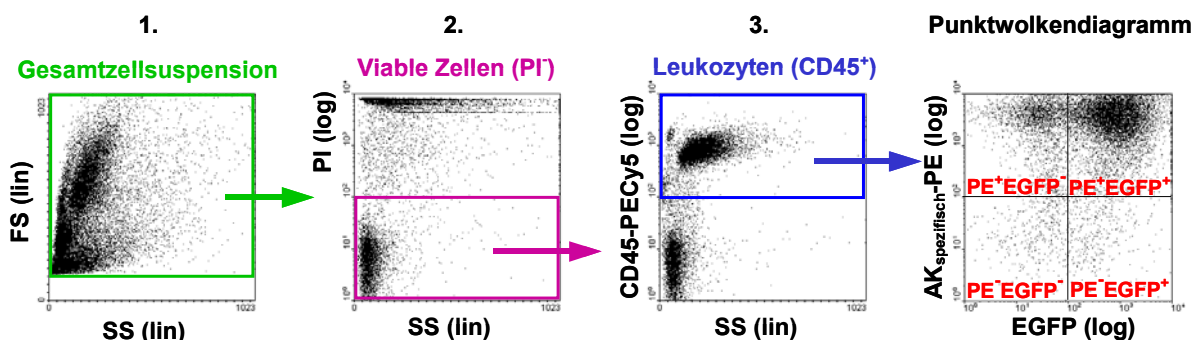


Abb. 6: Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

Zur Generierung der Punktwolkendiagramme mit Auftragung der EGFP-Expression auf der X- und PE-Fluoreszenz auf der Y-Achse durchlaufen die Zellen folgende Ausschlusskriterien:

1. Die Gesamtzellsuspension geht in die Analyse von Größe (Forward Scatter; FS) und Granularität (Sideward Scatter; SC) ein. Dort werden Zelldoubletten und -trümmer ausgeschlossen.
2. Tote Zellen verlieren ihre Membranintegrität und können deshalb mit Propidiumiodid (PI) gefärbt werden. Im zweiten Schritt werden nur die viablen Zellen, welche keine PI-Fluoreszenz zeigen ausgewählt (rosa).
3. In die eigentliche Analyse gehen letztendlich nur die Leukozyten ein. Dazu werden die Zellen mit dem CyChrome™-gekoppelten Panleukozytenmarker (anti CD45) gefärbt.

lin: lineare Darstellung; log: logarithmische Darstellung; -: negativ; +: positiv.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung verschiedener Mutanten des FLT3-Rezeptors im Zellmodell

Eine charakteristische Eigenschaft von Rezeptortyrosinkinasen ist es, in nicht stimuliertem Zustand dephosphoryliert und somit inaktiv vorzuliegen. Eine Stimulation des Rezeptors durch den entsprechenden spezifischen Liganden führt zu Konformationsänderungen des Rezeptors. Dadurch wird eine Dimerisierung induziert, welche es dem Rezeptor ermöglicht, sich selbst zu phosphorylieren (Autophosphorylierung) und anschließend verschiedene intrazelluläre Signalwege zu aktivieren (Ullrich und Schlessinger, 1990; Heldin, 1995). Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen können diese Regulation aufheben. Es ist bekannt, dass sowohl ITD (*internal tandem duplication*)-Mutationen der juxtamembranären Domäne als auch Punktmutationen des Aspartat 835 (D835) in der zweiten Tyrosinkinasedomäne (TKD) des FLT3-Rezeptors zur konstitutiven, Liganden-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors führen (Kiyoi *et al.*, 1998; Fenski *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001; Kiyoi *et al.*, 2002).

Vor kurzem wurden zwei neue, bislang noch nicht charakterisierte Mutationen des FLT3-Rezeptors in AML-Patienten identifiziert. Hierbei handelt es sich um eine Deletion des Isoleucin 836 (I836del) und die Mutation des Isoleucin 836 zu Methionin mit gleichzeitiger Insertion eines Arginin (I836M+R) (Thiede *et al.*, 2002). Diese Mutanten werden im Folgenden charakterisiert und mit den bereits untersuchten Mutanten verglichen.

3.1.1 Herstellung der FLT3-Rezeptormutanten

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten FLT3-Rezeptormutanten diente als Matrize die cDNA eines chimären FLT3-Rezeptors (Mizuki *et al.*, 2000). Für die Generierung dieses murin-humanen Mischkonstrukts wurde von Mizuki *et al.* ein die Nukleotide 1570 bis 2077 umfassendes Fragment des murinen Rezeptors durch das entsprechende humane FLT3-Rezeptorfragment (nt 1567 bis nt 2077) substituiert (Abb. 7). Auf diese Weise wurde auch der in dieser Arbeit verwendete FLT3-Rezeptor mit ITD-Mutation generiert. Es handelt sich hierbei um eine Längenmutation der für die juxtamembranäre Domäne kodierenden Sequenz, welche in einer Duplikation von sechs Aminosäuren resultiert (in Abb. 7 rot dargestellt).

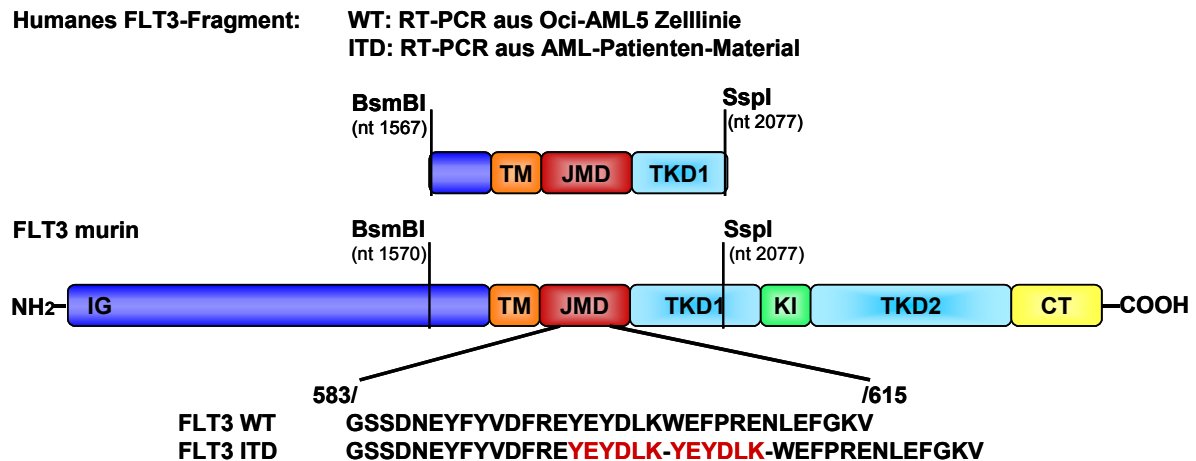


Abb. 7: Schematische Darstellung des chimären FLT3-Rezeptor (nach Mizuki *et al.*, 2000)

IG: Immunglobulin-ähnliche Domäne; TM: Transmembranäre Domäne; JMD: Juxtamembranäre Domäne; TKD1/2: Tyrosinkinasedomänen; KI: Kinaseinsert; CT: C-terminale Domäne; WT: Wildtyp; ITD: Interne Tandem-Duplikation; nt: Nukleotide

Während der murine FLT3-Rezeptor aus 1000 Aminosäuren besteht (Rosnet *et al.*, 1991a), kodiert das humane FLT3-Gen für ein Protein, welches aus 993 Aminosäuren aufgebaut ist (Rosnet *et al.*, 1993a). Durch diesen Längenunterschied kommt es zu einer abweichenden Nummerierung der Aminosäuren. So entsprechen die Aminosäuren Aspartat 835 und Isoleucin 836 des humanen FLT3-Rezeptors dem Aspartat 838 und Isoleucin 839 im murinen FLT3. Da es sich bei den verwendeten Konstrukten um FLT3-Rezeptoren handelt, die zu einem Großteil aus der murinen Sequenz bestehen, basiert die im Folgenden verwendete Nummerierung der Aminosäuren auf der Aminosäuresequenz des murinen FLT3.

Um verschiedene Punktmutanten des FLT3-Rezeptors zu generieren, wurde die für den Wildtyp-Rezeptor kodierende cDNA zunächst in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA 3.1/Zeo (+) subkloniert. Mittels PCR-Mutagenese (Kapitel 2.2.1.11.1) konnten die Punktmutationen Aspartat 838 zu Tyrosin (D838Y), Isoleucin 839 zu Methionin mit Insertion von Arginin (I839M+R) und eine Deletion des Isoleucin 839 (I839del) in die zweite Tyrosinkinasedomäne (TK2) von FLT3 eingebracht werden. Dazu wurden entsprechend konstruierte PCR-Primer verwendet, welche die einzuführenden Sequenzen enthielten. Außerdem enthielten die Primer zusätzlich zwei von der Originalsequenz abweichende Nukleotide, welche die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NheI* herstellten, jedoch nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führten (stille Mutation). Durch das Einführen einer neuen Schnittstelle war es möglich, die erfolgreiche Mutagenese durch einen Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.1.1) mit *NheI* und anschließender Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.3) zu überprüfen. In Abb. 8 ist diese Kontrolle exemplarisch für die Aspartat 838 zu Tyrosin (D838Y) Mutation dargestellt. Drei Klone (#1-3) wurden untersucht. Als Negativkontrolle diente hierbei das FLT3-Wildtypkonstrukt. Die Restriktion

der Konstrukte mit *NheI* ergab ein Bandenmuster, das bei FLT3-WT aus drei und bei dem durch PCR-Mutagenese veränderten FLT3-Konstrukt aus 4 Banden bestand und somit auf eine erfolgreiche Mutagenese hindeutete. Um diese zu bestätigen und auszuschließen, dass durch die PCR unerwünschte Mutationen eingefügt wurden, wurden alle so generierten Punktmutanten sequenziert.

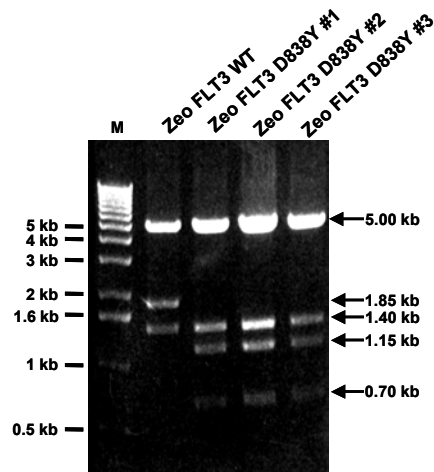


Abb. 8: Analyse der durch PCR-Mutagenese generierten FLT3 D838Y Punktmutante

Nach erfolgter PCR-Mutagenese wurde die DNA aus drei Klonen isoliert und 2 Stunden mit *NheI* inkubiert, anschließend in einem 0,9%-igen Agarosegel aufgetrennt und visualisiert. Als Negativkontrolle diente das WT-Konstrukt. Zeo: pcDNA3.1/Zeo(+); Kb: Kilobasen; M: 1kb DNA-Molekulargewichtsmarker; WT: Wildtyp

3.1.2 Konstitutive Aktivierung der mutierten FLT3-Rezeptoren

Wie bereits beschrieben, liegt der nicht stimulierte Wildtyp-FLT3-Rezeptor in unphosphoryliertem Zustand vor. Stimulation durch Bindung des FLT3-Liganden (FL) führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden. Im Gegensatz dazu sind FLT3-ITD und FLT3 D838Y konstitutiv, d.h. ohne FL-Stimulation autophosphoryliert. Um zu untersuchen, ob die Mutationen an Position 839 auch in der Lage sind, den FLT3-Rezeptor konstitutiv zu aktivieren, wurden die FLT3-Mutanten in Phoenix E-Zellen überexprimiert (Kapitel 2.2.3.5.1) und daraus Zelllysate gewonnen (Kapitel 2.2.4.1). Als Kontrolle dienten Zellen, in welche der Wildtyp-Rezeptor (FLT3-WT), FLT3-ITD oder FLT3 D838Y eingebracht wurde. Da die Autophosphorylierung von FLT3 im Gesamtzelllysat nicht nachweisbar war, wurde eine FLT3-Immünpräzipitation (Kapitel 2.2.4.2) durchgeführt, um den FLT3-Rezeptor anzureichern. Die Immunkomplexe und das Gesamtzelllysate wurden denaturiert und durch SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.4.3). In Abb. 9a ist das präzipitierte FLT3-Protein dargestellt. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Detektion mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine (anti Phosphotyrosin; anti pY), der untere Teil den Nachweis des FLT3-Proteins (anti FLT3) auf der selben Membran.

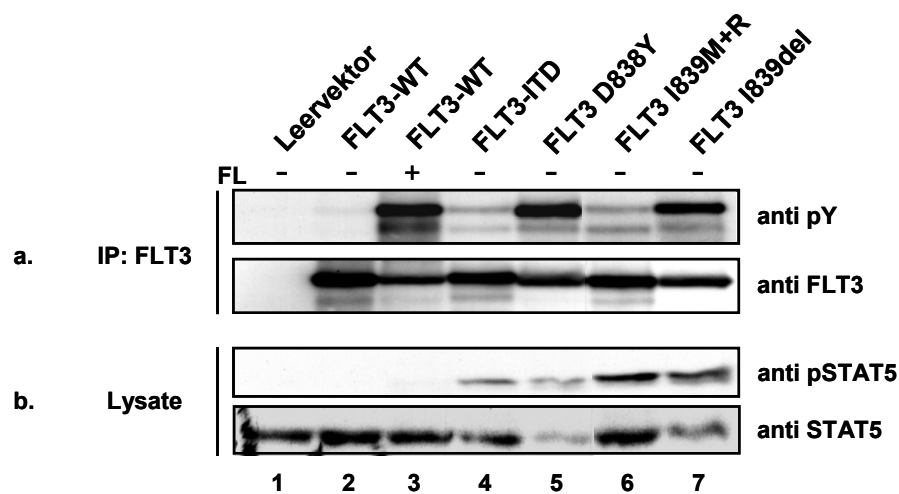


Abb. 9: Mutationen an Position I839 bewirken eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors

Die angegebenen FLT3-Konstrukte und der Leervektor wurden transient in Phoenix E-Zellen überexprimiert und daraus Zelllysate gewonnen. Die FLT3-WT exprimierenden Zellen wurden entweder nicht behandelt (-FL) oder 10 min mit 50 ng/ml FLT3-Ligand (+FL) stimuliert.

a.: Der FLT3-Rezeptor wurde aus den Zelllysaten immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch separiert. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem anti pY-Antikörper (oben) und einem anti FLT3-Antikörper auf der gleichen Membran nach Entfernen des ersten Antikörpers (unten).

b.: Darstellung der Gesamtzelllysate mit einem anti pSTAT5-Antikörper (oben) und einem anti STAT5-Antikörper auf der gleichen Membran nach Entfernen des ersten Antikörpers (unten).

Eine äquivalente Präzipitation aller FLT3 Proteine ist die Voraussetzung für einen quantitativen Vergleich der Autophosphorylierung. Im unteren Teil der Abb. 9a (IP: FLT3, Blot: FLT3) ist anhand der Intensität der Banden zu erkennen, dass vergleichbare Mengen an FLT3-Protein präzipitiert wurden. Die Detektion einer Doppelbande zeigt das Vorliegen zweier Formen des Rezeptors an. Die untere Bande entspricht der nativen, unreifen Form, während die obere Bande die posttranslational glykosylierte, reife Form von FLT3 darstellt. Das etwas größere Molekulargewicht von FLT3-ITD, bedingt durch die Duplikation von sechs Aminosäuren in der juxtamembranären Domäne (siehe Abb. 7), hat zur Folge, dass die Bande in der vierten Spur etwas höher läuft. In der ersten Spur wurde das FLT3-Präzipitat aus mit Leervektor transfizierten Phoenix E-Zellen aufgetragen. Da diese Zelllinie den FLT3-Rezeptor endogen nicht exprimiert, ist in dieser Spur kein Signal zu erkennen, wodurch die Spezifität der Immunpräzipitation belegt ist.

Die Darstellung der Präzipitate mit dem anti pY-Antikörper (Abb. 9a, oben) zeigt, dass beide I839 Mutanten des FLT3-Rezeptors konstitutiv autophosphoryliert vorliegen. Bezüglich der sehr starken Autophosphorylierung ist die Deletionsmutante (FLT3 I839del; Spur 7) mit der Aspartat zu Tyrosin Mutante (FLT3 D838Y; Spur 5) vergleichbar. Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung der I839M+R Mutante (FLT3 I839M+R; Spur 6) nur schwach ausgeprägt und somit der FLT3-ITD Phosphorylierung ähnlich. Das Immunpräzipitat des unstimulierten FLT3-Wildtyp-Rezeptors lässt keine Phosphorylierung erkennen (FLT3-WT -FL; Spur 2),

was bestätigt, dass dieser nicht konstitutiv aktiv ist. Nach Stimulation mit dem FLT3-Liganden liegt er jedoch ebenso stark phosphoryliert vor wie die D838Y und I839del Mutanten (FLT3-WT +FL; Spur 3).

Es wurde beschrieben, dass die konstitutive Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors, hervorgerufen durch ITD- oder D838-Mutationen, in einer Aktivierung des STAT5-Signalwegs resultiert (Fenski *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob die konstitutive Kinaseaktivität der FLT3 I839-Mutanten auch zur Aktivierung dieser Signalkaskade führt, wurden die Gesamtzelllysate auf STAT5-Phosphorylierung hin untersucht. In der Abbildung der Lysate mit einem gegen das phosphorylierte STAT5-Protein gerichteten Antikörper (anti pSTAT5) (Abb. 9b oben), ist eine Aktivierung von STAT5 durch alle FLT3-Mutanten zu erkennen (Spuren 4-7). Wie bereits beschrieben (Hayakawa *et al.*, 2000), kam es trotz starker Autophosphorylierung des stimulierten FLT3-WT Rezeptors nicht zu einer Aktivierung des STAT5-Signalweges (Spur 3). Dies weist darauf hin, dass Mutationen im FLT3-Rezeptor nicht nur zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen, sondern auch zusätzliche, unphysiologische Signalwege aktivieren können.

3.1.3 Transformierende Aktivität der FLT3 I839-Mutanten in Ba/F3- und 32D-Zellen

Die bisherigen Experimente zeigten, dass sowohl die I839del- als auch die I839M+R-Mutanten des FLT3-Rezeptors bei Überexpression in Phoenix E-Zellen konstitutiv autophosphoryliert sind und zur Aktivierung des STAT5-Signalweges führen. Um die biologische Relevanz dieser konstitutiven Aktivierung in hämatopoetischen Zellen zu untersuchen, wurde die Pre-B-Zelllinie Ba/F3 und die myeloide Zelllinie 32D gewählt. Diese Zelllinien gelten als Modellzelllinien für den Nachweis transformierender Eigenschaften von Onkogenen. Proliferation und Überleben dieser murinen Zelllinien ist abhängig von IL-3. Wird den Zellen das Zytokin entzogen, gehen sie in Apoptose (Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990). Onkogene sind in der Lage, diese Zelllinien zur Faktorunabhängigkeit zu transformieren. In den beschriebenen Modellsystemen wurde bereits die transformierende Aktivität von FLT3-ITD und verschiedenen D838-Mutanten des Rezeptors belegt (Fenski *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001; Kiyoi *et al.*, 2002; Spiekermann *et al.*, 2003a).

3.1.3.1 Selektion durch kompetitiven Proliferationsvorteil

Durch die Aufhebung der Faktorabhängigkeit können Zellen, welche mit einem Onkogen transfiziert wurden, von nicht transfizierten Zellen durch Faktorentzug getrennt werden. Um erfolgreich transfizierte von nicht transfizierten Zellen unterscheiden zu können, wurden alle

FLT3-Konstrukte in den bicistronischen Vektor MSCV MigRI subkloniert. Bicistronische Vektoren tragen neben dem zu untersuchenden Gen ein zweites Gen, das z.B. für ein fluorochromes Protein kodiert. Bei dem verwendeten Plasmid MSCV MigRI handelt es sich hierbei um das für das grün fluoreszierende Protein EGFP kodierende Gen. Zwischen den Genen befindet sich die Sequenz für eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES; *internal ribosomal entry site*). Beide Gene werden zu einer gemeinsamen mRNA transkribiert. Von diesem Transkript erfolgt die parallele Translation beider Gene zu einzelnen Proteinen, wobei die IRES die Translation des zweiten Gens vermittelt. Somit exprimieren alle erfolgreich transfizierten Zellen zusätzlich EGFP und können dadurch im Durchflusszytometer (FACScan) detektiert werden (Kapitel 2.2.3.7). Nach erfolgreicher Subklonierung wurden alle Mig FLT3-Konstrukte in Ba/F3- und 32D-Zellen elektroporiert (Kapitel 2.2.3.5.2) und die Zellen für 48 Stunden mit IL-3 kultiviert. Nach anschließendem Faktorentzug wurde den Zellsuspensionen alle sieben Tage ein Aliquot entnommen und dieses durchflusszytometrisch analysiert. Die entnommenen Volumina wurden jeweils durch Kulturmedium ersetzt.

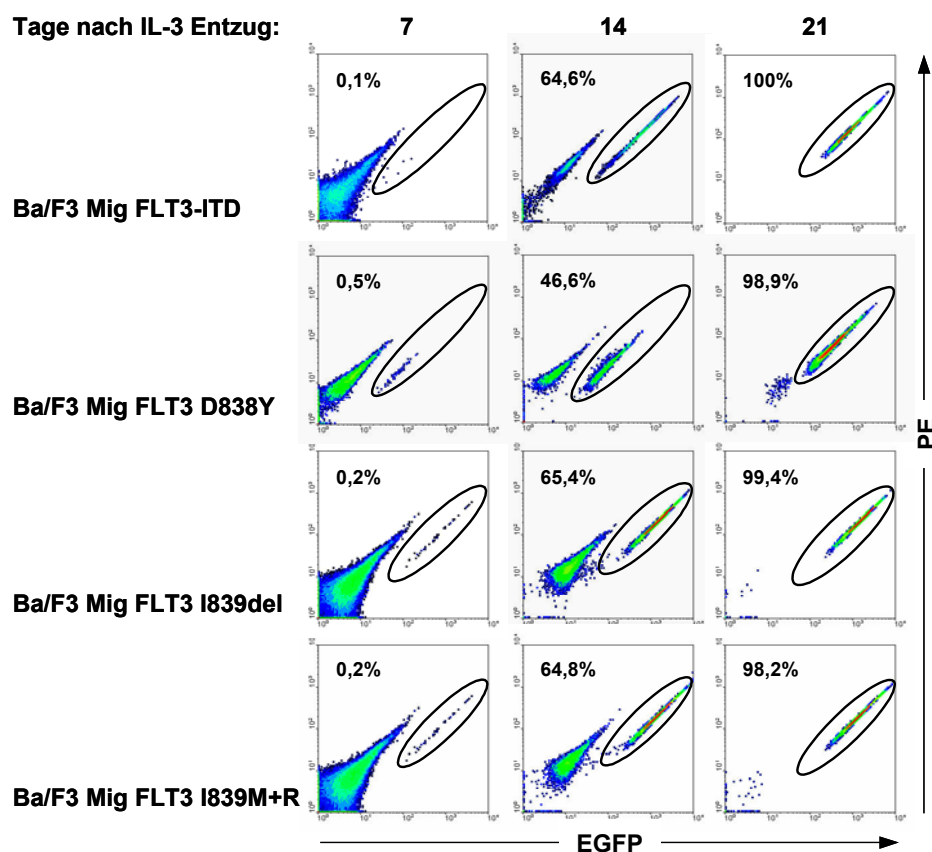


Abb. 10: Kompetitiver Proliferationsvorteil der die FLT3-Mutanten exprimierenden Ba/F3 Zellen

Ba/F3-Zellen wurden mit den angegebenen FLT3-Mutanten elektroporiert und zwei Tage mit IL-3 kultiviert. Nach anschließendem Faktorentzug wurde den Zellsuspensionen alle sieben Tage ein Aliquot entnommen und dieses durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil der FLT3 (EGFP)-positiven Zellen (schwarze Ellipse). IL-3: Interleukin-3; EGFP (enhanced green fluorescent protein): grün fluoreszierendes Protein (Kanal 1 des Durchflusszytometers); PE: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

In Abb. 10 ist die Selektion der transformierten Ba/F3- bzw. 32D- Zellen exemplarisch anhand der Ba/F3-Zellen dargestellt. Durch die Koexpression von EGFP verschiebt sich das Abbild der erfolgreich mit den Mig FLT3-Konstrukten transfizierten Zellen nach rechts (Abb. 10, schwarze Ellipsen). Nach IL-3 Entzug zeigten alle Ba/F3 FLT3-positiven Zellen einen kompetitiven Proliferationsvorteil gegenüber den IL-3 abhängigen, nicht transfizierten Ba/F3-Parentalzellen. Es konnte eine Expansion der EGFP-positiven Zellen von 0,1 bis 0,5% am Tag 7 auf Werte zwischen 46 und über 65% am Tag 14 beobachtet werden. Nach 21 Tagen war bei allen Linien der Anteil der positiven Zellen auf über 98 bis 100% angestiegen. Eine Selektion FLT3-WT exprimierender Ba/F3 und 32D-Zellen war nur durch die Zugabe des FLT3-Liganden möglich, was abermals zeigt, dass der nicht mutierte FLT3-Rezeptor promotogene Signalwege nur nach Stimulation mit seinem Liganden aktivieren kann. Die Expression der FLT3-Mutanten in 32D-Zellen erbrachte ähnliche Ergebnisse (diese Daten sind nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Isoleucin 839-Mutanten des FLT3-Rezeptors ebenso wie FLT3-ITD und FLT3 D838Y in der Lage sind, hämatopoetische Zelllinien zu transformieren und somit ihre Faktorabhängigkeit aufzuheben.

3.1.3.2 Faktorunabhängige Proliferation

Um die im vorherigen Kapitel veranschaulichte Transformation der faktorabhängigen Zelllinien zu quantifizieren, wurde die proliferative Aktivität der Zellen bestimmt wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben. Dazu wurden die FLT3 exprimierenden Ba/F3- und 32D-Zellen ohne Wachstumsfaktor inkubiert und die Proliferation für drei Tage alle 24 Stunden gemessen.

Zellen, welche mit FLT3-WT transfiziert waren, konnten nur unter Inkubation mit FLT3-Ligand (FL) proliferieren (Abb. 11; schwarze Linien). Im Gegensatz dazu wuchsen die FLT3 I839del- und FLT3 I839M+R-exprimierenden Linien faktorunabhängig (Abb. 11; violette und blaue Linie). Die proliferative Aktivität dieser Zellen ist vergleichbar mit der durch FLT3-ITD- und FLT3 D838Y-transformierter Ba/F3 Zellen (Abb. 11; rote und türkise Linie). Bei einer Serie von weiteren, unabhängigen Experimenten konnten keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumskurven zwischen lymphatischen und myeloiden Zellen festgestellt werden. Sowohl in Ba/F3- als auch in 32D-Zellen erwies sich die ITD-Mutante bezüglich der transformierenden Eigenschaften als stärkstes Onkogen.

Das Ergebnis bestätigt somit die Aussage, dass es sich sowohl bei I839del als auch I839M+R um biologisch relevante, transformierende Mutationen des FLT3-Rezeptors handelt.

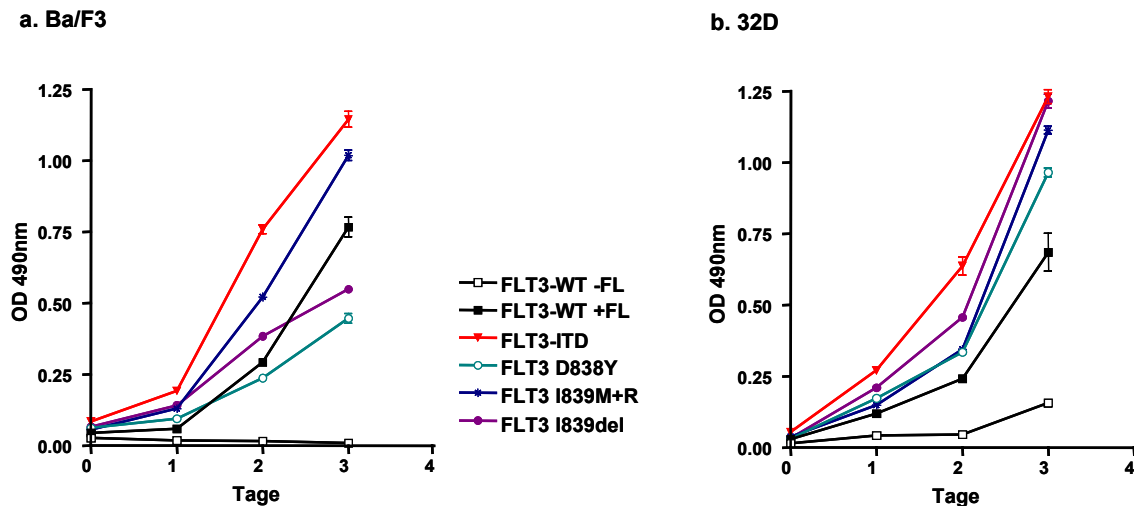


Abb. 11: FLT3-Mutanten induzieren in Ba/F3- und 32D-Zellen IL-3-unabhängige Proliferation

FLT3-WT und die angegebenen FLT3-Mutanten wurden in (a.) Ba/F3- und (b.) 32D-Zellen stabil exprimiert. Die durch FLT3-Mutanten transformierten Zellen wurden ohne Wachstumsfaktoren, FLT3-WT transfizierte Zellen entweder ohne (-FL) oder mit FLT3-Ligand (+FL) in 96-Loch-Platten kultiviert. Die proliferative Aktivität wurde über drei Tage hinweg alle 24 Stunden mittels der kolorimetrischen MTS-Methode (Kapitel 2.2.5.1) bestimmt. Die durch Absorptionsmessung bei 490 nm bestimmte Menge des MTS-Produkts ist direkt proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 3 Ansätzen.

3.1.4 Aktivierung von Signalwegen durch die FLT3 I839-Mutanten in Ba/F3-Zellen

Die Transformation faktorabhängiger Zelllinien zur Faktorunabhängigkeit kann durch verschiedene Signaltransduktionsvorgänge bedingt sein, deren Aktivierung promotogene und/oder antiapoptotische Effekte zur Folge hat. Es ist bekannt, dass FLT3-ITD konstitutiv Signalwege stimuliert, welche zur Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, der PI3K/AKT-Signalkaskade und des STAT5-Proteins führen (Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000). Mittels Western Blot wurde der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivierung dieser Signalmoleküle untersucht. Damit sollte ermittelt werden, ob die konstitutive Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors durch die I839-Mutationen zu einer Aktivierung dieser Signalwege führt. Den stabil FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen wurde 6 Stunden das Serum entzogen, um die Aktivierung der zu untersuchenden Signalwege durch im Serum enthaltene Faktoren zu minimieren. Die Ba/F3 FLT3-WT Zellen wurden für 10 Minuten mit dem FLT3-Liganden stimuliert (+FL) oder unbehandelt eingesetzt (-FL). Als Positivkontrolle für die Aktivierung der Signalkaskaden dienten IL-3 stimulierte, als Negativkontrolle nicht stimulierte Ba/F3-Parentalzellen. Zunächst wurde das FLT3-Protein aus den Lysaten immunpräzipitiert, um die konstitutive Phosphorylierung des Rezeptors zu überprüfen. Als Spezifitätskontrolle dienten die parentalen Ba/F3-Zellen. Die Darstellung der Präzipitate (Abb. 12a) mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (anti pY) bestätigte, dass alle mutierten FLT3-Rezeptoren in konstitutiv phosphoryliertem Zustand vorlagen, während der

Wildtyp-Rezeptor nur nach Stimulation mit seinem Liganden aktiv war. In Abb. 12b ist der Aktivierungsstatus der Proteine AKT, ERK1/2 und STAT5 durch Detektion der Lysate mit den jeweiligen phosphospezifischen Antikörpern dargestellt (oben). Als Beladungskontrolle ist jeweils der Gesamtproteingehalt der entsprechenden Proteine abgebildet (unten). Die Kinaseaktivität aller FLT3-Mutanten rief in Ba/F3-Zellen eine Phosphorylierung der untersuchten Proteine hervor. Die AKT-Phosphorylierung wurde von FLT3-ITD und FLT3 D838Y gleich stark induziert (Spur 5 und 6), während die AKT-Aktivierung durch FLT3 I839M+R (Spur 7) und FLT3 I839del (Spur 8) der schwachen physiologischen Aktivierung durch den stimulierten Wildtyp-Rezeptor (Spur 4) entspricht. Im Vergleich zu allen Punktmutanten (Spuren 6-8) war bei FLT3-ITD exprimierenden Zellen (Spur 5) eine stärkere Aktivierung von ERK1/2 und STAT5 zu beobachten. Wie bereits für die Phoenix E-Zellen gezeigt (Kapitel 3.1.2), führt eine Aktivierung des FLT3-WT Rezeptors mit dem FLT3-Liganden auch im Ba/F3-Zellmodell nicht zu einer Aktivierung von STAT5 (Spur 4).

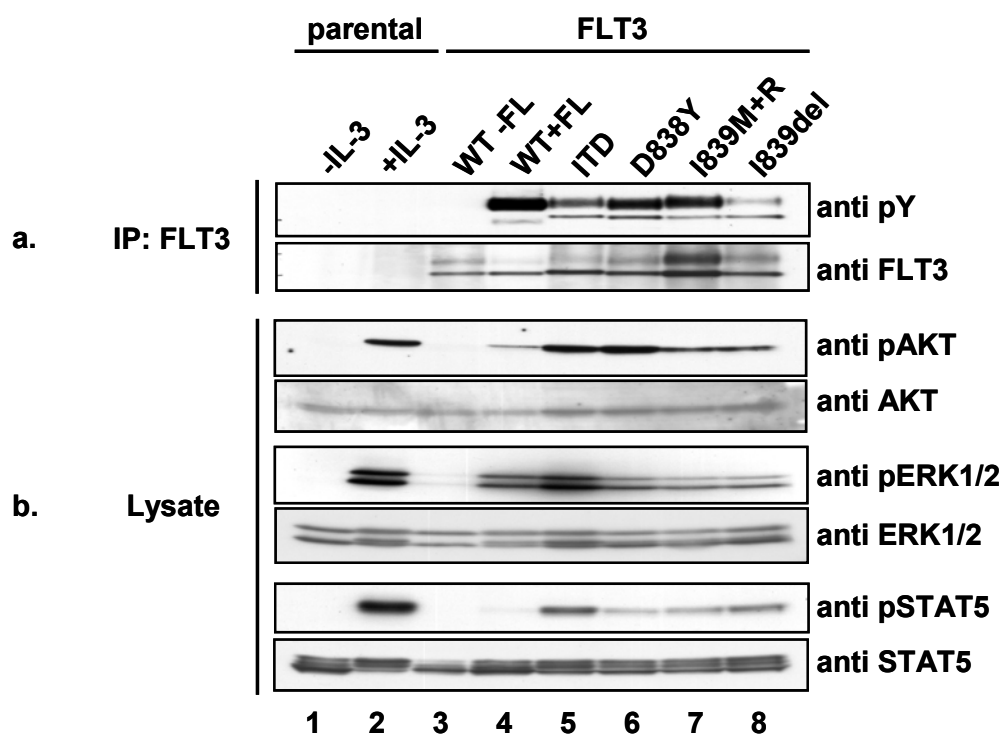


Abb. 12: Aktivierung verschiedener Signalwege durch FLT3-Mutanten in Ba/F3-Zellen

FLT3-WT und die angegebenen FLT3-Mutanten wurden stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert. Vor der Lyse der Zellen wurden die Zellen für 6 Stunden ohne Serum kultiviert. Die Ba/F3 FLT3-WT-exprimierenden Zellen wurden für 10 Minuten mit dem FLT3-Liganden stimuliert (+FL). Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten IL-3 stimulierte (+IL-3) bzw. unstimulierte (-IL-3) Ba/F3-Parentalzellen.

a.: Der FLT3-Rezeptor wurde aus den Zelllysaten immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch separiert. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem anti pY- Antikörper (oben) und einem anti FLT3-Antikörper auf der gleichen Membran nach Entfernen des ersten Antikörpers (unten).

b.: Darstellung der Gesamtzelllysate im Western-Blot nach gelelektrophoretischer Separation. Mit den phosphospezifischen Antikörpern gegen AKT, ERK1/2 und STAT5 (anti pAKT, anti pERK1/2 und anti pSTAT5) wurden aktiviertes AKT, ERK1/2 und STAT5 nachgewiesen (oben). Mit Antikörpern gegen AKT, ERK1/2 und STAT5 wurde nach Entfernen des Erstantikörpers die aufgetragene Gesamtproteinmenge kontrolliert (unten).

3.1.5 Variable Sensitivität verschiedener FLT3-Rezeptormutanten gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren

Der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren stellt eine Möglichkeit dar, das Zellwachstum durch Expression mutierter Tyrosinkinasen entarteter Zellen zu hemmen. Von einigen FLT3-Inhibitoren wurde bereits gezeigt, dass sie in der Lage sind, die faktorunabhängige Proliferation von FLT3-ITD exprimierenden Zellen zu unterbinden und in diesen Zellen Apoptose zu induzieren (Tse *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2002c; Weisberg *et al.*, 2002). Es ist von großer klinischer Relevanz die Sensitivität der verschiedenen FLT3-Rezeptormutanten gegenüber FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren zu bestimmen, um diese in klinischen Studien sinnvoll einsetzen zu können. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob das inhibitorische Potential von FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren durch die jeweilige Mutation im FLT3-Rezeptor beeinflusst wird. Für diese Untersuchungen wurden die Kinaseinhibitoren AG1296, PKC412 und SU5614 bei allen in den vorherigen Abschnitten beschriebenen FLT3-Mutanten eingesetzt. Die Bestimmung der Aktivität dieser Substanzen gegen die FLT3-vermittelte Transformation von Zellen erfolgte durch Untersuchungen der Proliferation, der Induktion von Apoptose und der Verringerung FLT3-vermittelter Phosphorylierung des STAT5-Proteins.

3.1.5.1 Sensitivität gegenüber AG1296

Bei AG1296 (Abb. 13) handelt es sich um einen klein-molekularen Kinaseinhibitor aus der Klasse der Tyrphostine vom Quinoxalin-Typ (Kovalenko *et al.*, 1994). Als ATP-kompetitive Substanz bindet AG1296 in der ATP-Bindungstasche der Kinase. Durch die höhere Affinität zur Kinase wird so die Anlagerung von ATP verhindert und die Kinase ist nicht mehr aktivierbar (Kovalenko *et al.*, 1997). Auf diese Weise kann ein konstitutiv aktivierter FLT3-Rezeptor durch AG1296 inhibiert werden (Tse *et al.*, 2001).

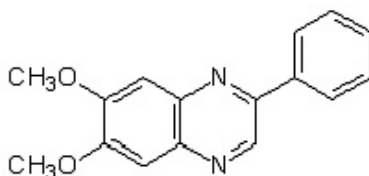


Abb. 13: Strukturformel von AG1296 (6,7-Dimethoxy-3-phenylquinoxalin)

Um unspezifische Toxizität auszuschliessen, wurde in Vorversuchen die von Ba/F3-Parentalzellen tolerierte Maximalkonzentration ermittelt. Die Abb. 14a verdeutlicht, dass AG1296 in Konzentrationen bis zu 10 μM keinen Einfluss auf die IL-3-vermittelte Proliferation parentaler Ba/F3-Zellen hat. Um die inhibierende Wirkung von AG1296 auf die durch die

FLT3-Mutanten vermittelte, faktorunabhängige Proliferation von Ba/F3-Zellen zu untersuchen, wurden die durch FLT3-ITD, FLT3 D838Y, FLT3 I839del oder FLT3 I839M+R transformierten Ba/F3-Zellen (Kapitel 3.1.3) mit ansteigenden Konzentrationen (0,5 – 10 μM) des Inhibitors kultiviert. Für die Bestimmung des Bezugswerts (100% aktive Zellen) wurden die jeweiligen Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die proliferative Aktivität der Zellen mit der kolorimetrischen MTS-Methode bestimmt (Kapitel 2.2.5.1). Die IC_{50} -Werte bezüglich der Proliferation entsprechen der halbmaximalen Inhibition der Proliferation, d.h. der Konzentration, welche die Proliferationsrate um 50% verringert.

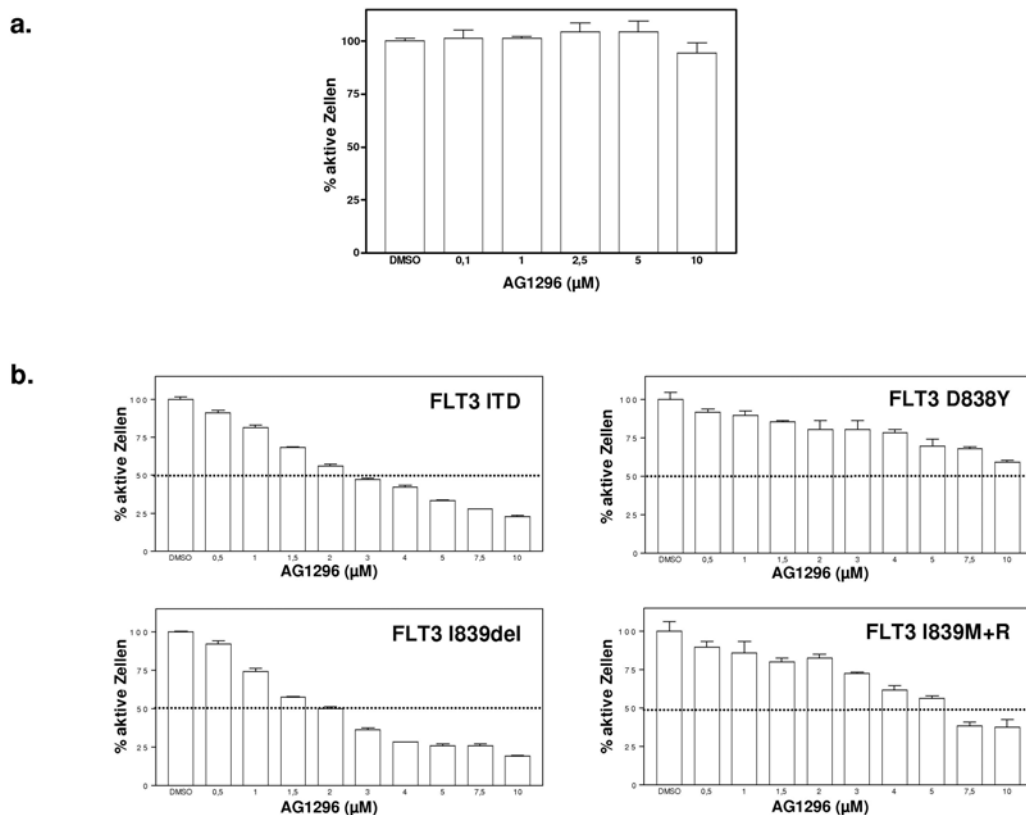


Abb. 14: Bestimmung der IC_{50} -Werte von AG1296

Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von AG1296 kultiviert. Nach 24 h wurde die proliferative Aktivität mittels der MTS-Methode gemessen. Das inhibitorische Potential von AG1296 ist in Korrelation zu DMSO-behandelten Kontrollzellen (100% aktive Zellen) dargestellt. Der Schnittpunkt der Balken mit der Punktlinie entspricht dem jeweiligen IC_{50} -Wert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 3 Ansätzen. IC_{50} : Inhibitorische Konzentration 50%

a.: Parentale Ba/F3-Zellen (+IL-3).

b.: Bestimmung der IC_{50} -Werte für Ba/F3 FLT3-ITD-, D838Y-, I839del- und I839M+R-Zellen.

Die Sensitivität gegenüber AG1296 variiert hierbei stark zwischen den untersuchten FLT3-Mutanten (Abb. 14b). Die IC_{50} -Werte für FLT3-ITD und FLT3 I839del liegen in einem Konzentrationsbereich zwischen 2 und 3 μM , während für eine 50%-ige Inhibition der

proliferativen Aktivität FLT3 I839M+R-exprimierender Zellen eine wesentlich höhere Konzentration benötigt wird ($IC_{50} \approx 6 \mu M$). Im Gegensatz dazu liegt der IC_{50} -Wert für FLT3 D838Y-transformierte Zellen bei über $10 \mu M$ ($IC_{50} > 10 \mu M$). Analoge Experimente mit 32D-Zellen ergaben ähnliche Ergebnisse. Durch Zugabe von IL-3 wurde der antiproliferative Effekt von AG1296 in allen Zelllinien vollständig aufgehoben, was darauf hinweist, dass dieser durch die spezifische Inhibition von FLT3 bedingt war (diese Daten sind nicht gezeigt).

Ba/F3-Zellen können, wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben, durch Färbung mit Annexin V-FITC/ PI und anschließender durchflusszytometrischer Messung in verschiedene Stadien der Apoptose eingeordnet werden. Zellen, die nur FITC-positiv sind, befinden sich in einem frühen Stadium des programmierten Zelltods, während sich doppelt positive Zellen im Endstadium der Apoptose befinden. Für beide Farbstoffe negative Zellen werden als viabel angesehen (siehe Abb. 5, Seite 44).

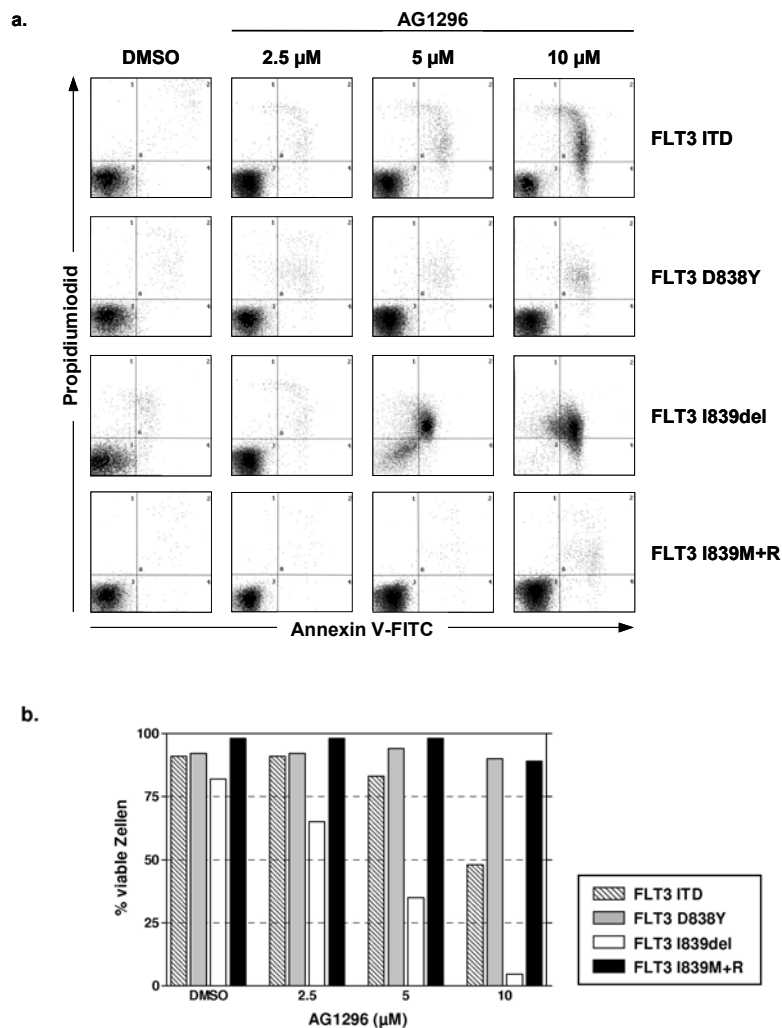


Abb. 15: Induktion von Apoptose durch AG1296

Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden für 72 h mit ansteigenden Konzentrationen von AG1296 (2,5; 5; $10 \mu M$) kultiviert. Nach Färbung mit Annexin V-FITC/ PI wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

a.: Darstellung der Punktwolkendiagramme. FITC: Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff).

b.: Darstellung des prozentualen Anteils Annexin V/ Propidiumiodid-negativer (viabler) Zellen.

Um die Unterschiede der Sensitivität gegenüber AG1296 näher zu analysieren, wurde die durch den Tyrosinkinaseinhibitor induzierte Apoptose durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 15). Alle Ba/F3 FLT3-Linien wurden vor der Färbung mit Annexin V-FITC/ PI für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors kultiviert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO kultiviert wurden.

Die FACS-Analyse zeigt eine massive Zunahme apoptotischer Zellen bei FLT3-ITD und FLT3 I839del-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit AG1296 (Abb. 15a). Die Quantifizierung der viablen Zellen (Abb. 15b) ergab für die FLT3-ITD bzw. FLT3 I839del exprimierenden Ba/F3-Zellen eine Verringerung des viablen Zellanteils ausgehend von 91 bzw. 82% nach Inkubation mit DMSO auf 48 bzw. 4,5% nach 10 μ molarer AG1296-Exposition. Im Gegensatz dazu, war die Vitalität der Ba/F3 FLT3 D838Y- und Ba/F3 FLT3 I839M+R-Zellen auch nach Inkubation mit 10 μ M AG1296 mit 90 bzw. 89% kaum beeinflusst. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Art der Mutation einen starken Einfluss auf die Inhibierbarkeit des FLT3-Rezeptors durch AG1296 hat.

Das folgende Experiment sollte zeigen, ob die beobachteten Unterschiede in der Hemmung des Zellwachstums und der Induktion von Apoptose durch das Tyrphostin auch mit dem Aktivierungsstatus des STAT5-Proteins korrelieren. Dafür wurden alle Linien für 4 Stunden mit 1 μ M AG1296, 10 μ M AG1296 oder mit DMSO als Negativkontrolle inkubiert. Auf gleiche Weise wurden parentale Ba/F3-Zellen unter Zusatz von IL-3 behandelt. Anschließend wurde durch Western Blot Analyse mit einem phosphospezifischen STAT5-Antikörper die Abnahme der STAT5-Phosphorylierung in den behandelten Zellen untersucht (Abb. 16 oben; anti p-STAT5). Als Beladungskontrolle ist der Gesamtgehalt an STAT5 abgebildet (Abb. 16 unten; anti STAT5).

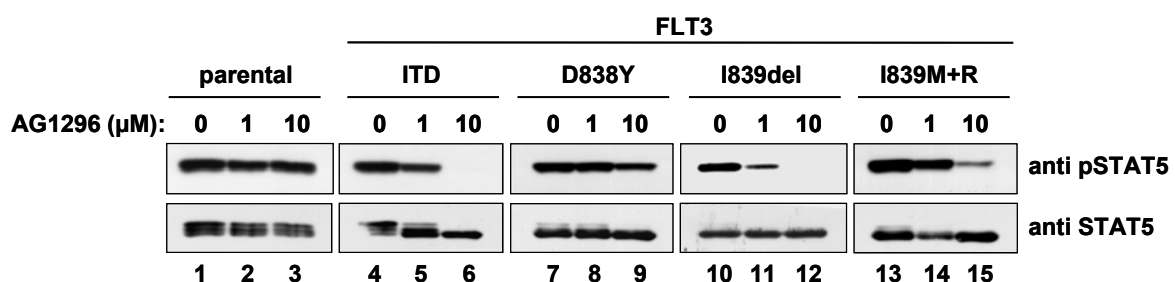


Abb. 16: AG1296 inhibiert FLT3-induzierte STAT5-Phosphorylierung

FLT3-ITD, D838Y-, I839del- oder I839M+R-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden 4 Stunden mit 1 oder 10 μ M AG1296 oder DMSO kultiviert. Parentale Ba/F3-Zellen wurden unter Zusatz von IL-3 ebenso behandelt. Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem phosphospezifischen STAT5-Antikörper (anti pSTAT5) (oben) und einem Antikörper gegen das STAT5-Protein (anti STAT5) auf der gleichen Membran nach Entfernen des ersten Antikörpers (unten).

Die durch FLT3-ITD und FLT3 I839del hervorgerufene STAT5-Aktivierung wurde durch 10 μ M AG1296 vollständig aufgehoben (Spur 6 und 12), während STAT5 in FLT3 I839M+R-transformierten Zellen nach der Behandlung mit 10 μ M AG1296 noch schwach phosphoryliert vorlag (Spur 15). Der Aktivierungsstatus von STAT5 in FLT3 D838Y-exprimierenden Zellen war durch Inkubation mit der gleichen Konzentration kaum beeinträchtigt (Spur 9). Die Phosphorylierung von STAT5 in parentalen Ba/F3-Zellen wurde durch AG1296 nicht beeinflusst (Spuren 1-3), was bestätigt, dass die Abnahme von pSTAT5 in FLT3-exprimierenden Zellen durch spezifische Inhibition des FLT3-Rezeptors hervorgerufen wurde.

Demnach gibt es eine direkte Korrelation zwischen Inhibition der Proliferation (Abb. 14), Induktion von Apoptose (Abb. 15) und Inhibition der STAT5-Phosphorylierung (Abb. 16) durch den Tyrosinkinaseinhibitor. Durch alle Ansätze wurde bestätigt, dass die Art der Mutation Einfluss auf die Sensitivität des FLT3-Rezeptors gegenüber AG1296 hat. Während die D838Y-Mutante von dem Inhibitor nicht in ihrer Aktivität beeinflusst werden kann und FLT3 I839M+R nur durch hohe Konzentrationen inhibiert wird, sind die ITD- und I839del-Mutanten des FLT3-Rezeptors sehr sensitiv gegenüber dem Tyrphostin.

3.1.5.2 Sensitivität gegenüber PKC412

Das Staurosporin-Derivat PKC412 (Abb. 17) wurde ursprünglich als Inhibitor der Proteinkinase C entwickelt (Meyer *et al.*, 1989). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Substanz auch zur Inhibition verschiedener Mitglieder der Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen (Fabbro *et al.*, 2000), einschließlich FLT3 (Weisberg *et al.*, 2002), eingesetzt werden kann.

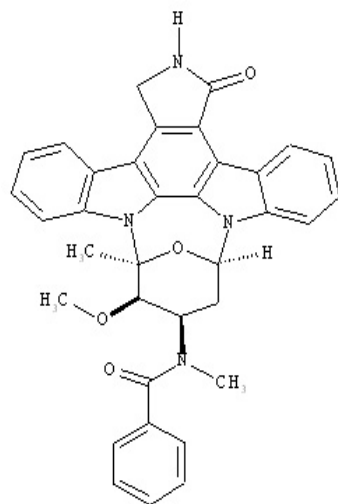


Abb. 17: Strukturformel von PKC412 (N-Benzoylstaurosporin)

Um zu untersuchen, ob die Art der Mutation des FLT3-Rezeptors auch auf die Sensitivität gegenüber PKC412 Einfluss hat, wurden die in Kapitel 3.1.5.1 beschriebenen Experimente auch mit diesem Inhibitor durchgeführt.

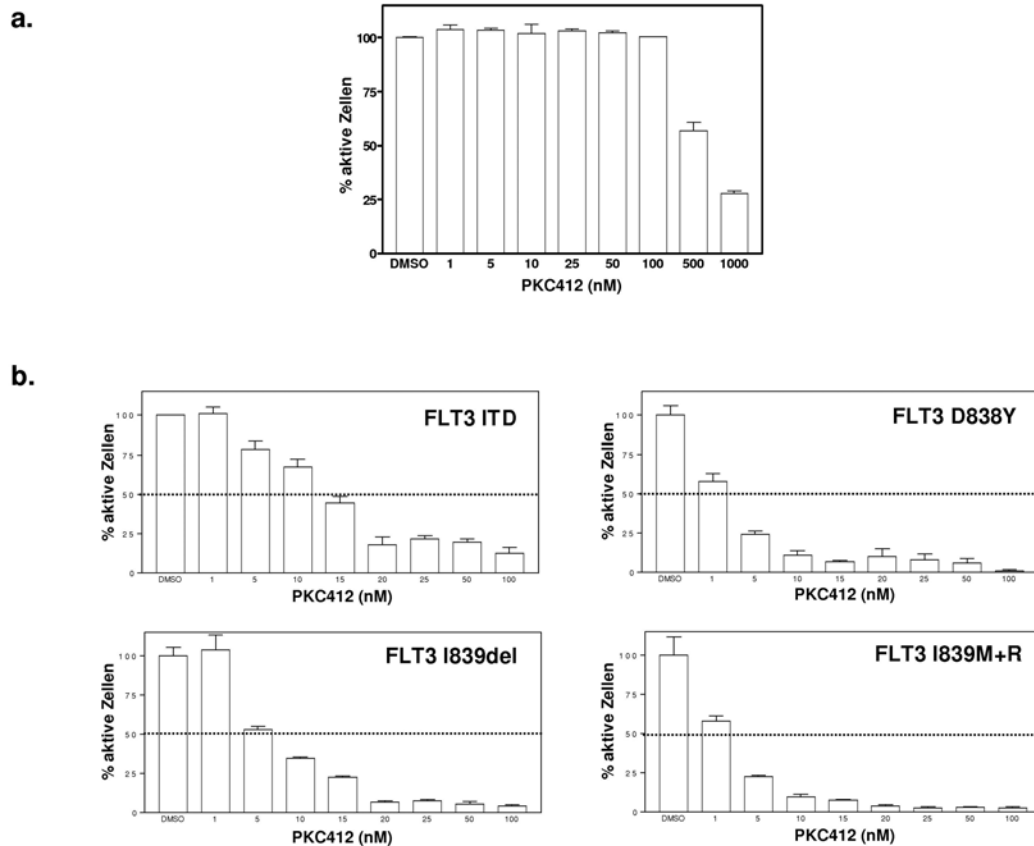


Abb. 18: Bestimmung der IC₅₀-Werte von PKC412

Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von PKC412 kultiviert. Nach 24 h wurde die proliferative Aktivität mittels der MTS-Methode gemessen. Das inhibitorische Potential von PKC412 ist in Korrelation zu DMSO-behandelten Kontrollzellen (100% aktive Zellen) dargestellt. Der Schnittpunkt der Balken mit der Punktlinie entspricht dem jeweiligen IC₅₀-Wert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 3 Ansätzen. IC₅₀: Inhibitorische Konzentration 50%

a.: Parentale Ba/F3-Zellen (+IL-3).

b.: Bestimmung der IC₅₀-Werte für Ba/F3 FLT3-ITD-, D838Y-, I839del- und I839M+R-Zellen.

Die Ermittlung der von parentalen Ba/F3-Zellen maximal tolerierten PKC412-Konzentration ergab einen Wert von 100 nM (Abb. 18a). Bei Einsatz höherer Konzentrationen kam es trotz Stimulation der Zellen mit IL-3 zu einer Verminderung der proliferativen Aktivität, was möglicherweise auf die Inhibition der Proteinkinase C zurückgeführt werden kann. Die durch FLT3-ITD, FLT3 D838Y, FLT3 I839del oder FLT3 I839M+R transformierten Ba/F3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen PKC412 inkubiert. Für die Bestimmung des Bezugswerts (100% aktive Zellen) wurden die jeweiligen Zellen statt mit PKC412 mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (DMSO) behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation

wurde die proliferative Aktivität der Zellen bestimmt. Der Vergleich der in Abb. 18b ermittelten IC_{50} -Werte macht deutlich, dass auch gegenüber PKC412 eine unterschiedliche Sensitivität der Mutanten vorhanden ist. Jedoch manifestiert sich diese hier in einem anderen Muster als bei AG1296. Während alle Zellen, die TKD-Mutanten (D838Y, I839del, I839M+R) exprimieren, für eine 50%-ige Inhibition der proliferativen Aktivität weniger als 6 nM PKC412 benötigen ($IC_{50} < 6$ nM), liegt der IC_{50} -Wert für FLT3-ITD mit 12 nM wesentlich höher. Die Behandlung FLT3-Mutanten exprimierender 32D-Zellen ergab ähnliche Ergebnisse. Durch Zugabe von IL-3 wurde der antiproliferative Effekt von PKC412 in allen Zelllinien vollständig aufgehoben, was darauf hinweist, dass dieser durch die spezifische Inhibition von FLT3 bedingt war (diese Daten sind nicht gezeigt).

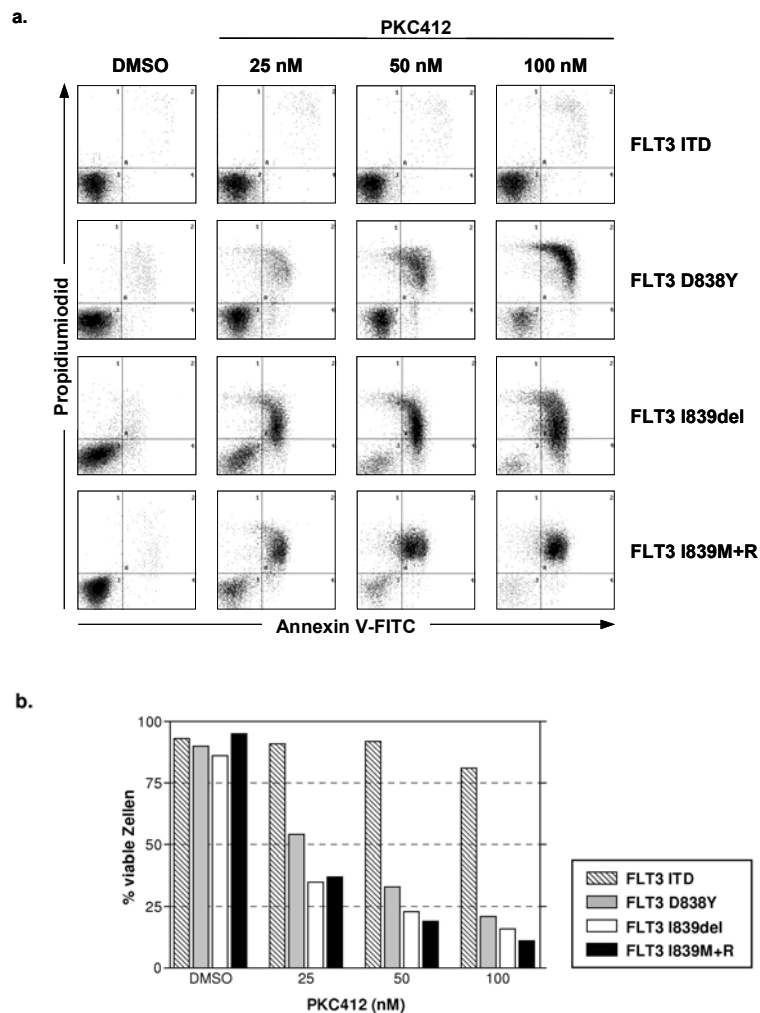


Abb. 19: Induktion von Apoptose durch PKC412

Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von PKC412 (25; 50; 100 nM) inkubiert. Nach Färbung mit Annexin V-FITC/ PI wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

a.: Darstellung der Punktwolkendiagramme. FITC: Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)

b.: Darstellung des prozentualen Anteils Annexin V/ Propidiumiodid-negativer (viabler) Zellen.

Die Apoptosemessung nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit PKC412 ergab das gleiche Muster wie die Untersuchung der Proliferation. Aus Abb. 19 ist ersichtlich, dass bei Ba/F3 FLT3-ITD-Zellen mit 100 nM PKC412 keine Apoptose induziert werden kann. Die Population viabler Zellen liegt nach 24 h bei über 80%. Im Gegensatz dazu, steigt die Apoptoserate nach 24-stündiger Inkubation mit PKC412 bei FLT3 TKD-Mutanten exprimierenden Zellen massiv an. Hier ist der Anteil viabler Zellen durch Inhibition der konstitutiven Aktivität von FLT3 auf unter 25% abgesunken.

Die Inhibition der STAT5-Phosphorylierung durch PKC412 ist in Abb. 20 dargestellt. Auch hier zeigt sich, in Korrelation zu den obigen Daten, ein wesentlich stärkeres Ansprechen der durch FLT3 TKD-Mutanten transformierten Zellen. Nach 4-stündiger Inkubation mit 25 nM PKC412 ist die FLT3-vermittelte STAT5-Phosphorylierung vollständig inhibiert (Spuren 9, 12 und 15). Die Sensitivität des FLT3-ITD Rezeptors gegenüber dem Staurosporin-Derivat ist zu gering, um die FLT3-induzierte STAT5-Aktivierung durch 25 nM PKC412 aufzuheben (Spur 6). Die Spezifität der Inhibition wurde durch Behandlung parentaler Ba/F3-Zellen belegt (Spuren 1, 2 und 3).

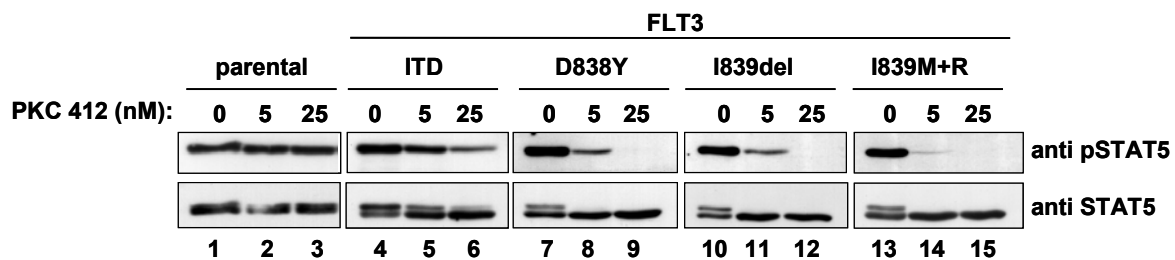


Abb. 20: PKC412 inhibiert die FLT3-induzierte STAT5-Phosphorylierung

FLT3-ITD, D838Y-, I839del- und I839M+R-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden 4 Stunden mit 5 oder 25 nM PKC412 oder DMSO inkubiert. Parentale Ba/F3-Zellen wurden unter Zusatz von IL-3 ebenso behandelt. Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem phosphospezifischen STAT5-Antikörper (anti pSTAT5) (oben) und einem Antikörper gegen das STAT5-Protein (anti STAT5) auf der gleichen Membran nach Entfernen des ersten Antikörpers (unten).

3.1.5.3 Sensitivität gegenüber SU5614

Das Indolinon SU5614 (Abb. 21) agiert, wie AG1296, als ATP-Kompetitor (Sun *et al.*, 1998). Es ist bekannt, dass SU5614 inhibitorisches Potential gegen FLT3 (Yee *et al.*, 2002; Spiekermann *et al.*, 2003b) und andere Rezeptortyrosinkinasen (Ma *et al.*, 2000; Spiekermann *et al.*, 2002b) hat. In Konzentrationen bis 10 μ M hat SU5614 keine toxische Wirkung auf parentale Ba/F3-Zellen (Abb. 22a).

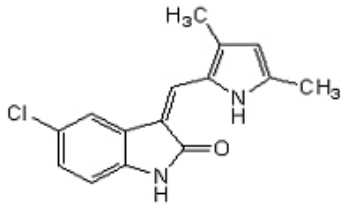
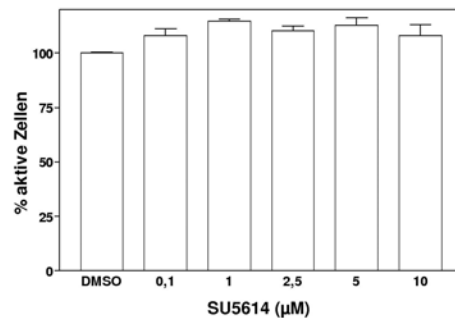


Abb. 21: Strukturformel von SU5614 (5-Chloro-3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylen]-2-indolinon)

Die IC_{50} -Werte von SU5614 bezüglich der Proliferation FLT3-transformierter Ba/F3-Zellen wurden analog zu den bereits beschriebenen Inhibitoren bestimmt. Die Proliferation aller Linien konnte mit SU5614 gehemmt werden. Doch auch hier zeigte sich erwartungsgemäß eine Divergenz in der Sensitivität gegenüber dem Inhibitor (Abb. 22b).

a.



b.

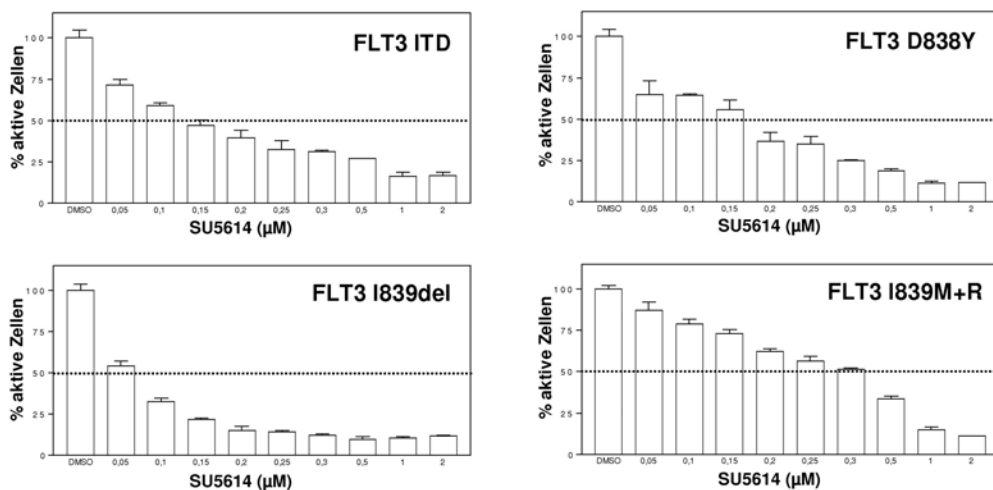


Abb. 22: Bestimmung der IC_{50} -Werte von SU5614

Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von SU5614 kultiviert. Nach 24 h wurde die proliferative Aktivität mittels der MTS-Methode gemessen. Das inhibitorische Potential von SU5614 ist in Korrelation zu DMSO-behandelten Kontrollzellen (100% aktive Zellen) dargestellt. Der Schnittpunkt der Balken mit der Punktlinie entspricht dem jeweiligen IC_{50} -Wert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 3 Ansätzen. IC_{50} : Inhibitorische Konzentration 50%

a.: Parentale Ba/F3-Zellen (+IL-3).

b.: Bestimmung der IC_{50} -Werte für Ba/F3 FLT3-ITD-, D838Y-, I839del- und I839M+R-Zellen.

Mit einem IC_{50} -Wert von ca. $0,3 \mu\text{M}$ ist die Empfindlichkeit gegen das Indolinon bei FLT3 I839M+R-exprimierenden Ba/F3-Zellen am geringsten, während sich FLT3 I839del-exprimierende Zellen mit einem IC_{50} -Wert von ca. $0,06 \mu\text{M}$ durch hohe Sensitivität auszeichnen. Die IC_{50} -Werte für FLT3-ITD und FLT3 D838Y liegen in einem Konzentrationsbereich um $0,15 \mu\text{M}$.

Die Behandlung FLT3-Mutanten exprimierender 32D-Zellen ergab ähnliche Ergebnisse. Durch Zugabe von IL-3 konnte der antiproliferative Effekt von SU5614 in allen Zelllinien vollständig aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass dieser durch die spezifische Inhibition von FLT3 bedingt war (diese Daten sind nicht gezeigt).

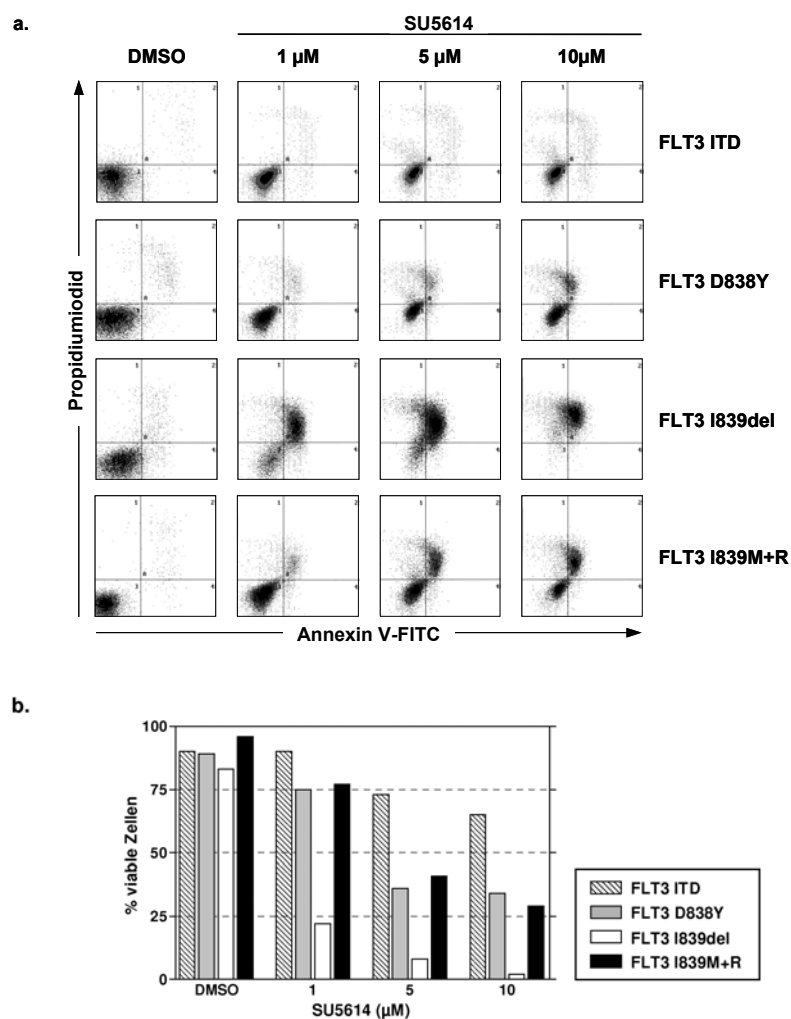


Abb. 23: Induktion von Apoptose durch SU5614

Die angegebenen Ba/F3-Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von SU5614 (1; 5; $10 \mu\text{M}$) inkubiert. Nach Färbung mit Annexin V-FITC/ PI wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

a.: Darstellung der Punktwolkendiagramme. FITC: Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff).

b.: Darstellung des prozentualen Anteils Annexin V/ Propidiumiodid-negativer (viabler) Zellen.

Bei SU5614 korrelierte die Induktion von Apoptose nur teilweise mit der Wachstumsinhibition. In FLT3-ITD-exprimierenden Zellen konnte durch 24-stündige Inkubation mit dem Indolinon nur in wesentlich geringerem Maß Apoptose induziert werden als in allen anderen Linien. Allerdings wird die hohe Empfindlichkeit der FLT3 I839del-transformierten Zellen gegenüber SU5614 durch dieses Experiment bestätigt (Abb. 23).

In Abb. 24 ist die durch SU5614 inhibierte Phosphorylierung des STAT5-Proteins demonstriert. Als sensitivste Mutante erwies sich hierbei, wie schon in den vorherigen Experimenten, die Deletionsmutante. In Zellen, die diese Mutante exprimieren, wurde die STAT5-Phosphorylierung durch Inkubation mit 100 nM SU5614 vollständig inhibiert (Spur 11), während bei Ba/F3 FLT3-ITD- und Ba/F3 FLT3 D838Y-Zellen die FLT3-vermittelte STAT5-Aktivierung erst bei 300 nM gänzlich aufgehoben war (Spuren 6 und 9). In FLT3 I839M+R transfizierten Zellen sind, war auch nach Inkubation mit 300 nM SU5614 noch ein geringes pSTAT5-Signal detektierbar (Spur 15).

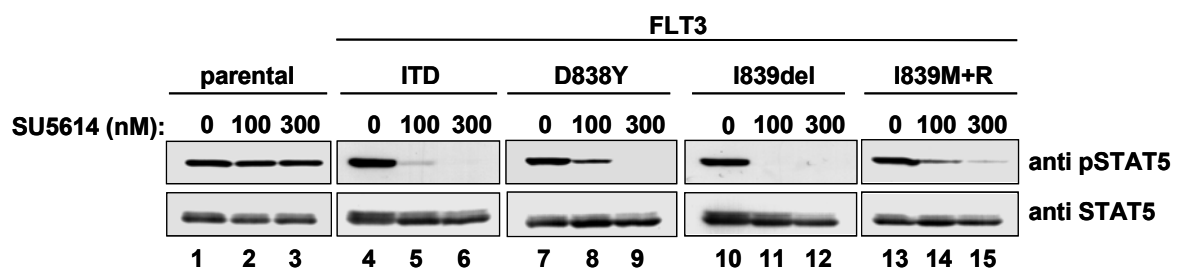


Abb. 24: SU5614 inhibiert die FLT3-induzierte STAT5-Phosphorylierung

FLT3-ITD, D838Y-, I839del- und I839M+R-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden 4 Stunden mit 100 oder 300 nM SU5614 oder DMSO inkubiert. Parentale Ba/F3-Zellen wurden unter Zusatz von IL-3 ebenso behandelt. Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem phosphospezifischen STAT5-Antikörper (anti pSTAT5) (oben) und einem Antikörper gegen das STAT5-Protein (anti STAT5) auf der gleichen Membran nach Entfernen des ersten Antikörpers (unten).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Empfindlichkeit verschiedener FLT3-Mutanten gegenüber allen untersuchten Inhibitoren von der Art der Mutation beeinflusst wird. Da laufend neue aktivierende Mutationen im FLT3-Rezeptor identifiziert werden, sollten diese Ergebnisse in zukünftigen klinischen Studien mit FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren bei der Auswahl der Einschlusskriterien berücksichtigt werden. Es wäre sinnvoll, die Mutation des FLT3-Rezeptors und dessen Sensitivität gegenüber dem jeweiligen Inhibitor vor Einschluss des Patienten in die jeweilige Studie exakt zu bestimmen.

3.2 Koexpression von FLT3-WT und FLT3-ITD

Wie bereits beschrieben ist die klinische Prognose für AML-Patienten mit einer ITD-Mutation des FLT3-Rezeptors signifikant schlechter als für Patienten, die diesen Defekt nicht tragen (Kiyoi *et al.*, 1999; Abu-Duhier *et al.*, 2000; Rombouts *et al.*, 2000; Kottaridis *et al.*, 2001; Meshinchi *et al.*, 2001; Schnittger *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002). Der zusätzliche Verlust des FLT3 Wildtyp-Allels, zum Beispiel durch einen Verlust eines Chromosoms 13, hat eine weitere Verschlechterung der Prognose zur Folge (Whitman *et al.*, 2001). Ein von Whitman *et al.* postuliertes Modell demonstriert, wie die schlechtere Prognose durch einen hemizygoten FLT3-ITD Genotyp ($FLT3^{ITD/-}$) verursacht werden könnte (Abb. 25).

In Zellen mit normalem FLT3-Genotyp erfolgt die Aktivierung von FLT3 ausschließlich durch Liganden-induzierte Dimerisierung. (Abb. 25a). Nach ITD-Mutation eines FLT3-Allels und Verlust des FLT3-WT-Allels bilden sich in der Zelle mit hoher Frequenz FLT3-ITD Homodimere, durch die es zu konstitutiver Aktivierung physiologischer und möglicherweise auch unphysiologischer Signalkaskaden kommt (Abb. 25b). Demnach hat diese Zelle gegenüber Zellen mit normalem Genotyp einen Proliferationsvorteil und bedingt damit die schlechte Prognose. Bleibt der Zelle jedoch trotz ITD-Mutation eines FLT3-Allels noch ein gesundes Allel erhalten, bilden sich neben Homodimeren beider Klassen auch Heterodimere zwischen ITD- und WT-Rezeptor, deren Aktivität nicht bekannt ist (Abb. 25c). Folglich ist diese Zelle noch teilweise durch den FLT3-Liganden reguliert und die zu konstitutiver Aktivierung führende FLT3-ITD Homodimerbildung findet nur noch mit geringerer Frequenz statt (Whitman *et al.*, 2001).

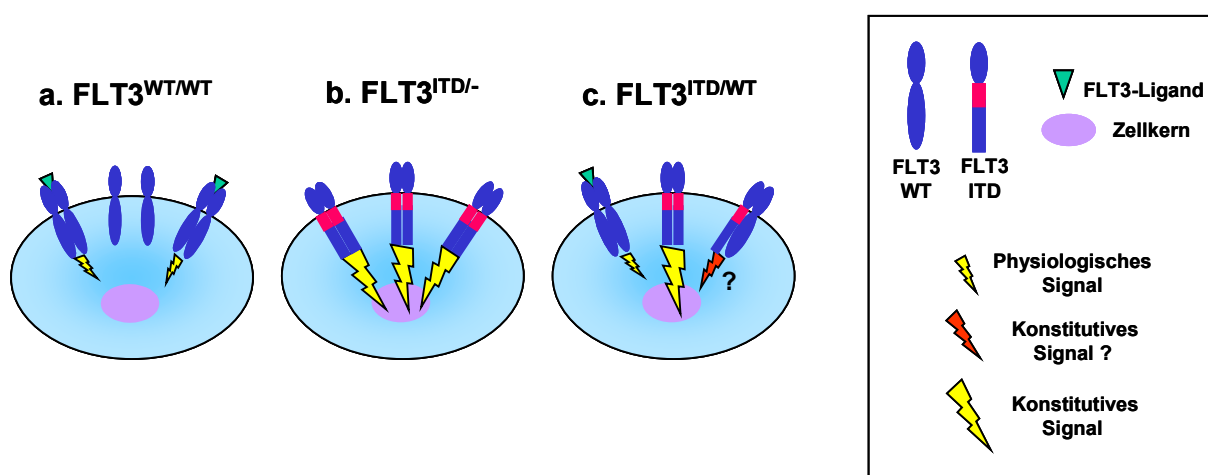


Abb. 25: Modell der Signaltransduktionsaktivität in Zellen mit unterschiedlichem FLT3-Genotyp (nach Whitman *et al.*, 2001)

a.: Zelle mit normalem FLT3-Genotyp ($FLT3^{WT/WT}$).

b.: Zelle mit hemizygotem FLT3-ITD Genotyp ($FLT3^{ITD/-}$).

c.: Zelle nach ITD-Mutation eines FLT3-Allels und erhaltenem FLT3-WT-Allel ($FLT3^{ITD/WT}$).

Mit Hilfe FLT3-WT/ITD-koexprimierender Zellen sollte diese Hypothese im Zellmodell überprüft werden. Zur Generierung dieser Zellen wurden Ba/F3- bzw. 32D-Zellen zunächst mit Mig FLT3-WT elektroporiert (Kapitel 2.2.3.5.2). Durch IL-3-Entzug und Zugabe des FLT3-Liganden konnten die erfolgreich transfizierten Zellen selektioniert werden (Abb. 26; 1.). Nach durchflusszytometrischer Bestimmung der Reinheit anhand der EGFP-Expression wurden die Zellen zusätzlich mit Zeo FLT3-ITD elektroporiert und durch Faktorentzug selektioniert (Abb. 26; 2.).

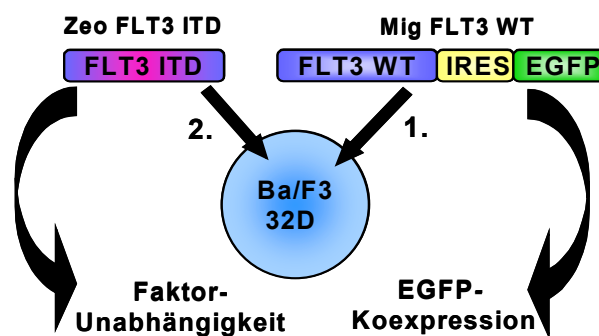


Abb. 26: Schematische Darstellung der Generierung FLT3-WT/ITD-koexprimierender Zellen.

Ba/F3- und 32D-Zellen wurden zunächst mit Mig FLT3-WT elektroporiert (1.). Nach Selektion der Zellen mit dem FLT3-Liganden und durchflusszytometrischer Bestimmung der Reinheit anhand der EGFP-Expression wurden die Zellen ein zweites Mal mit Zeo FLT3-ITD elektroporiert und durch Faktorentzug selektioniert (2.). Die Expression von FLT3-ITD wurde durch Faktor-unabhängiges Wachstum bestätigt.

Vor Einsatz der Zellen wurde die Koexpression von FLT3-WT und FLT3-ITD durch FACS-Analyse (Kapitel 2.2.3.7) und RT-PCR (Kapitel 2.2.1.11.2) bestätigt.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Koexpression wurde vorausgesetzt, dass alle faktorunabhängig proliferierenden Zellen FLT3-ITD exprimieren. In Abb. 27a ist die durchflusszytometrische Untersuchung der transformierten Zellen gezeigt. Das schwarze Histogramm stellt Zellen dar, welche ausschließlich FLT3-ITD exprimieren und somit nicht grün fluoreszieren. Die durch EGFP-Expression bedingte Rechtsverschiebung des Histogramms (grün dargestellt) weist die Koexpression von FLT3-WT in den FLT3-ITD transformierten Zellen nach. Diese Daten wurden zusätzlich durch Expressionsanalysen auf RNA-Ebene bestätigt. Mittels RT-PCR der für die juxtamembranäre Domäne kodierenden Sequenz wurde der mRNA-Status von FLT3 visualisiert (Abb. 27b). Die nur ein Konstrukt exprimierenden Zellen weisen jeweils eine Einzelbande auf. Durch den Einsatz entsprechend gestalteter Primer ist der durch den Einschub von 6 Basentriplets bedingte Größenunterschied von FLT3-ITD zum Wildtyp-Konstrukt erkennbar. Die Koexpression von FLT3-WT und ITD wird durch Anwesenheit beider Banden bestätigt. Die RT-PCR von GAPDH weist den Einsatz äquivalenter RNA-Konzentrationen nach.

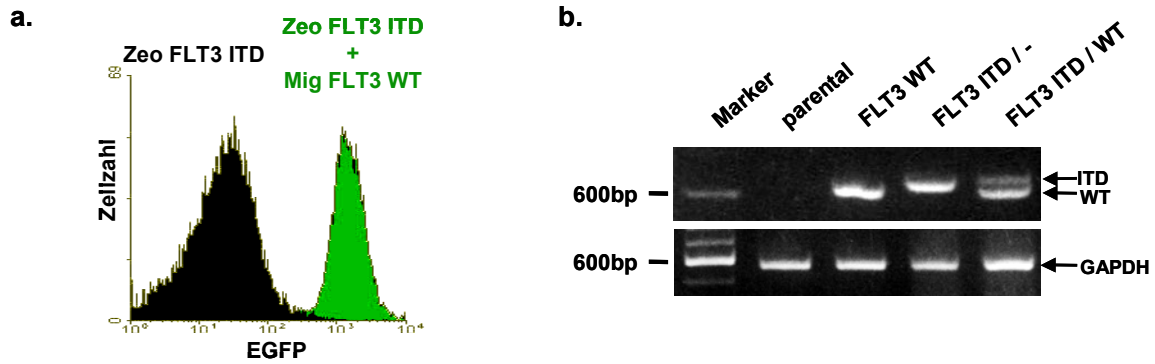


Abb. 27: Koexpression von FLT3-WT und FLT3-ITD

Die Koexpression von FLT3-WT und FLT3-ITD in Ba/F3- bzw. 32D-Zellen wurde in 2 Ansätzen überprüft:

a.: Die Zellen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Zellen, die faktorunabhängig wachsen, jedoch keine EGFP-Expression aufweisen (schwarzes Histogramm) exprimieren ausschließlich FLT3-ITD. Bei Koexpression von FLT3-WT in transformierten Zellen wird eine Rechtsverschiebung des Histogramms durch EGFP-Expression (grünes Histogramm) beobachtet.

b.: RT-PCR der juxtamembranen Domäne von FLT3. Nachweis der FLT3-Expression auf RNA-Ebene. Der Einsatz äquivalenter RNA-Konzentrationen wurde durch GAPDH bestätigt.

Diese Zellen wurden dann durch Untersuchung der proliferativen Aktivität charakterisiert (Abb. 28). Jede Zelllinie wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von FL kultiviert und das Wachstum der Zellen dokumentiert. Als Kontrolle der Aktivität des FLT3-Liganden dienten FLT3-WT-exprimierende Zellen (blaue Linien).

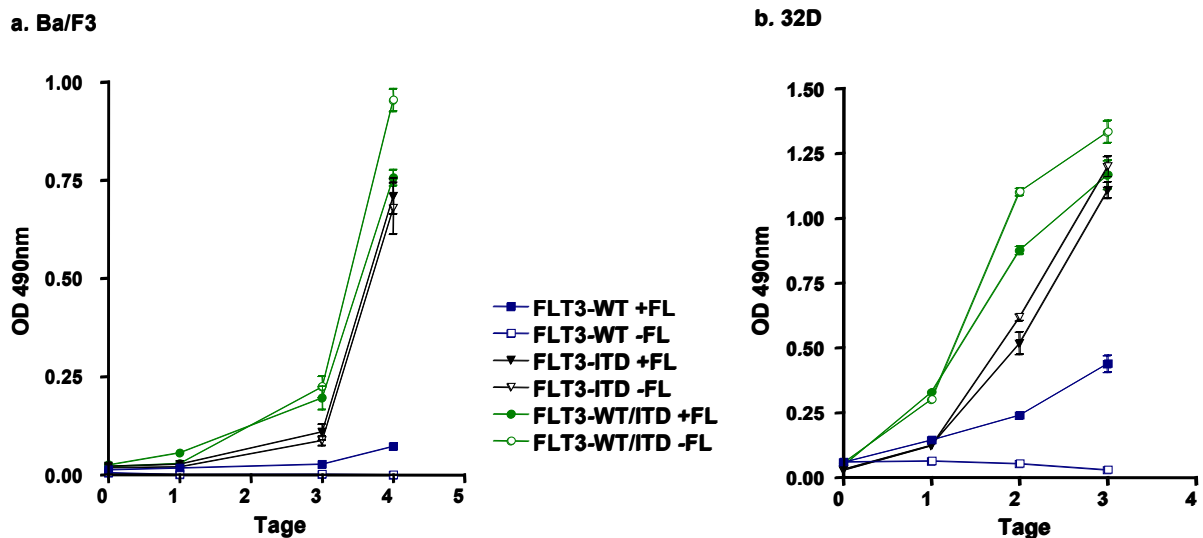


Abb. 28: Proliferationskurven FLT3-WT-, FLT3-ITD- oder FLT3-WT/ITD-exprimierender Zellen

FLT3-WT-, FLT3-ITD- oder FLT3-WT/ITD-exprimierende (a.) Ba/F3- und (b.) 32D-Zellen wurden ohne (-FL) oder mit FLT3-Ligand (+FL) in 96-Loch-Platten kultiviert. Die proliferative Aktivität wurde alle 24 Stunden mittels der kolorimetrischen MTS-Methode (Kapitel 2.2.5.1) bestimmt. Die durch Absorptionsmessung bei 490 nm bestimmte Menge des MTS-Produkts ist direkt proportional zur Anzahl der viablen Zellen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 3 Ansätzen.

Die Hypothese von Whitman *et al.* konnte weder im lymphatischen Ba/F3- (Abb. 28a) noch im myeloiden 32D-Zellmodell (Abb. 28b) bestätigt werden. Entgegen der Hypothese proliferieren Zellen, die FLT3-WT und FLT3-ITD koexprimieren (grüne Kurven) stärker als Zellen mit FLT3^{ITD/-}-Genotyp (schwarze Kurven). Die Anwesenheit des FLT3-Liganden beeinflusst die Proliferation der WT/ITD-Zellen negativ (grüne Kurve, gefülltes Symbol), während er in ITD-exprimierenden Zellen keine Veränderung des Wachstums auslöst (schwarze Kurven).

3.3 Charakterisierung verschiedener Mutanten des FLT3-Rezeptors im Mausmodell

Während FLT3-ITD als negativer prognostischer Faktor für den Verlauf einer akut myeloischen Leukämie gilt (Kiyoi *et al.*, 1999; Abu-Duhier *et al.*, 2000; Rombouts *et al.*, 2000; Kottaridis *et al.*, 2001; Meshinchi *et al.*, 2001; Schnittger *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002), scheinen Tyrosinkinasedomäne-Mutationen im FLT3-Rezeptor keinen Einfluss auf die Prognose von AML-Patienten zu haben (Frohling *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003; Thiede *et al.*, 2003). Andererseits werden im Gegensatz zu dem in lymphatischen Leukämien selten detektierten FLT3-ITD (Nakao *et al.*, 1996; Yokota *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Brown und Small, 2004), FLT3 TKD-Mutanten auch bei Kindern mit MLL, einer Form der akut lymphatischen Leukämie (ALL), und bei Patienten mit T-Zell-Leukämie nachgewiesen (Armstrong *et al.*, 2004; Paietta *et al.*, 2004; Taketani *et al.*, 2004). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Art der Mutation des FLT3-Rezeptors möglicherweise Einfluss auf die Entstehung der jeweiligen Neoplasie hat.

Im Folgenden werden diese potenziell unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen FLT3-Mutanten im Hinblick auf die Induktion verschiedener Phänotypen in einem murinen Knochenmarktransplantationsmodell untersucht.

3.3.1 Das murine Knochenmarktransplantationsmodell

Das murine Knochenmarktransplantationsmodell ermöglicht eine Untersuchung potenzieller Onkogene *in vivo*. Durch Transplantation myeloablativ bestrahlter Mäuse mit retroviral transduzierten Knochenmarkzellen, kann der Einfluss des transduzierten Gens auf die Hämatopoese untersucht werden.

Der in Abb. 29 schematisch dargestellte Ablauf des retroviralen Transduktions- und Transplantationsmodells ist in mehrere Schritte aufgliedert. Die Generierung retroviraler Partikel, welche die genetische Information für die mutierten FLT3-Rezeptoren tragen, erfolgt durch Transfektion der Virusproduktionszelllinie Phoenix E mit den Mig FLT3-Konstrukten. Neben der bereits in Kapitel 3.1.3.1 beschriebenen Funktion als bicistronischer Vektor, kodiert MigRI auch für die retroviralen LTR-Sequenzen und das die Bildung von Retroviren initiiierende Verpackungssignal. Die Effizienz der Transfektion der Phoenix E-Zellen wird durch durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression überprüft (Kapitel 2.2.3.7). Bevor die retroviralen Überstände zur Transduktion von murinem Knochenmark verwendet werden können, wird durch Titration die Anzahl der infektiösen, retroviralen Partikel ermittelt (Kapitel 2.2.3.8).

Parallel hierzu werden die zu transduzierenden Knochenmarkszellen aus 5-Fluorouracil (5-FU) vorbehandelten Spendermäusen gewonnen (Kapitel 2.2.6.1) und 24 Stunden in Prästimulationsmedium kultiviert, um die proliferative Aktivität der hämatopoetischen Stammzellen und somit auch ihre Transduzierbarkeit durch retrovirale Partikel zu erhöhen. Die Transduktion der murinen Knochenmarkszellen erfolgt nach dem in Kapitel 2.2.6.3 beschriebenen Protokoll. Nach erfolgter Infektion wird der Anteil EGFP-exprimierender KM-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (2.2.3.7). Die Empfängermause werden mit einer genau definierten Anzahl transduzierter Zellen transplantiert (Kapitel 2.2.6.4). Durch die vor der Transplantation erfolgte myeloablative Bestrahlung (800 rad) ist gewährleistet, dass die Hämatopoese der Empfängermause nach der Transplantation ausschließlich von den Spenderzellen ausgeht.

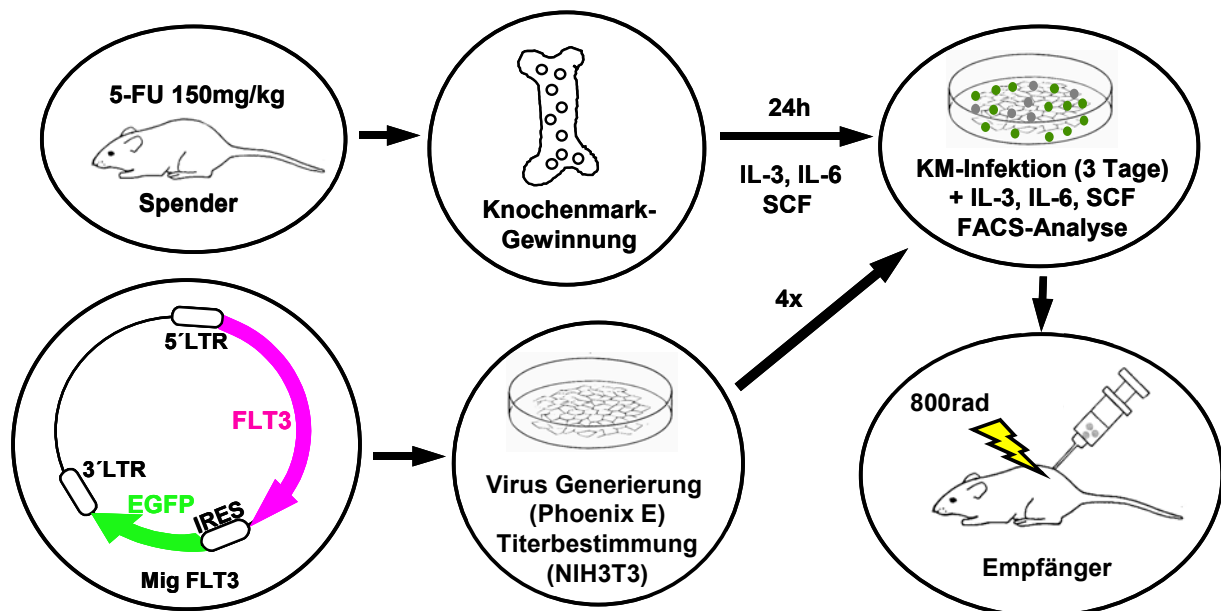


Abb. 29: Schematische Darstellung des murinen Knochenmarkstransplantationsmodells

3.3.2 Retroviraler Gentransfer

Das beschriebene Schema wurde mit FLT3-ITD, FLT3 D838Y und FLT3 I839M+R mehrfach ausgeführt. Repräsentativ ist an dieser Stelle die Generierung und Titration eines FLT3-ITD tragenden Retrovirus und der retrovirale Transfer von FLT3-ITD in murines Knochenmark dargestellt (Abb. 30).

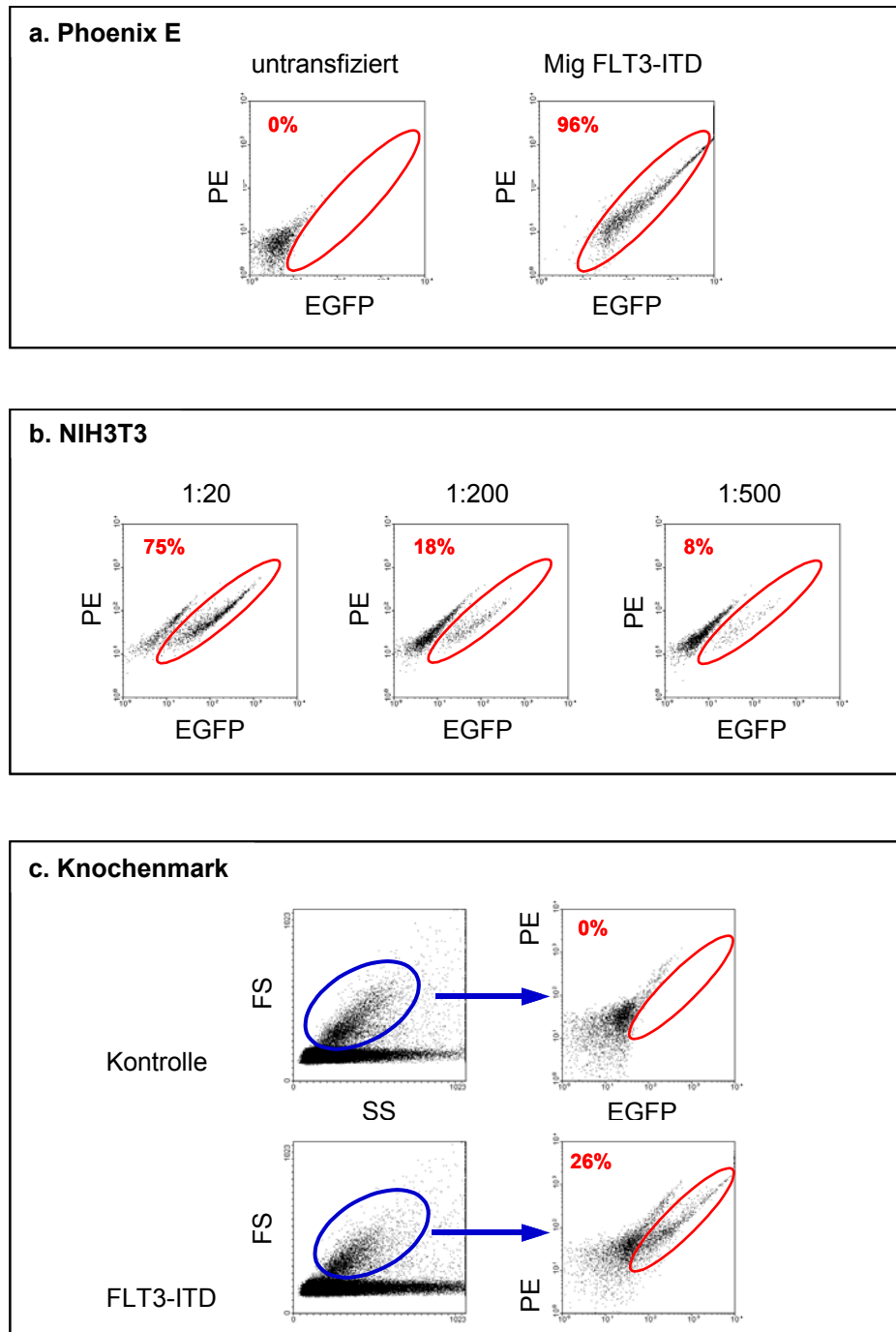


Abb. 30: Generierung und Titration eines FLT3-ITD tragenden Retrovirus und retroviraler Transfer von FLT3-ITD in murines Knochenmark

Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression. Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil FLT3-ITD (EGFP)-positiver Zellen (rote Ellipse).

a.: Transfektionseffizienz der Virusproduktionszelllinie Phoenix E. Nicht transfizierte Zellen erscheinen außerhalb der roten Markierung (links). Die Koexpression von EGFP in erfolgreich mit Mig FLT3-ITD-transfizierten Zellen ruft eine Rechtsverschiebung der Zellen hervor (rechts).

b.: Titerbestimmung durch Transduktion von NIH3T3-Zellen in einer Verdünnungsreihe. Retroviraler Überstand wurde in Verdünnungen von 1:20, 1:200 und 1:500 verwendet, um NIH3T3-Zellen zu infizieren. Die Berechnung der Anzahl retroviraler Partikel pro ml (Kapitel 2.2.3.8) ergab einen Wert von $7,5 \times 10^5$.

c.: Analyse der Effizienz der Knochenmarkstransduktion mit FLT3-ITD (rechts). Ausschluss von Erythrozyten und Zellteilen aus der EGFP-Analyse (links). Nur die blau markierten Zellen gehen in die EGFP-Analyse ein. FS: Forward Scatter, Größe der Zellen; SS: Sideward Scatter, Granularität der Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression mit Mig FLT3-ITD transfizierten Phoenix E-Zellen zeigt eine Transfektionseffizienz von 96% (Abb. 30a). Der hieraus gewonnene retrovirale Überstand wurde dann mittels Infektion von NIH3T3-Zellen in einer Verdünnungsreihe (1:20; 1:200; 1:500) titriert. Die Berechnung des Titers anhand der Infektionseffizienz der NIH3T3-Zellen (Abb. 30b) ergab einen Wert von $7,5 \times 10^5$ retroviralen Partikeln pro ml. Die Ermittlung des Virustiters ermöglicht es, bei der Transduktion das Verhältnis von Knochenmarkzellen zu retroviralem Überstand abzuschätzen. Je höher der Titer ist, desto weniger retroviraler Überstand muss eingesetzt werden, um eine äquivalente Infektion des Knochenmarks zu erzielen. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass Überstände, deren Titer den Wert von 1×10^5 unterschreiten, nicht zur Transduktion von Knochenmark geeignet sind. Der retrovirale Überstand wurde dann zur Transduktion muriner Knochenmarkzellen eingesetzt. Um die Infektionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmen zu können, wurden zunächst die Erythrozyten und Zelltrümmer ausgeschlossen. Dazu wurden die in der linearen Darstellung von Größe („Forward scatter“; FS) und Granularität („Sideward scatter“; SS) größer und weniger granuliert abgebildeten Zellen (Abb. 30c, blaue Ellipse) markiert. Nur die so ausgewählten mononukleären Zellen gingen in die Analyse der EGFP-Expression ein. Der rechte Teil der Abb. 30c zeigt die Effizienz der Knochenmarktransduktion mit FLT3-ITD. 26% der Stamm- bzw. Progenitorzellen sind EGFP-positiv und exprimieren somit auch FLT3-ITD. Mit Hilfe dieses Wertes ist es möglich, eine kontrollierte Anzahl transduzierter Zellen zu transplantieren.

3.3.3 Die FLT3-Expression korreliert mit der Transduktionseffizienz

Die vergleichende Untersuchung der transformierenden Eigenschaften unterschiedlicher FLT3-Mutanten *in vivo* erfordert eine vergleichbare Proteinexpression dieser Mutanten in den Knochenmarkzellen. Um die Korrelation der Transfektionseffizienz mit der Proteinexpression nachzuweisen, wurde Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen mit für FLT3-ITD-, FLT3 D838Y- oder FLT3 I839M+R-kodierenden Retroviren infiziert (Kapitel 2.2.6.3). Die Titer der verwendeten Überstände wurden vor Infektion durch entsprechendes Verdünnen auf den niedrigsten Wert ($4,5 \times 10^5$ CFU/ml) angeglichen. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen in FLT3-ITD transduziertem Knochenmark beträgt 20,5%. Bei der Transduktion mit FLT3 D838Y und FLT3 I839M+R liegt die Effizienz bei 20,8% bzw. 22,3% (Abb. 31a).

Da die Transduktionseffizienz aller FLT3-Mutanten im Knochenmark vergleichbar war, war es möglich für alle Mutanten das Gesamtknochenmark auf die FLT3-Proteinexpression hin zu untersuchen. Die immunchemische Darstellung im Western-Blot mit einem Antikörper gegen FLT3 bestätigt, dass eine vergleichbare Transduktionseffizienz in einer äquivalenten FLT3-Protein-Expression resultiert (Abb. 31b). Das geringfügig schwächere Signal bei

FLT3 I839M+R ist durch die geringere Beladung dieser Spur mit Gesamtprotein bedingt, was durch die Darstellung von β -Aktin als Ladungskontrolle bestätigt wird. Um nachzuprüfen, ob die Kinaseaktivität der FLT3-Mutanten auch im Knochenmark zu einer konstitutiven Aktivierung verschiedener Signalwege führt, wurde der Aktivierungsstatus von AKT, ERK1/2 und STAT5 bestimmt. Wie in Abb. 31b dargestellt, sind alle untersuchten FLT3-Mutanten in der Lage, auch in primären hämatopoetischen Zellen diese Signalkaskaden zu aktivieren. Die schwache Phosphorylierung der Proteine in mit Leervektor transduzierten Knochenmarkzellen (linke Spur; \emptyset), resultiert aus der Aktivierung verschiedener Rezeptoren durch die während der Infektionsprozedur eingesetzten Zytokine.

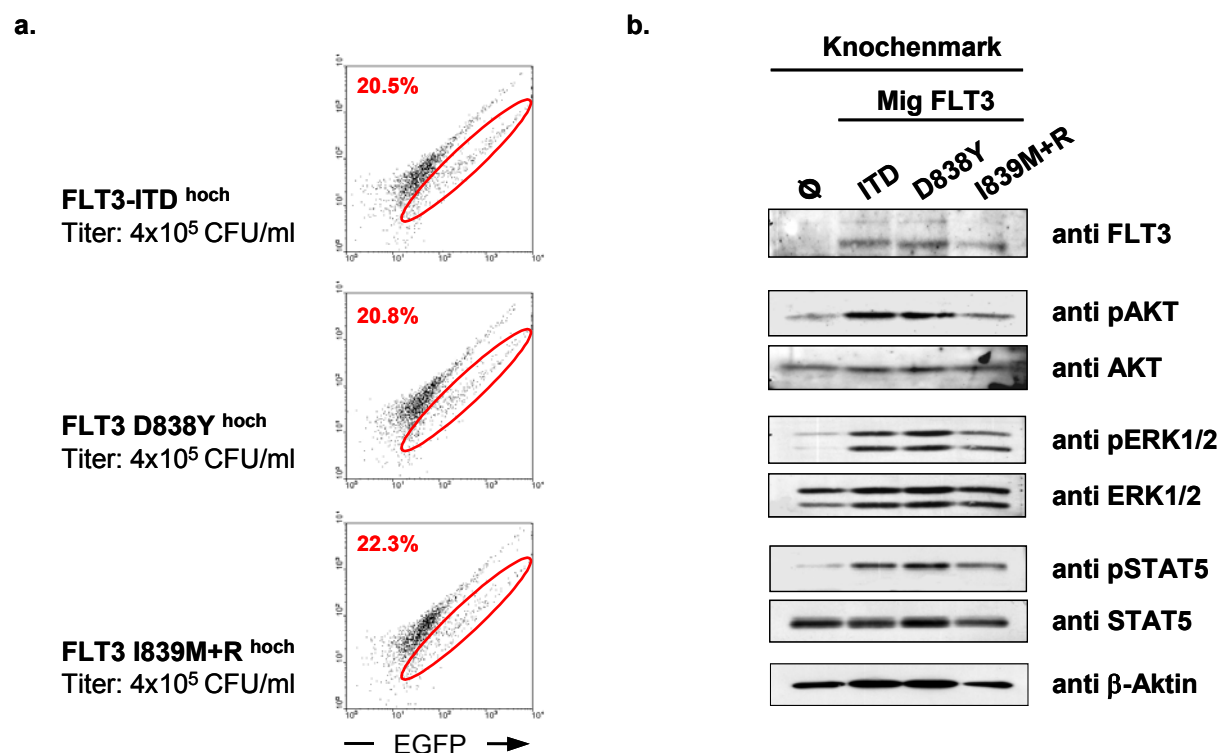


Abb. 31: Die FLT3-Expression korreliert mit der Transduktionseffizienz in murinen Knochenmarkzellen

Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde mit den angegebenen Konstrukten transduziert.

a.: Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression retroviral transduzierter Knochenmarkzellen.

b.: Aus den in (a) analysierten Zellen wurden Lysate hergestellt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot nach gelelektrophoretischer Separation. Die Expression von FLT3 wurde mit einem anti FLT3-Antikörper nachgewiesen. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen β -Aktin. Mit den phosphospezifischen Antikörpern gegen AKT, ERK1/2 und STAT5 (anti pAKT, anti pERK1/2 und anti pSTAT5) wurde der Aktivierungsstatus der Proteine nachgewiesen (oben). Mit Antikörpern gegen AKT, ERK1/2 und STAT5 wurde nach Entfernen des Erstantikörpers die aufgetragene Gesamtproteinmenge kontrolliert (unten).

3.3.4 Übersicht der FLT3-ITD Transplantationsexperimente

Zusätzlich zu dem bereits untersuchten FLT3-ITD-Konstrukt (Kapitel 3.3.3), welches im Folgenden als hoch exprimierendes FLT3-ITD (FLT3-ITD^{hoch}) bezeichnet wird, wurde für das Knochenmarktransplantationsmodell ein weiteres ITD-Konstrukt mit geringerer Proteinexpression (FLT3-ITD^{niedrig}) eingesetzt. Die stärkere Proteinexpression von FLT3-ITD^{hoch} ist durch die Deletion der 5'-untranslatierten Region der FLT3-cDNA bedingt. Da wegen der geringeren Expression von FLT3-ITD^{niedrig} das FLT3-Protein im Knochenmark nach Transduktion nicht nachweisbar war, wurden die Expressionsstärken der beiden FLT3-ITD exprimierenden Konstrukte nach Überexpression in Phoenix E-Zellen verglichen (Abb. 32).

Für die Knochenmarktransplantationsexperimente mit FLT3 TKD-Mutanten wurden ausschließlich die in Kapitel 3.3.3 untersuchten, hoch exprimierenden Konstrukte verwendet.

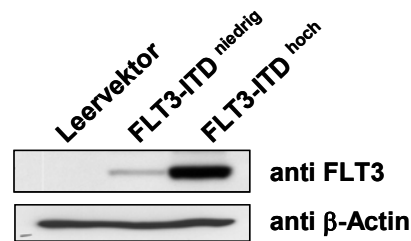


Abb. 32: Vergleich der Proteinexpression der FLT3-ITD-Konstrukte

Die angegebenen FLT3-Konstrukte und der Leervektor wurden transient in Phoenix E-Zellen überexprimiert und daraus Zellysate gewonnen. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem anti FLT3-Antikörper und einem anti β -Aktin-Antikörper als Ladungskontrolle.

Um den Einfluss der Anzahl transplanteder FLT3-ITD exprimierender Zellen auf die Entstehung einer hämatologischen Erkrankung zu untersuchen, wurden in 4 voneinander unabhängigen Experimenten variierende Mengen EGFP-positiver Zellen transplantiert. Da zusätzlich der Einfluss der Expressionsstärke des FLT3-Proteins untersucht werden sollte, fanden je 2 Transplantationen mit dem niedrig bzw. dem hoch exprimierenden Konstrukt statt. Dazu wurde Knochenmark von 5-FU vorbehandelten Mäusen mit für FLT3-ITD^{niedrig} bzw. FLT3-ITD^{hoch} kodierenden Retrovirus unterschiedlicher Titer infiziert. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt und die Gesamtzellzahl durch Messung der mononukleären Zellen bestimmt (Kapitel 2.2.6.5). Anschließend wurden myeloablativ bestrahlte Mäuse mit jeweils 110.000 oder 25.000 EGFP-positiven mononukleären Zellen (FLT3-ITD^{niedrig}) bzw. 146.000 oder 104.000 EGFP-positiven mononukleären Zellen (FLT3-ITD^{hoch}) transplantiert (Tabelle 1, Spalte 2). Als Kontrolle dienten Mäuse, die mit FLT3-WT transduziertem Knochenmark transplantiert wurden.

Tabelle 1: Auflistung der FLT3-ITD Transplantationsexperimente

FLT3-Konstrukt	Anzahl transplantierte EGFP+ Knochenmarkzellen	Überleben Tage [Median]	Anzahl der Leukozyten im PB $\times 10^3/\mu\text{l}$ [Median]	Milzgewicht mg [Median]	Phänotyp	Infiltrierte Organe
WT n=4	95.000	> 365 n=4	4,9 - 17,6 [12,4] n=4	60-100 [80] n=2	/ n=4	/
ITD niedrig n=4	110.000	53 - 70 [58] n=4	97,2 - 188 [141] n=4	510-690 [580] n=3	myeloproliferativ n=4	Milz Knochenmark peripheres Blut
ITD hoch n=3	146.000	14 - 16 [15] n=3	9,5 - 38,8 [28,4] n=3	290 - 360 [300] n=3	myeloproliferativ n=3	Milz Knochenmark peripheres Blut
ITD hoch n=3	104.000	19-20 [20] n=3	17,2 - 22,4 [19,1] n=3	n.a.	myeloproliferativ n=3	Milz Knochenmark peripheres Blut
ITD niedrig n=3	25.500	> 365 n=3	4,2 - 11,8 [7,8] n=3	n.a.	/	/

EGFP: grün fluoreszierendes Protein (*Enhanced Green Fluorescent Protein*); n: Anzahl der untersuchten Tiere; n.a.: nicht analysiert; PB: peripheres Blut.

3.3.5 FLT3-ITD induziert eine myeloproliferative Erkrankung im Mausmodell

Bei allen Tieren (n=4), die mit FLT3-WT transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, war eine normale hämatologische Rekonstitution und ein Überleben von mindestens 365 Tagen ohne Anzeichen einer hämatologischen Erkrankung zu beobachten.

Im Gegensatz dazu entwickelten alle Mäuse (n=4), welche mit 110.000 EGFP-positiven Zellen (FLT3-ITD^{niedrig}) transplantiert wurden, eine letale hämatologische Erkrankung mit einer medianen Latenzzeit von 58 Tagen (Tabelle 1, Spalte 3; Abb. 36, Seite 82). Wie bereits in der Literatur beschrieben (Kelly *et al.*, 2002b), verstarben die Mäuse an einer myeloproliferativen Erkrankung. Diese war sowohl durch eine massive Leukozytose und Splenomegalie, als auch durch erhebliche Expansion myeloischer Zellen in Milz, Knochenmark und peripherem Blut gekennzeichnet.

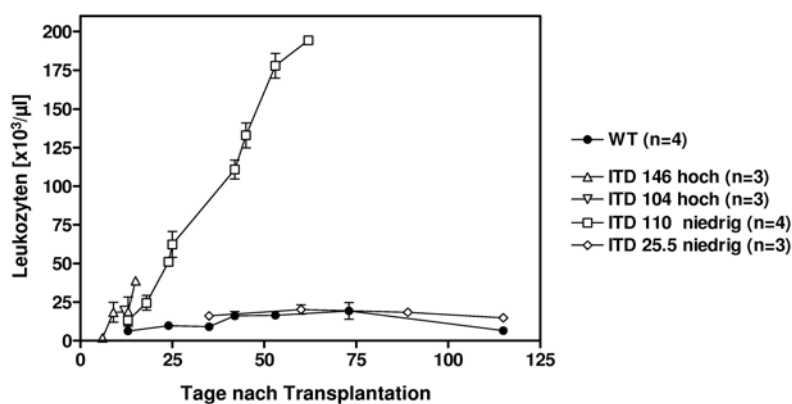


Abb. 33: Verlauf der Leukozytenwerte im peripheren Blut nach Transplantation

Knochenmark wurde mit den angegebenen Konstrukten transduziert. Letal bestrahlte Mäuse wurden mit der angegebenen Anzahl an Zellen transplantiert (angegebener Wert $\times 10^3$ entspricht der Anzahl transplantierte EGFP-positiver Zellen). Die Leukozytenanzahl im peripheren Blut wurde in regelmässigen Abständen durch Messung im Blutbildgerät (Kapitel 2.2.6.5) bestimmt.

Durch regelmäßige Kontrolle des Blutbilds der Mäuse wurde als erstes Anzeichen einer myeloproliferativen Erkrankung eine Leukozytose mit Maximalwerten von $97,2 \times 10^3$ - 188×10^3 Leukozyten pro μl im peripheren Blut festgestellt. Im Gegensatz dazu blieben die Leukozytenwerte mit FLT3-WT transplantierten Mäuse über den gesamten Untersuchungszeitraum im Normbereich (Tabelle 1, Spalte 4; Abb. 33).

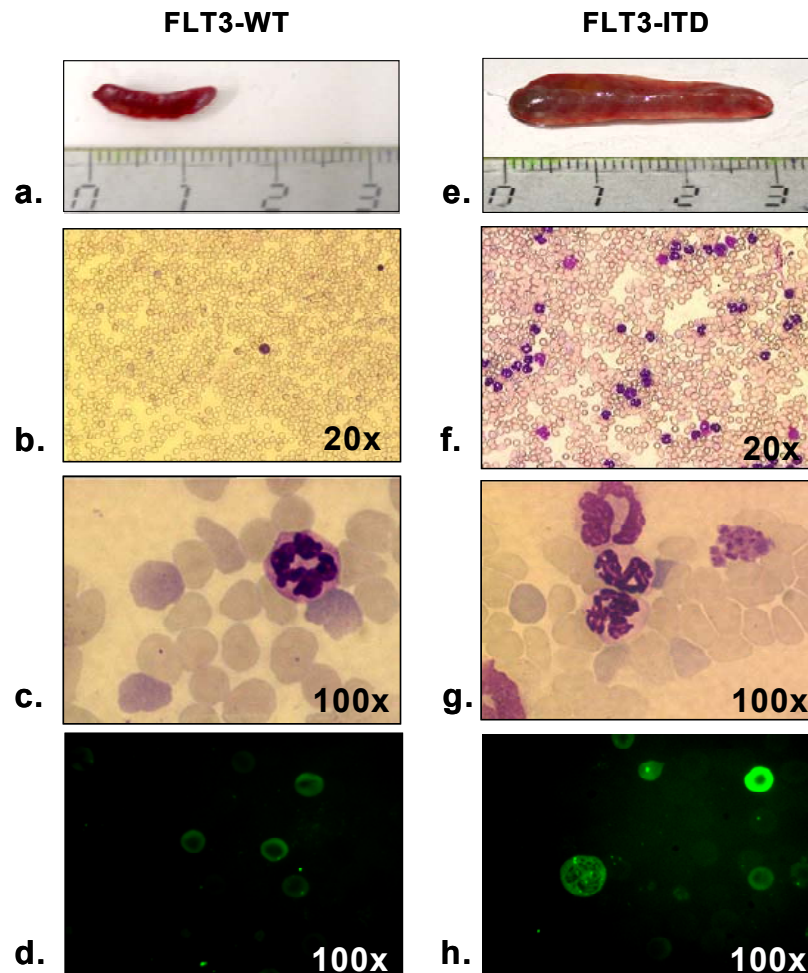


Abb. 34: FLT3-ITD verursacht Splenomegalie und Granulozytose

Vergleich einer charakteristischen FLT3-WT Kontrollmaus (a.-d.) mit einer charakteristischen, mit 110.000 FLT3-ITD^{niedrig} transduzierten Zellen transplantierten Maus (e.-h.).

Der Vergleich der Milzgröße und -beschaffenheit (a. und e.) weist auf eine hämatologische Erkrankung der FLT3-ITD transplantierten Maus hin (e.). Die 60 Tage nach Transplantation angefertigten Ausstriche des peripheren Bluts offenbaren eine massive Granulozytose bei der FLT3-ITD transplantierten Maus (f.) im Vergleich zur Kontrollmaus (b.). Die 100-fache Vergrößerung bestätigt das Vorliegen neutrophiler Granulozyten (c. und g.). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Ausstriche belegen durch den Nachweis der EGFP-Fluoreszenz die Expression von FLT3 in den peripheren Blutzellen (d. und h.).

Um zu bestätigen, dass die die Leukozytose verursachenden Zellen myeloiden Ursprungs sind, wurden parallel zum Blutbild Ausstriche des peripheren Bluts angefertigt (Kapitel 2.2.6.5). Die mikroskopische Betrachtung der Pappenheim-gefärbten Ausstriche offenbarte eine massive Expansion der neutrophilen Granulozyten bei FLT3-ITD transplantierten Mäusen (Abb. 34f und g) im Gegensatz zu den FLT3-WT Kontrolltieren (Abb. 34b und c). Die

fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bestätigt durch den Nachweis der EGFP-Expression die Herkunft der Granulozyten von einer mit FLT3-ITD transduzierten Progenitorzelle (Abb. 34h). Die grüne Fluoreszenz der Erythrozyten beider Ausstriche weist auf eine Transduktion früher Progenitoren hin (Abb. 34d und h).

Der Vergleich der Größe und der makroskopischen Beschaffenheit der Milz von FLT3-WT und FLT3-ITD Mäusen weist ebenfalls auf das Vorliegen einer hämatologischen Erkrankung hin (Abb. 34a und e). Während das Gewicht der Milz FLT3-WT transplantierter Tiere zwischen 60 und 100 mg liegt, ist die Masse der Milz durch granulozytäre Infiltration auf 510 bis 690 mg angestiegen (Tabelle 1, Spalte 5).

Die myeloproliferative Erkrankung der FLT3-ITD Mäuse konnte auch mittels durchflusszytometrischer Analyse von Knochenmark und peripherem Blut bestätigt werden. Die Immunphänotypisierung des peripheren Bluts erfolgte jeweils nach Erstellen des Blutbilds, die des Knochenmarks direkt nach Versterben der Tiere. Das Knochenmark wurde durch Spülen von Femur und Tibia und anschließendem Homogenisieren der Zellsuspension gewonnen (Kapitel 2.2.6.7). Vor der Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern (Kapitel 2.2.6.8), wurden die Erythrozyten aus dem peripheren Blut durch hypotone Lyse entfernt (Kapitel 2.2.6.6). Die abgebildeten Punktwolkendiagramme (Abb. 35) wurden, wie in Abb. 6 dargestellt, generiert.

Der Vergleich des prozentualen Anteils EGFP-positiver Zellen von FLT3-ITD und FLT3-WT transplantierten Mäusen, weist auf das onkogene Potential von FLT3-ITD hin. Sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut der FLT3-ITD Maus wiesen über 30% der mononukleären Zellen eine grüne Fluoreszenz auf (Abb. 35a), welche gleichbedeutend mit der Expression des ITD-mutierten FLT3-Rezeptors ist. Im Gegensatz dazu exprimierten nur ca. 3% der mononukleären Zellen im Knochenmark bzw. 10% im peripheren Blut der Kontrollmäuse EGFP (Abb. 35b). Da zum Zeitpunkt der Transplantation der Anteil EGFP-positiver Zellen in beiden Gruppen identisch war, bestätigt diese Divergenz den durch FLT3-ITD hervorgerufenen Proliferationsvorteil der Zellen.

Die Immunphänotypisierung der Zellen wurde durch Detektion von zellspezifischen Oberflächenmolekülen für myeloische Zellen, B- oder T-Lymphozyten durchgeführt. Das Integrin CD11b (Mac-1) befindet sich unter anderem auf der Oberfläche von Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen (Springer *et al.*, 1979; Leenen *et al.*, 1994), während das Antigen Gr-1 (Ly-6G) spezifisch von Granulozyten exprimiert wird (Fleming *et al.*, 1993; Lagasse und Weissman, 1996). Durch Antikörper gegen B220 (CD45R/B220) und Thy1.2 (CD90.2) können Lymphozyten der B- bzw. T-Zellreihe detektiert werden (Ledbetter *et al.*, 1980; Coffman, 1982; Hathcock *et al.*, 1992).

In Abb. 35 sind exemplarisch die Zelloberflächenfärbungen für jeweils eine charakteristische FLT3-ITD (a) und eine FLT3-WT Maus (b) dargestellt. Der Gesamtanteil der myeloiden

Zellen (CD11b⁺, Gr-1⁺) bei der FLT3-ITD transplantierten Maus ist sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut im Vergleich zur FLT3-WT Maus erhöht. Besonders im peripheren Blut ist eine Verdrängung der B- und T-Lymphozyten zu Gunsten der Granulozyten feststellbar. Während im Blut der FLT3-WT transplantierten Maus unabhängig von der EGFP-Expression 34% der Zellen positiv für den B- und 24% der Zellen positiv für den T-Zellmarker sind, befinden sich im Blut der FLT3-ITD Maus nur noch 2% B- und 3% T-Lymphozyten. Zudem besteht die EGFP-positive Zellpopulation der FLT3-ITD Maus ausschließlich aus Granulozyten, welche auf ihrer Oberfläche die myeloiden Marker CD11b und Gr-1 stark exprimieren, jedoch für die lymphatischen Marker B220 und Thy1.2 negativ sind.

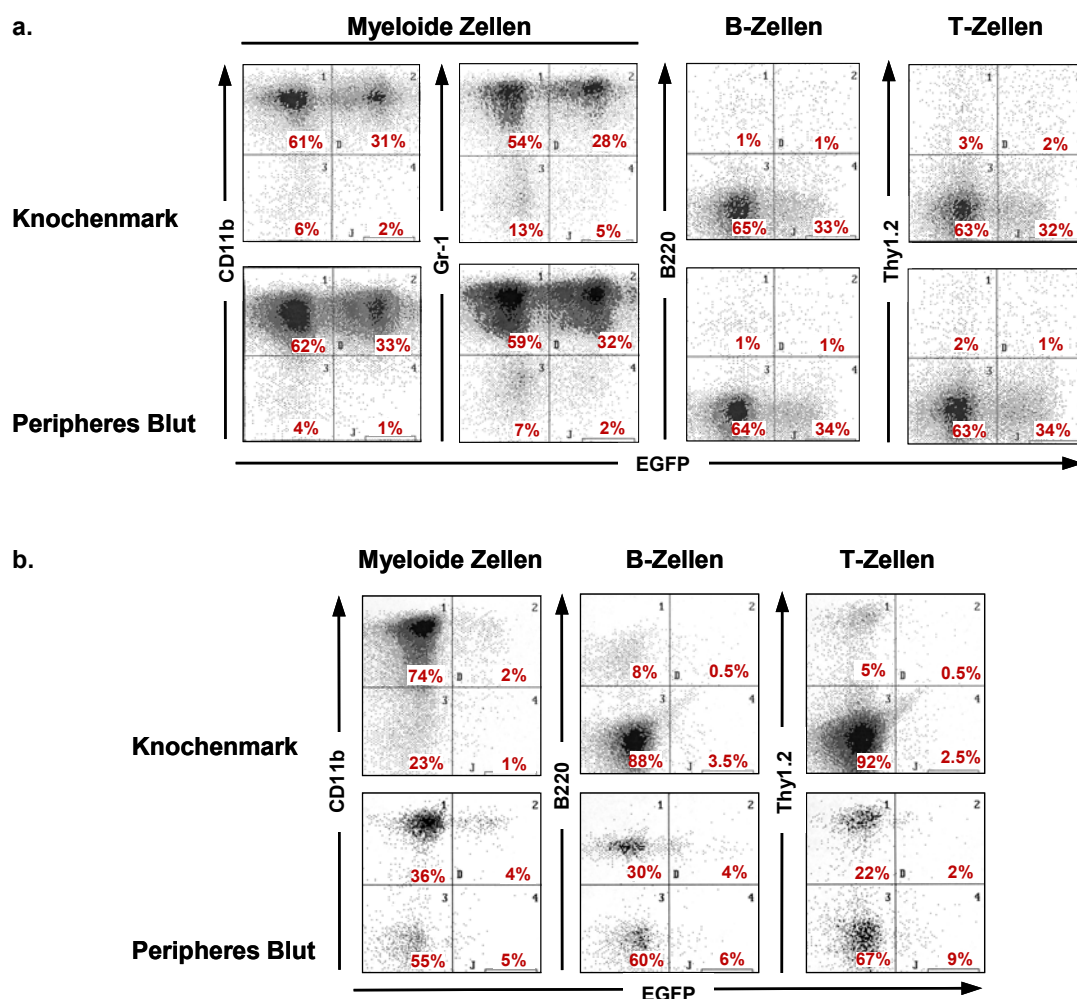


Abb. 35: Immunphänotypisierung von Knochenmark und peripherem Blut.

Exemplarische Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Knochenmark und peripherem Blut jeweils einer charakteristischen Maus, welche mit (a.) FLT3-ITD (110.000 niedrig) oder (b.) FLT3-WT transduziertem Knochenmark transplantiert wurde.

Das Knochenmark wurde durch Spülen von Femur und Tibia und anschließendem Homogenisieren der Zellsuspension gewonnen. Vor der Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern (CD11b, Gr-1; B220; Thy1.2), wurden die Erythrozyten aus dem peripheren Blut durch hypotone Lyse entfernt. Die abgebildeten Punktwolkendiagramme wurden, wie in Abb. 6 dargestellt, generiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten an.

Diese massive Expansion der grün fluoreszierenden Granulozyten in Verbindung mit der auftretenden Leukozytose bestätigt den durch FLT3-ITD induzierten myeloproliferativen Phänotyp der Erkrankung.

3.3.6 Die Anzahl transplanteder Zellen und die Expressionsintensität des FLT3-Proteins beeinflusst die Latenzzeit einer FLT3-induzierten myeloproliferativen Erkrankung

Um den Einfluss der Anzahl transplanteder FLT3-ITD exprimierender Zellen und der Expressionsintensität des FLT3-ITD Proteins auf die Entstehung einer hämatologischen Erkrankung zu untersuchen, wurden, wie bereits als Überblick in Kapitel 3.3.4 dargestellt, weitere Transplantationsexperimente durchgeführt (Tabelle 1, Seite 78).

Alle Mäuse, die mit hoch exprimierenden FLT3-ITD transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, entwickelten ebenfalls eine myeloproliferative Erkrankung. Allerdings war die mediane Latenzzeit beider Gruppen, unabhängig von der Anzahl der transplantierten EGFP-positiven Zellen (146.000 bzw. 104.000), mit 15 bzw. 20 Tagen wesentlich kürzer als bei den Mäusen, deren Hämatopoese von dem niedrig exprimierenden FLT3-ITD Konstrukt beeinflusst war (Abb. 36; Tabelle 1, Spalte 3). Als wahrscheinliche Todesursache ließen sich bei allen Mäusen massive pulmonale Hämorrhagien nachweisen. Diese beobachtet man auch bei durch andere Onkogene verursachten myeloproliferativen Erkrankungen (Schwaller *et al.*, 1998; Zhang und Ren, 1998; Li *et al.*, 1999; Tomasson *et al.*, 2000).

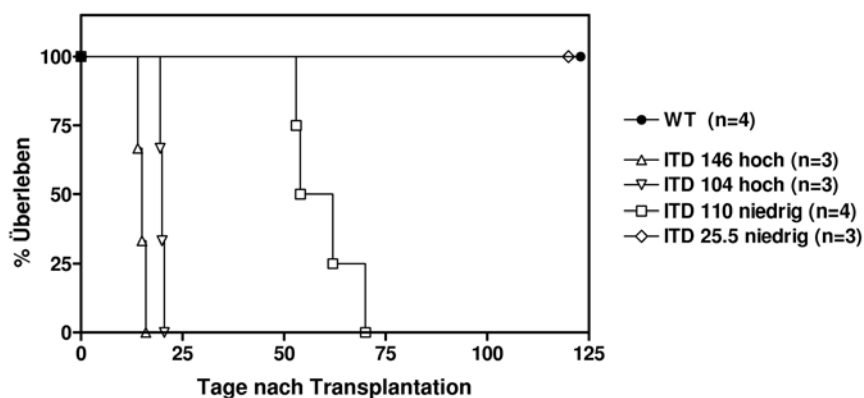


Abb. 36: Kaplan-Meier Überlebenskurve der FLT3-ITD transplantierten Mäuse

Die Mäuse verstarben an der myeloproliferativen Erkrankung oder wurden aufgrund des schlechten Allgemeinzustands infolge der Erkrankung getötet. Der prozentuale Anteil überlebender Tiere wurde gegen die Zeit aufgetragen. Der in der Legende angegebene Zahlenwert $\times 10^3$ entspricht der Anzahl transplanteder EGFP-positiver Zellen. Die Dreiecke symbolisieren Mäuse, die das hoch exprimierende FLT3-ITD Konstrukt tragen, die Quadrate entsprechen Mäusen, deren Knochenmark mit dem niedrig exprimierenden Konstrukt transduziert wurde.

Bei den Mäusen mit kurzer Latenzzeit konnte ebenso eine Leukozytose beobachtet werden. Diese war jedoch aufgrund des kurzen Überlebens der Mäuse nicht so stark ausgeprägt wie die der in Kapitel 3.3.5 beschriebenen Mäuse (Abb. 33, Seite 78).

Die durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark und peripherem Blut der Mäuse mit kurzer Latenzzeit (Abb. 37) bestätigt zum einen den myeloiden Ursprung der Erkrankung und zeigt zum anderen eine wesentlich stärkere Infiltration mit EGFP-positiven Granulozyten als bei Mäusen mit schwacher FLT3-ITD Expression. So liegt in der exemplarischen Darstellung der Anteil EGFP-positiver Granulozyten in peripherem Blut und Knochenmark mit über 62% etwa doppelt so hoch wie bei Mäusen mit langer Latenzzeit (vgl. Abb. 35a und Abb. 37). Das weist darauf hin, dass eine direkte Korrelation zwischen der Proteinmenge von FLT3-ITD und dem durch FLT3-ITD hervorgerufenen Proliferationsvorteil für die transformierten Zellen besteht.

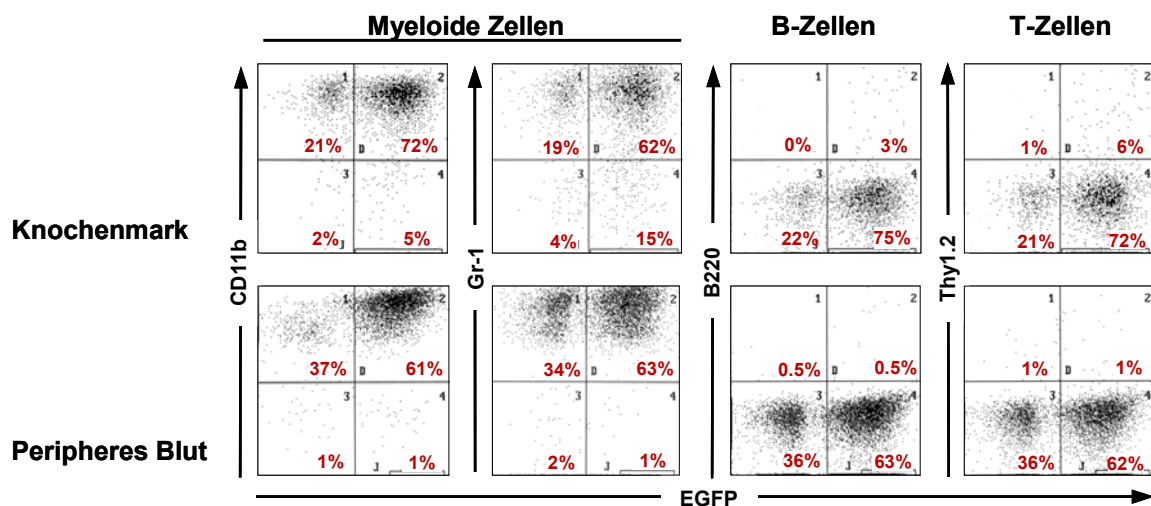


Abb. 37: Immunphänotypisierung von Knochenmark und peripherem Blut

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Knochenmark und peripherem Blut einer charakteristischen Maus, welche mit FLT3-ITD^{hoch} transduziertem Knochenmark transplantiert wurde. Das Knochenmark wurde durch Spülen von Femur und Tibia und anschließendem Homogenisieren der Zellsuspension gewonnen. Vor der Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern (CD11b, Gr-1; B220; Thy1.2) wurden die Erythrozyten aus dem peripheren Blut durch hypotone Lyse entfernt. Die abgebildeten Punktwolkendiagramme wurden, wie in Abb. 6 dargestellt, generiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten an.

Zusammenfassend lässt sich hieraus ableiten, dass die Expressionsstärke des FLT3-ITD Proteins im Knochenmark die Latenzzeit und Intensität, jedoch nicht den Phänotyp der Erkrankung beeinflusst. Die Gegenüberstellung des Gesamtüberlebens der Mäuse, die mit verschiedenen Mengen des hoch FLT3-ITD exprimierenden Knochenmarks transplantiert wurden, macht deutlich, dass auch die Anzahl der transplantierten Zellen Einfluss auf die Latenzzeit hat (Abb. 36). So verstarben die mit 104.000 EGFP-positiven Zellen transplantierten Mäuse nach 19-20 Tagen, während die mit 146.000 Zellen transplantierten Mäuse nur 14-16 Tage überlebten (Tabelle 1, Spalte 3).

Um zu überprüfen, ob auch eine geringe Anzahl niedrig exprimierender Knochenmarkszellen ausreicht, eine hämatologische Erkrankung hervorzurufen, wurden 3 Mäuse mit jeweils 25.500 EGFP-positiven Zellen, welche mit dem niedrig exprimierenden Konstrukt transduziert wurden, transplantiert. Bei diesen Tieren war ein Überleben von mindestens 365 Tagen ohne Anzeichen einer hämatologischen Erkrankung zu beobachten (Abb. 36; Tabelle 1). Demnach ist sowohl eine Mindestanzahl FLT3-ITD exprimierender Zellen, als auch eine ausreichende FLT3-ITD Proteinexpression in jeder Zelle für eine effiziente Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung notwendig.

3.3.7 FLT3 TKD-Mutanten induzieren im Mausmodell lymphatische Erkrankungen mit unterschiedlicher hämatologischer Manifestierung

Um die transformierenden Eigenschaften der FLT3-Tyrosinkinasedomäne (TKD)-Mutanten *in vivo* zu untersuchen und mit den Eigenschaften des ITD-mutierten Rezeptors zu vergleichen, wurden 4 voneinander unabhängige Transplantationsexperimente mit FLT3 TKD-Mutanten durchgeführt. Dazu wurde Knochenmark von 5-FU vorbehandelten Mäusen mit für FLT3 D838Y- oder FLT3 I839M+R-kodierenden Retrovirus unterschiedlicher Titer infiziert. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt und die Gesamtzellzahl durch Messung der mononukleären Zellen bestimmt (Kapitel 2.2.6.5). Anschließend wurden myeloablativ bestrahlte Mäuse mit jeweils 318.000 (n=4) oder 30.000 (n=3) EGFP-positiven mononukleären Zellen (FLT3 D838Y) bzw. 240.000 (n=3) oder 38.000 (n=3) EGFP-positiven mononukleären Zellen (FLT3 I839M+R) transplantiert. Im Hinblick auf die besser transformierenden Eigenschaften des hoch exprimierenden im Vergleich zum niedrig exprimierenden FLT3-ITD Konstrukt wurden für die Transplantationsexperimente mit den TKD-Mutanten des FLT3-Rezeptors ausschließlich hoch exprimierende Konstrukte verwendet.

Im Gegensatz zu FLT3-ITD transplantierten Mäusen entwickelten alle Mäuse, die FLT3 D838Y transduziertes Knochenmark erhielten, lymphatische Erkrankungen mit unterschiedlicher hämatologischer Manifestierung. Die Hälfte (n=2) der mit 318.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierten Mäuse verstarben an einer T-Zell Lymphom-ähnlichen Erkrankung, während der Rest (n=2) an einer akut lymphatischen B-Zell Leukämie (B-ALL) erkrankte.

Das T-Zell Lymphom war charakterisiert durch eine massive Vergrößerung von Thymus, Lymphknoten und Milz (Abb. 38a). Als erstes autoptisch nachweisbares Zeichen einer T-Zell Neoplasie war bei den mit 318.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierten Mäusen die Größe des Thymus auffällig. Die Vergrößerung zu einem Volumen von ca. 10x5x5 mm führte zu einer räumlichen Beeinträchtigung des Herzens und war somit die wahrscheinliche Todesursache. In Abb. 38c ist zum Vergleich der Thymus einer Maus mit FLT3-ITD-

induzierter myeloproliferativer Erkrankung dargestellt. Da sich myeloische Zellen nicht im Thymus anreichern, hat dieser die dem Alter der Maus entsprechende physiologische Größe von ca. 5x2x2 mm. Durch die transformierten B-Zellen einer an B-ALL erkrankten Maus war der Thymus nur leicht vergrößert (Abb. 38b).

Die FLT3 D838Y-transformierten Zellen führten sowohl beim T- als auch beim B-Zell-Phänotyp zu einer Vergrößerung der inguinalen Lymphknoten. Im Vergleich dazu bedingten FLT3-ITD-transformierte myeloide Zellen keine Veränderung der Lymphknoten (Abb. 38, mittlere Spalte). Auf die durch alle Zellarten hervorgerufene Splenomegalie (Abb. 38, rechte Spalte) wird an späterer Stelle näher eingegangen (Kapitel 3.3.8; Abb. 43).

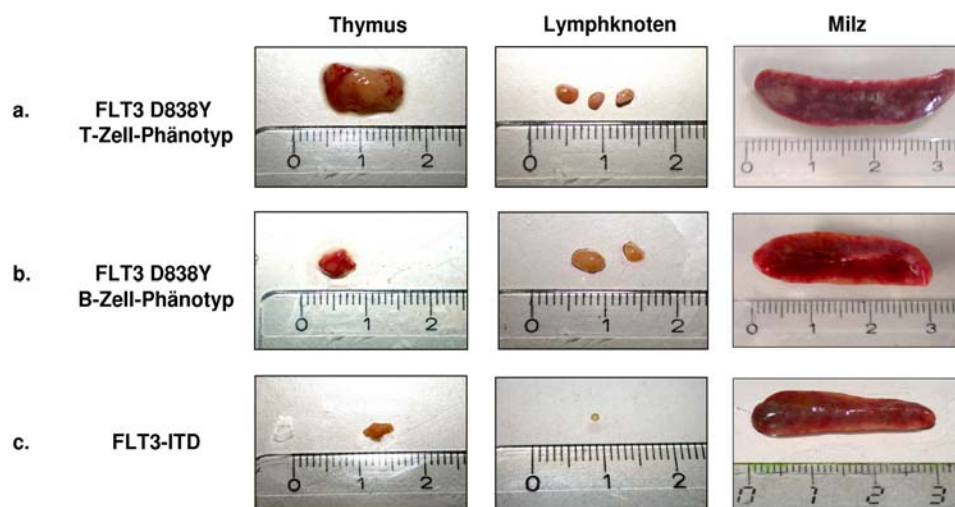


Abb. 38: FLT3 D838Y-induzierte Vergrößerung von Thymus, Lymphknoten und Milz

Exemplarische Darstellung von Thymus, Lymphknoten und Milz charakteristischer Mäuse.

a.: Maus mit FLT3 D838Y-induziertem T-Zell Lymphom.

b.: Maus mit FLT3 D838Y-induzierter B-ALL.

c.: Maus mit FLT3-ITD-induzierter myeloproliferativer Erkrankung.

Die durchflusszytometrische Analyse der infiltrierten Organe bestätigte den durch FLT3 D838Y-induzierten lymphoiden Phänotyp. In Abb. 39 sind exemplarisch die Zelloberflächenfärbungen für jeweils eine charakteristische Maus mit einer T-Zell Lymphom-ähnlichen Erkrankung (a.) und einer B-ALL (b.) dargestellt.

Der Thymus der Maus mit T-Zell Phänotyp (Abb. 39a) besteht fast ausschließlich (99%) aus EGFP-positiven T-Zellen. Das weist darauf hin, dass die durch FLT3 D838Y-transformierten T-Zellen einen starken Proliferationsvorteil haben und somit die massive Vergrößerung des Thymus durch die deregulierte T-Zellproliferation bedingt ist. Die meisten Zellen (85%) exprimierten neben dem T-Zellmarker Thy1.2 auch das Antigen CD4 auf ihrer Oberfläche, wodurch diese als T-Helferzellen identifiziert werden konnten (Dialynas *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1991). Ein kleinerer Teil der Zellen (13%) exprimierte den für zytotoxische T-Zellen charakteristischen Oberflächenmarker CD8 (Ledbetter *et al.*, 1980).

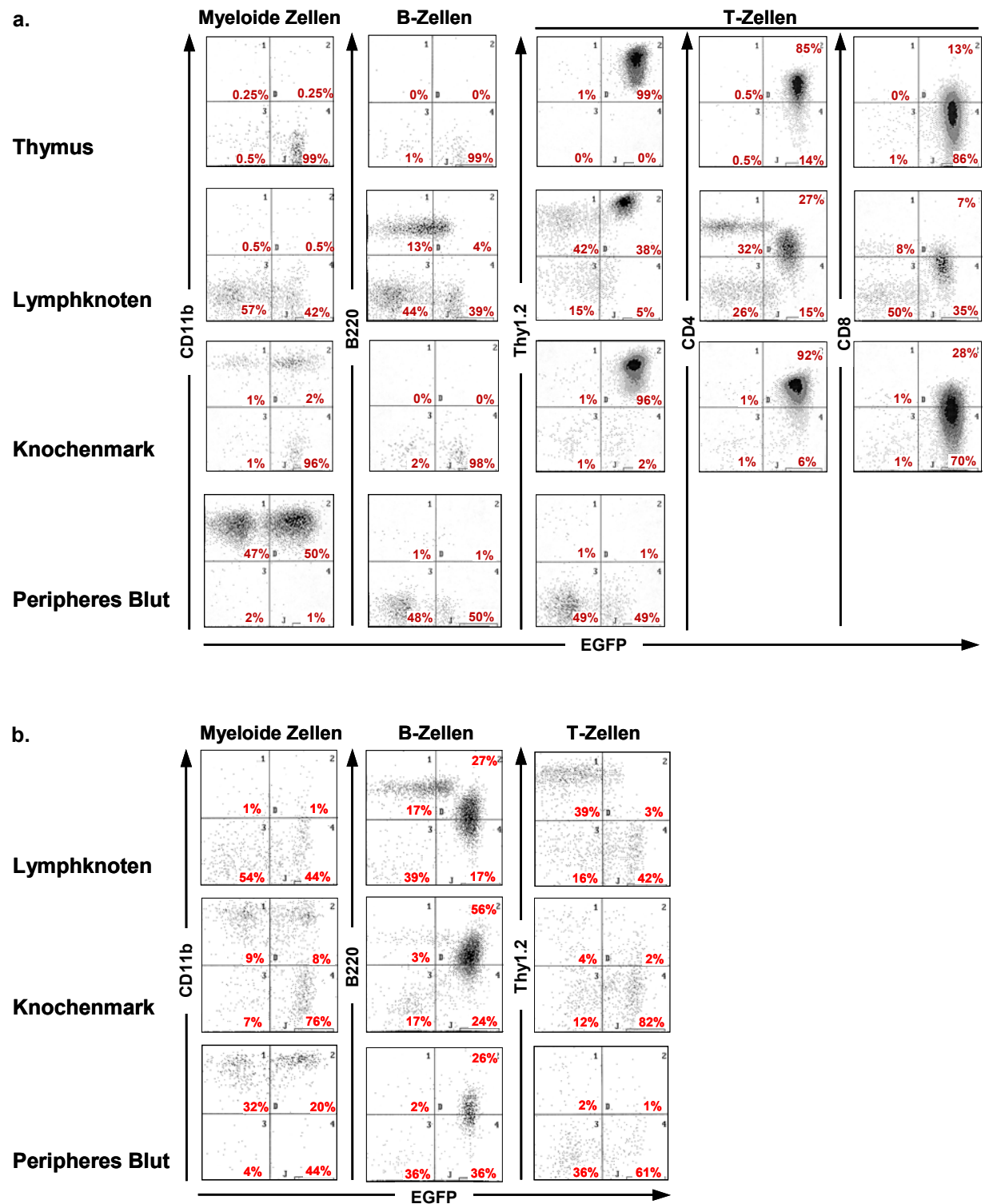


Abb. 39: Immunphänotypisierung der mit FLT3 D838Y-Zellen infiltrierten Organe einer mit 318.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierten Maus

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der angegebenen Organe je einer charakteristischen Maus, die mit 318.000 FLT3 D838Y-transduzierten Zellen transplantiert wurde.

Die Organe wurden, wie in Kapitel 2.2.6.7 beschrieben, aufbereitet, mit den angegebenen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die abgebildeten Punktwolkenendiagramme wurden wie in Abb. 6 dargestellt generiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten an.

a.: Maus mit FLT3 D838Y-induziertem T-Zell Lymphom.

b.: Maus mit FLT3 D838Y-induzierter B-ALL.

Die ausschließliche Expression eines der beiden Marker, CD4 oder CD8, weist auf reife T-Zellen hin (Killeen *et al.*, 1998; Yasutomo *et al.*, 2000). Eine fehlende Expression oder parallele Expression beider bei gleichzeitiger Thy1.2-Expression ist für unreife T-Zellen beschrieben (Fowlkes und Pardoll, 1989; Janeway, 1992). Da im Rahmen dieser Arbeit keine CD4/CD8-Doppelfärbung durchgeführt wurde, kann der Reifegrad der EGFP-positiven Thymuszellen nicht zuverlässig bestimmt werden. Aufgrund der häufiger auftretenden Oberflächenexpression von CD4 im Vergleich zu CD8 kann jedoch darauf geschlossen werden, dass zumindest ein Teil des Thymus aus reifen T-Helferzellen besteht.

Ein ähnliches Bild bietet auch die Immunphänotypisierung des Knochenmarks. 96% der Zellen im Knochenmark sind EGFP-positive T-Lymphozyten. 92% der Knochenmarkzellen exprimieren CD4 und 28% CD8 auf ihrer Oberfläche. Die Vergrößerung der Lymphknoten durch Infiltration mit T-Lymphozyten konnte ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Analyse bestätigt werden.

Interessanterweise waren im peripheren Blut dieser Maus über 50% EGFP-positive Zellen zu detektieren, die jedoch immunphänotypisch nicht aus der lymphoiden (B220⁻; Thy1.2⁻) sondern aus der myeloischen Reihe (CD11b⁺) stammten (Abb. 39a unten). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die retrovirale Transduktion von FLT3 D838Y entweder in omnipotente, hämatopoetische Stammzellen oder aber sowohl in myeloische als auch in lymphatische Progenitoren erfolgte. Die D838Y-Mutante des FLT3-Rezeptors scheint jedoch nicht in der Lage zu sein, myeloide Zellen dahingehend zu transformieren, eine myeloproliferative Erkrankung hervorzurufen.

Die Immunphänotypisierung der Zellen aus Lymphknoten und Knochenmark einer an B-ALL erkrankten Maus macht eine Infiltration dieser Organe mit malignen B-Zellen (EGFP⁺/B220⁺) deutlich. Im Gegensatz zu Mäusen mit T-Zell Phänotyp wurden diese Zellen auch im peripheren Blut detektiert (Abb. 39b). Die vor allem im Lymphknoten beobachtete schwächere Expression des B-Zellmarkers auf EGFP-positiven Zellen, weist darauf hin, dass es sich bei den Tumorzellen um unreife B-Zellen handelt.

Das Überleben aller mit 318.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierte Mäuse lag, unabhängig vom Phänotyp der Erkrankung, zwischen 53 und 89 Tagen. Im Gegensatz dazu, war die Latenz bei Mäusen, welche nur 30.000 Zellen erhielten, mit 104 bis 183 Tagen signifikant länger (Abb. 40, dreieckige Symbole). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass auch bei FLT3 D838Y transduziertem Knochenmark die Anzahl der transplantierten Zellen Einfluss auf die Latenzzeit hat.

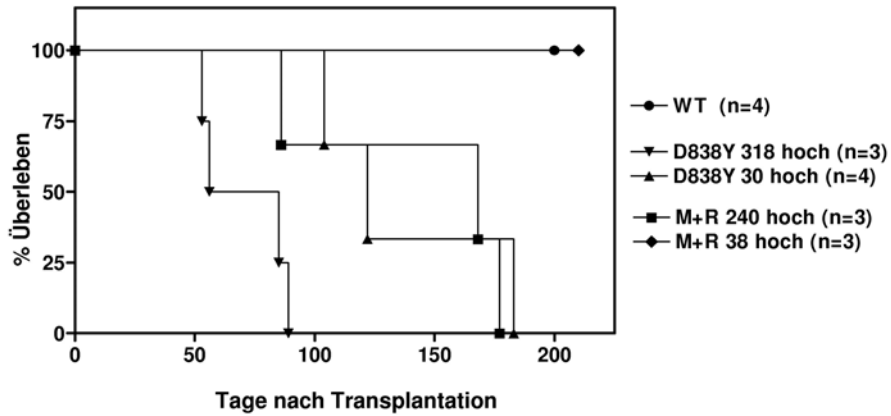


Abb. 40: Kaplan-Meier Überlebenskurve der FLT3 TKD-Mutanten transplantierten Mäuse

Die Mäuse verstarben an der lymphatischen Neoplasie oder wurden aufgrund des schlechten Allgemeinzustands infolge der Erkrankung getötet. Der prozentuale Anteil überlebender Tiere wurde gegen die Zeit aufgetragen. Der in der Legende angegebene Zahlenwert $\times 10^3$ entspricht der Anzahl transplantierte EGFP-positiver Zellen. Die Dreiecke symbolisieren Mäuse, die mit FLT3 D838Y transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, die Quadrate entsprechen Mäusen, deren Knochenmark mit FLT3 I839M+R transduziert wurde.

Alle der mit 30.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierten Mäuse (n=3) verstarben an einer T-Zell Lymphom ähnlichen Erkrankung, welche durch Infiltration von Thymus, Knochenmark und Milz mit EGFP-positiven T-Zellen charakterisiert war.

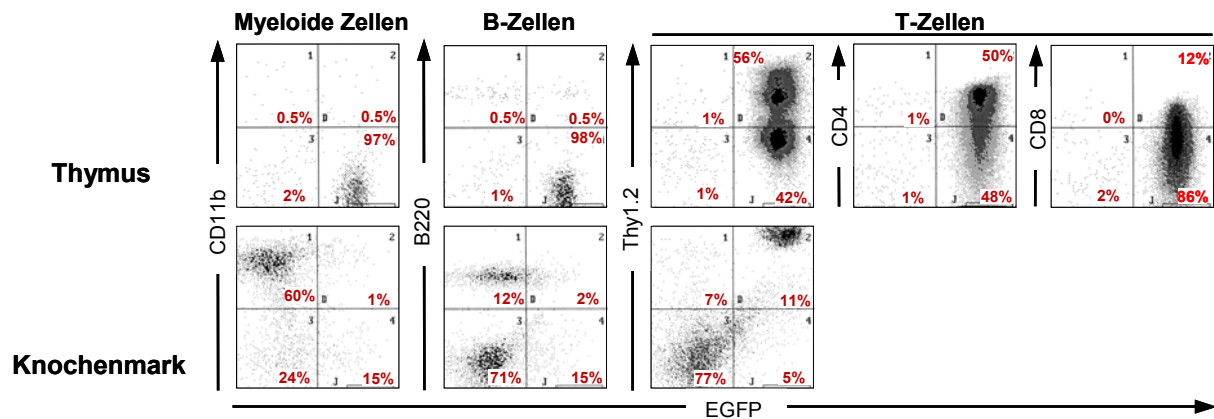


Abb. 41: Immunphänotypisierung von Thymus- und Knochenmarkzellen einer mit 30.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierten Maus

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Thymus und Knochenmark einer charakteristischen Maus, welche mit 30.000 FLT3 D838Y-transduzierten Zellen transplantiert wurde. Die Organe wurden wie in Kapitel 2.2.6.7 beschrieben aufbereitet, mit den angegebenen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die abgebildeten Punktwolkenanalysen wurden wie in Abb. 6 dargestellt generiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten an.

Der durchflusszytometrisch bestimmte Immunphänotyp der malignen Zellen war bei allen Mäusen vergleichbar mit dem der oben beschriebenen Mäuse mit T-Zell Phänotyp. Im Gegensatz zu diesen war jedoch die Infiltration der betroffenen Organe mit EGFP-positiven T-Zellen sehr viel schwächer ausgeprägt. So liegt in der exemplarischen Darstellung einer charakteristischen Maus der Anteil EGFP-positiver T-Zellen im Thymus der mit 30.000 Zellen

transplantierten Maus bei 56% im Vergleich zu 99% und im Knochenmark bei 11% im Vergleich zu 96% bei der mit 318.000 Zellen transplantierten Maus (vgl. Abb. 39a und Abb. 41).

Das Gewicht der Milz der mit 30.000 Zellen transplantierten Mäuse lag zwischen 130 und 240 mg, während die oben beschriebenen Tiere mit T-Zell Lymphom eine sehr viel stärker ausgeprägte Splenomegalie mit einer Milzmasse von 390-910 mg entwickelt hatten (siehe Tabelle 2, Seite 90). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Anzahl der transplantierten FLT3 D838Y-positiven Zellen nicht nur die Latenzzeit, sondern auch die Intensität der Erkrankung beeinflussen.

Zusätzlich zu der am häufigsten in AML-Patienten auftretenden TKD-Mutante FLT3 D838Y (Gilliland und Griffin, 2002), wurde eine selten detektierte Mutante im Mausmodell untersucht. Dafür wurden jeweils 3 Mäuse mit 240.000 oder 38.000 FLT3 I839M+R-positiven mononukleären Knochenmarkszellen transplantiert. Die Transplantation von 240.000 Zellen führte in allen Mäusen (n=3) zu einer T-Zell Lymphom-ähnlichen Erkrankung mit einer Latenzzeit von 86-177 Tagen. Demnach ist das Überleben der Mäuse, deren Knochenmark die Insertionsmutante exprimiert, länger als das der mit vergleichbaren Zellzahlen transplantierten D838Y-exprimierenden Mäuse (Abb. 40, Seite 88).

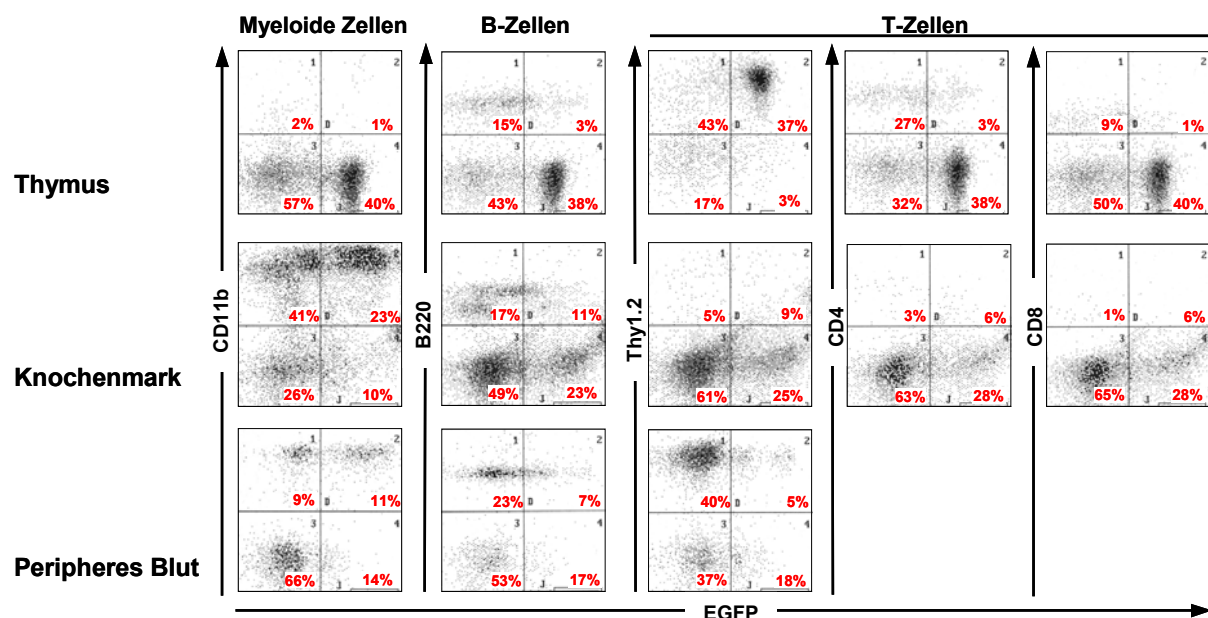


Abb. 42: Immunphänotypisierung von Thymus-, Knochenmark- und peripheren Blutzellen einer mit 240.000 FLT3 I839M+R-positiven Zellen transplantierten Maus

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Thymus, Knochenmark und peripherem Blut einer charakteristischen Maus, welche mit 240.000 FLT3 I839M+R-transduzierten Zellen transplantiert wurde. Die Organe wurden, wie in Kapitel 2.2.6.7 beschrieben, aufbereitet, mit den angegebenen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die abgebildeten Punktwolkendiagramme wurden wie in Abb. 6 dargestellt generiert. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten an.

Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Mäusen manifestierte sich die FLT3 I839M+R-induzierte Neoplasie hauptsächlich im Thymus. In Knochenmark, peripherem Blut und der Milz konnte mittels durchflusszytometrischer Immunphänotypisierung nur ein geringer Anteil EGFP-positiver T-Zellen erfasst werden. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass die malignen T-Zellen im Thymus (Thy1.2⁺/EGFP⁺) weder CD4 noch CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Es handelt sich somit um T-Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium (Abb. 42). Zudem waren bei diesen Mäusen EGFP-positive myeloide Zellen (CD11b⁺) im Knochenmark nachweisbar.

Nach Transplantation von 38.000 FLT3 I839M+R-positiver Zellen war in allen Tieren (n=3) ein Überleben von mindestens 270 Tagen ohne Anzeichen einer hämatologischen Erkrankung zu beobachten (Abb. 40, Seite 88).

Folglich ist, ähnlich wie bei FLT3-ITD, eine Mindestmenge an FLT3 I839M+R-exprimierenden Zellen notwendig, um eine Erkrankung in der Maus zu induzieren.

3.3.8 Vergleich der durch FLT3-ITD und FLT3 TKD-Mutanten induzierten Erkrankungen

Die Ergebnisse der vorangehenden Kapitel zeigen, dass FLT3-ITD im Mausmodell eine myeloproliferative Erkrankung hervorruft, während beide untersuchten TKD-Mutanten des Rezeptors einen lymphoiden Phänotyp induzieren. Im Folgenden werden die Unterschiede der durch verschiedene FLT3-Mutanten verursachten Neoplasien herausgestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der FLT3 Transplantationsexperimente

FLT3-Konstrukt	Anzahl transplantiertter EGFP+ Knochenmarkzellen	Überleben Tage [Median]	WBC count, x10 ⁹ /µl [Median]	Milzgewicht mg [Median]	Phänotyp	Infiltrierte Organe
WT n=4	95.000	> 365 n=4	4,9 - 17,6 [12,4] n=4	60-100 [80] n=2	/ n=4	/
ITD niedrig n=4	110.000	53 - 70 [58] n=4	97,2 - 188 [141] n=4	510-690 [580] n=3	myeloproliferative Erkrankung n=4	Milz, KM Knochenmark peripheres Blut
ITD hoch n=3	146.000	14 - 16 [15] n=3	9,5 - 38,8 [28,4] n=3	290 - 360 [300] n=3	myeloproliferative Erkrankung n=3	Milz Knochenmark peripheres Blut
ITD hoch n=3	104.000	19-20 [20] n=3	17,2 - 22,4 [19,1] n=3	n.a.	myeloproliferative Erkrankung n=3	Milz Knochenmark peripheres Blut
ITD niedrig n=3	25.500	> 365 n=3	4,2 - 11,8 [7,8] n=3	n.a.	/	/
D838Y hoch n=4	318.000	56 - 85 n=2 53 - 89 n=2	5,8 - 10,5 n=2 11,6 - 25,7 n=2	390 - 910 n=2 930 n=1	T-Zell-Lymphom n=2 B-ALL n=2	Thymus, Milz Lymphknoten Knochenmark Milz, Lymphknoten Knochenmark peripheres Blut
D838Y hoch n=3	30.000	104 - 183 [122] n=3	10,2 - 20,1 [16,9] n=3	130 - 240 n=2	T-Zell-Lymphom n=3	Thymus, Milz Lymphknoten Knochenmark
I839M+R hoch n=3	240.000	86 - 177 [168] n=3	6,8 - 12,8 [12,4] n=3	120 - 610 n=2	T-Zell-Lymphom n=3	Thymus
I839M+R hoch n=3	38.000	>270 n=3	3,5 - 15,8 [4,9] n=3	60 - 90 [81] n=3	/ n=3	/

EGFP: grün fluoreszierendes Protein (*Enhanced Green Fluorescent Protein*); n: Anzahl der untersuchten Tiere; n.a.: nicht analysiert; PB: peripheres Blut.

Keine der Mäuse, die mit FLT3 TKD-Mutanten transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, entwickelte eine Leukozytose. Im Gegensatz dazu waren die Leukozytenwerte im peripheren Blut bei allen Mäusen, welche an einem FLT3-ITD induzierten myeloproliferativen Syndrom erkrankt waren, erhöht (Tabelle 2, Spalte 4).

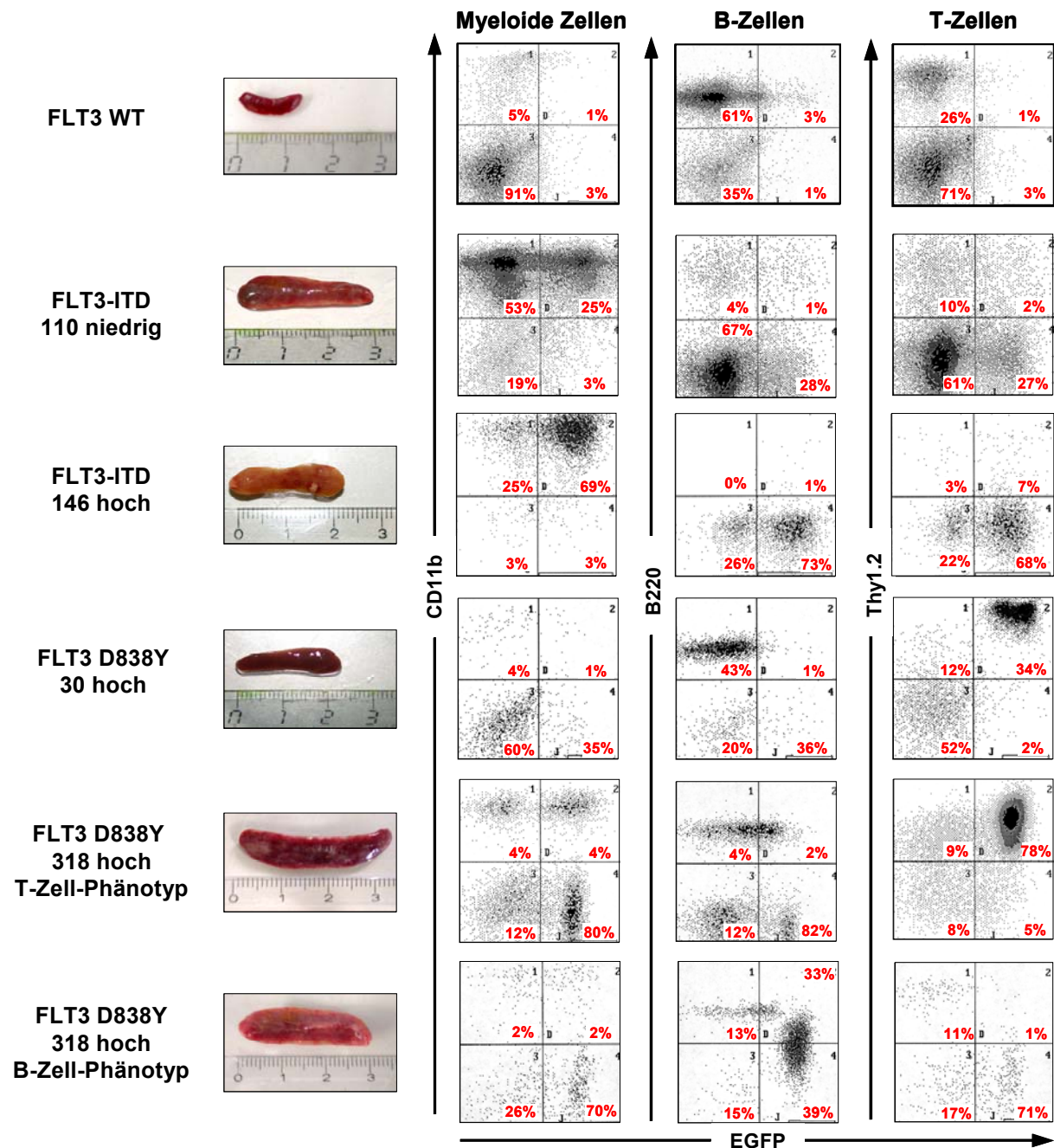


Abb. 43: Immunphänotypisierung der die Splenomegalie verursachenden Zellen

Größenvergleich der Milzen (links) und Vergleich der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung der Milzzellen (rechts). Es sind jeweils die Daten einer charakteristischen Maus pro Transplantationsexperiment dargestellt. In der linken Spalte ist das verwendete Konstrukt und die transplantierte Zellzahl angegeben.

Da die Milz bei hämatologischen Erkrankungen der Maus ein bevorzugter Ort der extramedullären Hämatopoese ist, reichern sich maligne hämatopoetische Zellen häufig dort

an. Durch die deregulierte Proliferation der transformierten Zellen in der Milz entsteht somit eine Splenomegalie. Die Abb. 43 zeigt, dass sowohl durch FLT3-ITD als auch durch FLT3 D838Y eine massive Splenomegalie induziert wurde. Somit ist die Vergrößerung der Milz zwar ein Hinweis auf das Vorliegen einer hämatologischen Erkrankung, jedoch gibt sie keine Auskunft darüber, ob die verursachende Zellen myeloischen oder lymphatischen Ursprungs sind. Die durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen macht deutlich, dass die Splenomegalie sowohl durch myeloide Zellen als auch durch B- oder T-Lymphozyten hervorgerufen werden kann (Abb. 43). Die EGFP-positiven Zellen in der Milz sind bei FLT3-ITD Mäusen fast ausschließlich positiv für den myeloiden Marker CD11b und negativ für B- und T-Zellmarker. Im Gegensatz dazu war die Milz bei Mäusen, die an einer FLT3 D838Y-induzierten Erkrankung verstarben, mit Lymphozyten infiltriert. Bei Tieren mit T-Zelllymphom bestand die Milz zu großen Teilen aus EGFP-positiven T-Zellen, auf deren Oberfläche hauptsächlich Thy1.2, aber kein CD11b oder B220 exprimiert wurde. Die B-ALL ging mit einer Infiltration der Milz mit B-Zellmarker positiven, grün fluoreszierenden Zellen einher. Somit ist nochmals deutlich zu erkennen, dass FLT3-ITD eine myeloproliferative Erkrankung hervorruft, FLT3 D838Y hingegen lymphatische Neoplasien induziert. Das FLT3 I839M+R-induzierte T-Zelllymphom manifestierte sich hauptsächlich im Thymus. In der Milz wurde nur ein geringer Teil EGFP-positiver T-Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Merkmal der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen FLT3-Mutanten ist die Latenzzeit der Erkrankungen. Um den Einfluss der Proteinexpressionsstärke möglichst auszuschließen, wurden für die Gegenüberstellung der Latenzzeiten nur die durch hoch exprimierende Konstrukte hervorgerufenen Erkrankungen verglichen.

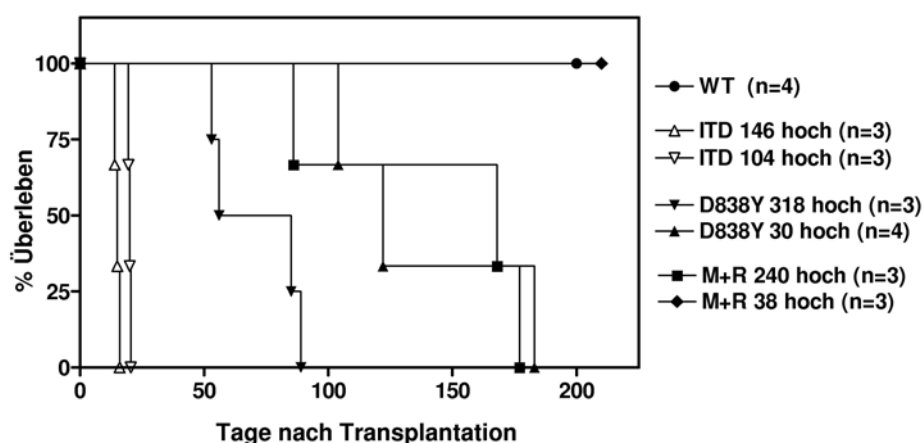


Abb. 44: Überleben von FLT3-ITD- im Vergleich zu FLT3 TKD-transplantierten Mäusen

Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Der prozentuale Anteil überlebender Tiere wurde gegen die Zeit aufgetragen. Der in der Legende angegebene Zahlenwert $\times 10^3$ entspricht der Anzahl transplantierte EGFP-positiver Zellen. Die offenen Symbole stellen Mäuse dar, die mit FLT3-ITD transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, die schwarzen symbolisieren Mäuse, deren Knochenmark mit FLT3 TKD-Mutanten transduziert wurde.

Das Überleben der mit FLT3-ITD transduziertem Knochenmark transplantierten Mäuse war signifikant kürzer, als das der Mäuse, die mit FLT3 TKD-Mutanten infiziertem Knochenmark transplantiert wurden (Abb. 44).

Da sich Retroviren an zufälligen Lokalisationen in das Zellgenom integrieren, kommt es bei verschiedenen Transduktionen zu unterschiedlichen Integrationsstellen des FLT3-IRES-EGFP Provirus im Mausgenom. Durch Wahl geeigneter Schnittstellen und Sonden ist es so möglich, die Klonalität der Erkrankung im Southernblot (Kapitel 2.2.1.8) zu überprüfen.

Dazu wurde zunächst genomische DNA aus den Milzzellen der Mäuse extrahiert (Kapitel 2.2.1.7). Die Milz der Tiere wurde verwendet, da diese bei allen untersuchten Tieren, unabhängig vom Phänotyp, mit den malignen Zellen infiltriert war (Abb. 43, Seite 91). Die extrahierte DNA wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Eco RI* geschnitten. In der proviralen Sequenz befindet sich die Erkennungssequenz für das Enzym vor der für IRES-EGFP kodierenden Sequenz. Deshalb entstehen bei Restriktion mit *Eco RI* unter anderem auch DNA-Fragmente, welche die EGFP-Sequenz beinhalten. Die Länge des Fragments hängt davon ab, wie weit die nächste *Eco RI* Schnittstelle in der genomischen DNA vom Integrationslokus entfernt ist. Nach dem Auftrennen der Fragmente im Agarosegel (Kapitel 2.2.1.3) wurden diese auf eine Nylonmembran (Kapitel 2.2.1.8) transferiert. Durch anschließendes Hybridisieren mit einer radioaktiv markierten EGFP-Sonde (Kapitel 2.2.1.9) wurden die DNA-Fragmente visualisiert, welche das Provirus tragen.

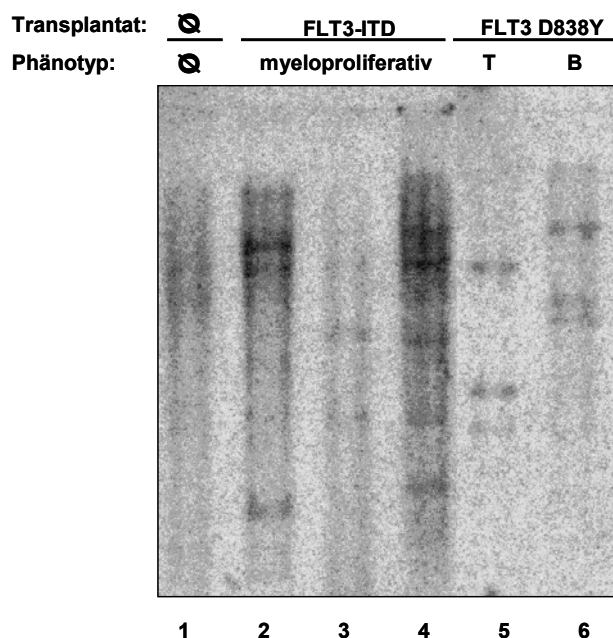


Abb. 45: Integrationsmuster des FLT3-IRES-EGFP Provirus in Milzzellen erkrankter Mäuse

Die genomische DNA aus Milzzellen einer nicht transplantierten Kontrollmaus (Spur 1), drei verschiedener FLT3-ITD Mäuse (Spuren 2-4) und je einer FLT3 D838Y Maus mit T- bzw. B-Zellphänotyp (Spur 5 bzw. 6) wurde extrahiert und mit *Eco RI* verdaut. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert und die proviralen Integrationsstellen durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten EGFP-Sonde visualisiert.

Bei allen untersuchten Mäusen sind mehrere retrovirale Integrationsbanden unterschiedlicher Muster erkennbar (Abb. 45). Somit ist sowohl das FLT3 D838Y- induzierte T-Zell Lymphom als auch die durch das selbe Onkogen hervorgerufene B-ALL oligoklonal. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Kelly *et al.*, 2002b), ist auch die FLT3-ITD induzierte myeloproliferative Erkrankung oligoklonalen Ursprungs.

Einen Hinweis auf die mögliche molekulare Ursache der Induktion verschiedener Erkrankungen ergab die Untersuchung der durch FLT3-Mutanten aktivierten Signalmoleküle im Ba/F3-Zellmodell (Kapitel 3.1.4). Dort wird STAT5 und ERK1/2 durch FLT3-ITD stärker aktiviert als durch die Punktmutanten. Dieser Unterschied konnte zunächst in primären Zellen nicht bestätigt werden, da aus diesen direkt nach der Infektionsprozedur Lysate angefertigt wurden (Kapitel 3.3.3). Somit waren im Medium noch Zytokine vorhanden, welche die Unterschiede der aberranten Aktivierung maskieren konnten. Um zu überprüfen, ob die im Ba/F3-Zellmodell ermittelten Unterschiede auch in murinen Knochenmarkzellen auftreten und somit die differenzielle Aktivierung verschiedener Signalmoleküle ein möglicher Grund der Induktion verschiedener Phänotypen in der Maus sein könnten, wurde Knochenmark aus 5-FU vorbehandelten Mäusen mit den FLT3-Mutanten transduziert. Der Titer der retroviralen Überstände wurde vor der Infektion auf den niedrigsten Wert ($6,7 \times 10^5$ CFU/ml) angeglichen. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen zeigt eine vergleichbare Transduktionseffizienz (Abb. 46a). Die Zellen wurden nach der Infektionsprozedur zweimal mit PBS gewaschen um die im Transduktionsmedium enthaltenen Zytokine zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen 4 h in zytokinfreiem Medium mit 2% FCS kultiviert, um die Aktivierung der zu untersuchenden Signalwege durch im Medium enthaltene Faktoren zu minimieren. Die Lysate aus diesen Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine immunchemisch im Western-Blot dargestellt. Die äquivalente FLT3-Expression ist sowohl durch die FACS-Analyse (Abb. 46a) als auch durch den Nachweis mit einem gegen FLT3 gerichteten Antikörper im Western-Blot bestätigt (Abb. 46b). In Abb. 46b ist außerdem der Aktivierungsstatus der Proteine AKT, ERK1/2 und STAT5 durch Detektion der Lysate mit den jeweiligen phospho-spezifischen Antikörpern dargestellt. Eine stärkere Aktivierung von STAT5 durch FLT3-ITD als durch FLT3 D838Y ist deutlich erkennbar. Eine Aktivierung von STAT5 durch FLT3 I839M+R ist kaum darstellbar.

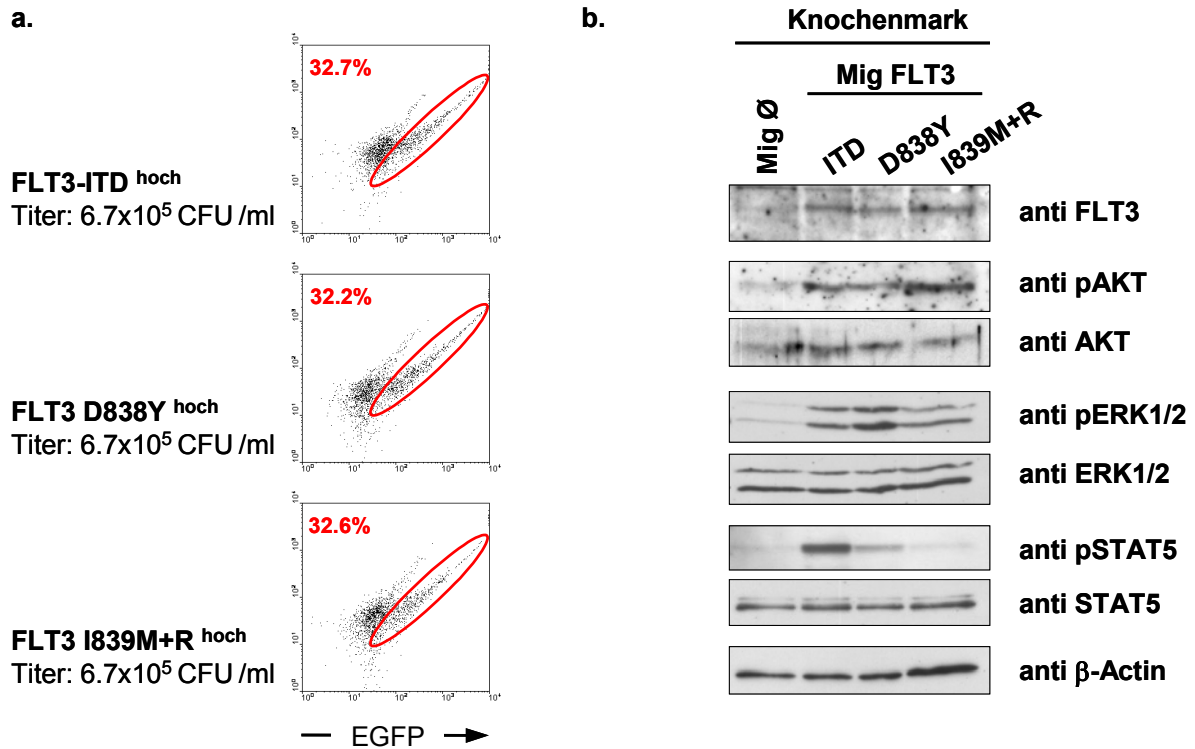


Abb. 46: STAT5 wird von FLT3-ITD stärker aktiviert als von FLT3 TKD-Mutanten

Knochenmark von 5-FU-vorbehandelten Mäusen wurde mit den angegebenen Konstrukten transduziert.

a.: Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression retroviral transduzierter Knochenmarkzellen.

b.: Die in (a) analysierten Zellen wurden nach der Infektionsprozedur zweimal in PBS gewaschen und für 4h in zytokinfreiem Medium mit 2% FCS kultiviert. Anschließend wurden aus den so gehungerten Zellen Lysate hergestellt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot nach gelelektrophoretischer Separation. Die Expression von FLT3 wurde mit einem anti FLT3-Antikörper nachgewiesen. Die Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen β -Aktin. Mit den phosphospezifischen Antikörpern gegen AKT, ERK1/2 und STAT5 (anti pAKT, anti pERK1/2 und anti pSTAT5) wurde der Aktivierungsstatus der Proteine nachgewiesen (oben). Mit Antikörpern gegen AKT, ERK1/2 und STAT5 wurde nach Entfernen des Erstantikörpers die aufgetragene Gesamtproteinmenge kontrolliert (unten).

4 Diskussion

Eine Voraussetzung für den kontrollierten Ablauf der Hämatopoese ist die strenge Regulation der daran beteiligten Rezeptortyrosinkinasen. Wird die autoinhibitorische Funktion nicht aktivierter Kinasen außer Kraft gesetzt, resultiert daraus eine deregulierte Signaltransduktion. Diese kann durch Steigerung der Zellteilungsrate und Inaktivierung der Differenzierungsfähigkeit der Zellen zur Ausbildung einer malignen hämatologischen Erkrankung beitragen (Robertson *et al.*, 2000; Reilly, 2003). Die Voraussetzung einer gezielten Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen ist die Identifikation und Charakterisierung molekularer Zielstrukturen. Dabei ermöglichen sowohl das Zell- als auch das Mausmodell die Untersuchung potentieller Onkogene im Hinblick auf deren transformierende Eigenschaften sowie deren Sensitivität gegenüber selektiven Inhibitoren.

4.1 Untersuchung der transformierenden Eigenschaften im Zellmodell

Die Tyrosinkinaseaktivität des FLT3-Rezeptors wird durch sterische Hinderung der ATP- und Substratbindung reguliert. Die Konformation der Aktivierungsschleife und die Lage der juxtamembranären 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 juxtamembranären Domäne (*internal tandem duplications*, ITD) oder Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife liegt der FLT3-Rezeptor konstitutiv autophosphoryliert vor. Die deregulierte Kinaseaktivität hat eine konstitutive Aktivierung promotogener Signalkaskaden zur Folge. Das onkogene Potential der FLT3-Mutanten zeigt sich in deren Fähigkeit, myeloide und lymphatische Zellen zu transformieren (Fenski *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001). Diese Eigenschaften bilden die Grundlage für die Annahme eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Expression eines mutierten FLT3-Rezeptors und der Pathogenese hämatologischer Neoplasien. Unterstützt wird diese Hypothese durch die hohe Frequenz mutierter FLT3-Rezeptoren in malignen hämatopoetischen Erkrankungen. ITD-Mutationen des FLT3-Rezeptors können bei durchschnittlich 25% aller Patienten mit AML (Kiyoi *et al.*, 1997; Kottaridis *et al.*, 2001; Thiede *et al.*, 2002) sowie bei 5-10% der Patienten mit Myelodysplasie (MDS) nachgewiesen werden (Horiike *et al.*, 1997; Yokota *et al.*, 1997; Fenaux, 2001). TKD-Mutationen des FLT3-Rezeptors werden bei ca. 7% der Patienten mit AML, in 3-5% der

myelodysplastischen Syndrome (MDS) sowie bei 3% aller ALL-Fälle detektiert (Griffin, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Thiede *et al.*, 2002).

Vor kurzem wurden in AML-Patienten zwei neue, bislang noch nicht charakterisierte Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife des FLT3-Rezeptors identifiziert. Bei 13 der 87 untersuchten Patienten mit FLT3 TKD-Mutation konnte eine Deletion des Isoleucin 836 (I836del) nachgewiesen werden. Die Probe eines Patienten zeigte die Mutation des Isoleucin 836 zu Methionin mit gleichzeitiger Insertion eines Arginin (I836M+R) (Thiede *et al.*, 2002). In einer weiteren Studie wurde die Deletionsmutation in zwei von 32 Patientenproben detektiert (Frohling *et al.*, 2002). (Die Nummerierung in diesem Abschnitt basiert auf der Aminosäuresequenz des humanen FLT3-Rezeptors.)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die neu identifizierten FLT3-Rezeptormutanten zunächst im Zellmodell charakterisiert. Der Nachweis konstitutiver Autophosphorylierung gilt als erster Hinweis auf das onkogene Potential mutierter Tyrosinkinasen. Durch transiente Überexpression in Phoenix E-Zellen konnte die konstitutive Autophosphorylierung der beiden neuen FLT3-Mutanten nachgewiesen werden. Die stabile Expression der Mutanten in der hämatologisch relevanten murinen pre-B-Zelllinie Ba/F3 bestätigte die konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors. In beiden Zelllinien führte die Kinaseaktivität der untersuchten FLT3-Mutanten zu einer Phosphorylierung des STAT5-Proteins. Im Gegensatz dazu kam es trotz starker Autophosphorylierung des stimulierten FLT3-WT Rezeptors nicht zu einer Aktivierung des STAT5-Signalweges. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Mutationen im FLT3-Rezeptor nicht nur zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen, sondern auch zusätzliche, unphysiologische Signalwege aktivieren können. In der Literatur wird dieser Sachverhalt jedoch kontrovers diskutiert. Einerseits wurde übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit eine starke STAT5-Phosphorylierung in FLT3-ITD exprimierenden Zellen gezeigt, während in FLT3-WT Zellen nach Stimulation mit dem FLT3-Liganden (FL) keine STAT5-Aktivierung nachweisbar war (Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Spiekermann *et al.*, 2003a; Bagrintseva *et al.*, 2004). Andererseits ist die Aktivierung von STAT5a, aber nicht STAT5b, durch FL-Stimulation von FLT3-WT exprimierenden Ba/F3-Zellen beschrieben (Zhang *et al.*, 2000). Eine mögliche Erklärung für die Divergenz der Daten ist der Einsatz verschiedener Antikörper gegen STAT5. Da STAT5a und STAT5b auf Aminosäureebene eine Homologie von über 90% aufweisen (Lin *et al.*, 1996), detektiert ein Großteil der STAT5-Antikörper beide STAT5-Isoformen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein phosphospezifischer STAT5-Antikörper eingesetzt, der beide Isoformen des Proteins erkennt (Wheeler *et al.*, 2001). Es ist daher wahrscheinlich, dass die konstitutive Kinaseaktivität der FLT3-Rezeptormutanten zur Aktivierung von STAT5b führt, während durch Stimulation des FLT3-WT Rezeptors der STAT5a Signalweg aktiviert wird. Das fehlende pSTAT5 Signal der stimulierten FLT3-WT Zellen könnte zum einen durch eine geringere Affinität des Antikörpers

für pSTAT5a und zum anderen mit einer schwächeren Aktivierung dieser Signalkaskade durch den Wildtyprezeptor erklärt werden.

Wodurch es zur Aktivierung von STAT5 durch die FLT3-Mutanten kommt, ist nicht vollständig geklärt. Vor kurzem wurde die Aktivierung von Tyk2, einem Mitglied der Januskinasefamilie, durch FLT3-ITD, aber nicht durch FLT3-WT beschrieben (Murata *et al.*, 2003). Da die Aktivierung von STAT-Proteinen häufig über Januskinasen erfolgt (Darnell *et al.*, 1994; Ihle, 1995; Benekli *et al.*, 2003), gehen die Autoren von einem Zusammenhang zwischen Tyk2-Phosphorylierung und Aktivierung von STAT5 durch FLT3-ITD aus. Eine direkte Assoziation der Moleküle wurde jedoch nicht gezeigt. Diese Fragestellung bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Zwei weitere Möglichkeiten der Aktivierung von STAT5 können hierbei in Betracht gezogen werden. Zum einen eine direkte Assoziation der Proteine und zum anderen eine Aktivierung von STAT5 über src-Kinasen. Beide Mechanismen sind beschrieben. Beispielsweise erfolgt die Aktivierung von STAT5 durch PDGF direkt durch den PDGF-Rezeptor (Paukku *et al.*, 2000). Andererseits werden die physiologischen Signale von IL-3, Erythropoietin und EGF durch verschiedene Mitglieder der src-Kinasefamilie auf STAT-Proteine übertragen (Chaturvedi *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1998; Olayioye *et al.*, 1999). Klejman *et al.* konnten zeigen, dass die onkogene Tyrosinkinase Bcr-abl STAT5 über die src-Kinase Hck aktiviert (Klejman *et al.*, 2002). Zukünftige Untersuchungen werden der Frage nachgehen, ob die Signalübertragung von FLT3 auf STAT5 über src-Kinasen oder über andere Signalmoleküle erfolgt und welche Unterschiede dabei zwischen dem Wildtyprezeptor und den Mutanten bestehen.

Die biologische Relevanz der untersuchten FLT3-Mutanten wurde durch den Nachweis der transformierenden Eigenschaften bestätigt. Beide Mutanten waren in der Lage sowohl lymphatische als auch myeloische Zellen zur Faktorunabhängigkeit zu transformieren. Die promotogene Aktivität aller FLT3 TKD-Mutanten war vergleichbar. Im Gegensatz dazu erwies sich FLT3-ITD bezüglich der transformierenden Eigenschaften als stärkstes Onkogen. Es wurde daher der Frage nachgegangen, ob FLT3-ITD im Vergleich zu den TKD-Mutanten Signalmoleküle stärker aktiviert, deren Aktivierung promotogene und/oder antiapoptotische Effekte zur Folge hat. Beispielsweise führt die Aktivierung von STAT5 in hämatopoetischen Zellen zu einer veränderten Expression von Genen, die an der Regulation von Zellzyklus, Proliferation und Apoptose beteiligt sind (Nosaka *et al.*, 1999). Die Expression von dominant negativem STAT5 verringert das transformierende Potential von FLT3-ITD (Mizuki *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2003), verändert jedoch nicht die proliferative Aktivität FL-stimulierter FLT3-WT exprimierender Zellen (Murata *et al.*, 2003). Das verdeutlicht die Bedeutung von STAT5 für die transformierende Aktivität von FLT3-ITD. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in stabil exprimierenden Ba/F3-Zellen eine stärkere STAT5-Aktivierung durch FLT3-

ITD als durch die TKD-Mutanten beobachtet werden. Die aberrante Aktivierung von STAT-Signalwegen wird bei verschiedenen hämatologischen Neoplasien beobachtet. Man geht davon aus, dass diese auch von entscheidender Bedeutung für die transformierenden Eigenschaften weiterer Klasse III-Rezeptortyrosinkinase-Mutanten ist, wie beispielsweise für KIT D816V und TEL-PDGFR (Ning *et al.*, 2001; Sternberg *et al.*, 2001; Spiekermann *et al.*, 2002c).

Die gegensätzlichen Daten in Phoenix E-Zellen können zum einen auf die transiente Überexpression von FLT3 und zum anderen auf den nicht-hämatopoetischen Ursprung dieser Zelllinie zurückgeführt werden.

Die Analyse der FLT3-Tyrosinkinasedomäne war lange Zeit auf die Codons 835 und 836 beschränkt. Da diese die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *EcoRV* (GATATC) bilden, ist es ohne aufwendige Sequenzierung möglich, Mutationen, die diese Codons betreffen durch Restriktionsanalysen des aus Patientenproben amplifizierten FLT3-Transkripts zu identifizieren (Yamamoto *et al.*, 2001; Quentmeier *et al.*, 2003). Frühere Studien zeigen, dass insbesondere das innerhalb der Klasse III-Rezeptortyrosinasen hoch konservierte Codon 835 (D835) von Mutationen betroffen ist (Griffin, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001). Für die biologische Relevanz der D835-Mutationen spricht, dass der Austausch der homologen Aminosäure in KIT (D816) und im CSF-Rezeptor (D802) zur Liganden-unabhängigen Aktivierung dieser Rezeptoren führt (Furitsu *et al.*, 1993; Piao und Bernstein, 1996; Morley *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das transformierende Potenzial und damit die biologische Relevanz zwei kürzlich durch direkte Sequenzierung identifizierter FLT3 TKD-Mutanten belegt werden. Neuere Studien zeigen weitere Leukämie-assoziierte, aktivierende Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife des FLT3-Rezeptors (D839G, 840GS, N841I/Y, Y842C/H), die durch die konventionelle Restriktionsanalytik nicht detektiert worden wären (Spiekermann *et al.*, 2002a; Jiang *et al.*, 2004; Kindler *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). Die klinische Relevanz dieser Mutationen liegt nahe, da vergleichbare aktivierende Mutationen auch bei KIT sowie im PDGF-Rezeptor in malignen Erkrankungen nachgewiesen wurden (Pignon *et al.*, 1997; Longley *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 2003). Da diese Mutationen nur durch direkte Sequenzierung erfassbar sind, ist es wahrscheinlich, dass der Anteil aktivierender TKD-Mutationen im FLT3-Rezeptor leukämischer Blasten noch unterschätzt wird. Zusätzlich besteht die Möglichkeit transformierender Mutationen in anderen Domänen. Beispielsweise wurden aktivierende Punktmutationen in der extrazellulären Domäne des CSF-Rezeptors beschrieben (Roussel *et al.*, 1988). In gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und myeloproliferativen Erkrankungen konnten aktivierende Mutationen der extrazellulären Domäne von KIT nachgewiesen werden (Nagata *et al.*, 1995; Lux *et al.*, 2000). Es ist also mit großer Sicherheit davon auszugehen, dass

weitere Mutationen des FLT3-Rezeptors in leukämischen Zellen von AML-Patienten entdeckt werden. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass FLT3 in bis zu 100% der AML-Fälle stark überexprimiert vorliegt (Drexler, 1996; Rosnet *et al.*, 1996), gleichzeitig aber die Mutationsanalytik bis zum heutigen Zeitpunkt auf wenige Domänen beschränkt war.

4.2 Untersuchung der Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren

FLT3 ist das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen bei akut myeloischen Leukämien (Gilliland und Griffin, 2002). Obwohl FLT3 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht das alleinige verantwortliche Onkogen für die Induktion einer AML ist, scheint es trotzdem eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf der Erkrankung zu spielen. Selektive Hemmstoffe gegen diese Kinase stellen somit eine neue Option für die Behandlung FLT3-positiver leukämischer Erkrankungen dar. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden mehrere selektive FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt und in präklinischen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese durch 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 (Levis *et al.*, 2001; Tse *et al.*, 2001; Levis *et al.*, 2002; Weisberg *et al.*, 2002). Die klinische Relevanz der FLT3-Inhibition wurde im FLT3-ITD Mausmodell bestätigt. Die Behandlung der Mäuse mit Kinaseinhibitoren hatte ein signifikant verlängertes Überleben der Tiere zur Folge (Kelly *et al.*, 2002c; Levis *et al.*, 2002; Weisberg *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Empfindlichkeit verschiedener FLT3-Mutanten gegenüber den FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren AG1296, PKC412 und SU5614 untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass das inhibitorische Potential der untersuchten Substanzen durch die Art der Mutation im FLT3-Rezeptor beeinflusst wird.

Während FLT3-ITD und FLT3 I839del sich durch hohe Sensitivität gegenüber AG1296 auszeichneten ($IC_{50} \approx 2,5 \mu M$), konnte die konstitutive Kinaseaktivität von FLT3 I839M+R nur durch hohe Konzentrationen ($IC_{50} \approx 6 \mu M$) des Inhibitors unterbunden werden. Interessanterweise wiesen FLT3 D838Y exprimierende Zellen eine relative Resistenz gegenüber dem Inhibitor auf ($IC_{50} > 10 \mu M$). AG1296 inhibiert die konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors durch kompetitive Verdrängung von ATP aus der ATP-Bindungstasche (Kovalenko *et al.*, 1997). Die exakte Anpassung des Moleküls an die räumlichen Gegebenheiten der ATP-Bindungstasche ist Voraussetzung für dessen inhibitorische Aktivität. Mutationen im Zielprotein können zu einer Veränderung der räumlichen Struktur führen. Dadurch wird die Affinität des Inhibitors zur Kinase durch sterische Inhibition der Bindung verringert oder aufgehoben, was sich in relativer oder absoluter Resistenz der

Kinase gegenüber dem Inhibitor widerspiegelt. Die Notwendigkeit der exakten molekularen Zielstruktur für eine effiziente Inhibition der Kinaseaktivität wurde auch für die onkogene Tyrosinkinase Bcr-abl beschrieben. Mutationen innerhalb der Kinasedomäne führen zur Resistenz von Bcr-abl gegenüber dem abl-Kinasinhibitor Imatinib (Shah *et al.*, 2002; von Bubnoff *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse mit PKC412 unterstützen die Hypothese, dass die Aminosäuresequenz des FLT3-Rezeptors die Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren beeinflusst. Die untersuchten FLT3-Mutanten konnten hierbei in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zellen, die durch TKD-Mutanten (D838Y, I839del, I839M+R) transformiert waren, reagierten sensitiver ($IC_{50} < 6$ nM) als FLT3-ITD exprimierende Zellen ($IC_{50} \approx 12$ nM). Bei den Punktmutanten war hierbei eine direkte Korrelation zwischen Inhibition der Proliferation, Induktion von Apoptose und Inhibition der STAT5-Phosphorylierung zu beobachten. Im Gegensatz dazu, konnte in FLT3-ITD exprimierenden Zellen zwar eine potente Inhibition der proliferativen Aktivität beobachtet werden, jedoch wurde in diesen Zellen durch PKC412 keine Apoptose induziert. Durch Inhibition von FLT3-ITD wurde im Gegensatz zu den TKD-Mutanten auch bei hohen Konzentrationen des Inhibitors keine vollständige Aufhebung der STAT5-Phosphorylierung beobachtet, was möglicherweise die Ursache für die fehlende Apoptoseinduktion war. Kürzlich konnte in FLT3-ITD exprimierenden Zellen die Induktion von Apoptose durch PKC412 nachgewiesen werden (Weisberg *et al.*, 2002). Der Anteil apoptotischer Zellen war in dieser Studie allerdings erst nach 72 h stark angestiegen. In der vorliegenden Arbeit wurden schwerpunktmäßig die Unterschiede zwischen den verschiedenen FLT3-Mutanten untersucht. Da PKC412 nach 24 h schon in über 80% der FLT3 TKD-Zellen Apoptose induziert hatte, wurden spätere Zeitpunkte nicht berücksichtigt. Außerdem beschreiben Weisberg *et al.* einen geringeren IC_{50} -Wert bezüglich der Proliferation FLT3-ITD exprimierender Zellen ($IC_{50} \approx 10$ nM) (Weisberg *et al.*, 2002). Möglicherweise ist sowohl der geringere IC_{50} -Wert, als auch die stärkere Induktion von Apoptose durch Expressionsunterschiede bedingt. Auffällig ist in der Studie auch die höhere Spontanapoptoserate der FLT3-ITD Zellen, was auf eine schwächere Transformation der Zellen durch FLT3-ITD hindeutet.

Die Theorie der Beeinflussung der Sensitivität gegenüber Kinaseinhibitoren durch die exakte Aminosäuresequenz konnte durch Experimente mit dem Indolinon SU5614 bestätigt werden. Die Aktivität dieser Substanz wurde von mehreren Gruppen bei verschiedenen KIT-Mutanten überprüft. Durch Mutationen innerhalb der juxtamembranären Domäne von KIT war die Sensitivität gegenüber SU5614 stärker herabgesetzt als durch TKD-Mutationen des Rezeptors (Liao *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002). Bei den Untersuchungen von FLT3 war ein anderes Muster zu beobachten. Die Verkürzung der Aktivierungsschleife (I839del) rief ein gutes Ansprechen auf SU5614 hervor ($IC_{50} \approx 60$ nM). Die Verlängerung (I839M+R) bewirkte

dagegen verringerte Sensitivität gegenüber dem Indolinon ($IC_{50} \approx 300$ nM). Die ITD- und die D838Y-Mutante wiesen eine mittlere Sensitivität auf ($IC_{50} \approx 150$ nM).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Empfindlichkeit verschiedener FLT3-Mutanten gegenüber allen untersuchten Inhibitoren von der Art der Mutation beeinflusst wird. Die einzelnen Mutanten wiesen weder eine absolute Resistenz gegen alle Inhibitoren auf, noch war eine einzelne Mutante hochsensitiv gegenüber jedem Inhibitor. Somit kann ausgeschlossen werden, dass einzelne Mutanten aufgrund verminderter oder verstärkter Kinaseaktivität die Zellen schwächer oder stärker transformierten und es dadurch zu erhöhter oder verminderter Sensitivität gegenüber jedem Inhibitor kam.

Diese Daten sollten in zukünftigen klinischen Studien mit FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren bei der Auswahl der Einschlusskriterien berücksichtigt werden. Es wäre sinnvoll, die Mutation des FLT3-Rezeptors und dessen Sensitivität gegenüber dem jeweiligen Inhibitor vor Einschluss des Patienten in die Studie exakt zu bestimmen. Basierend auf diesen Daten ist es möglich alternative FLT3-Inhibitoren einzusetzen, um bestehende oder durch sekundäre Mutationen erworbene Resistenzen zu umgehen.

4.3 Koexpression von FLT3-WT in FLT3-ITD exprimierenden Zellen

Die klinische Prognose für AML-Patienten mit einer ITD-Mutation des FLT3-Rezeptors ist signifikant schlechter als für Patienten, die diesen genetischen Defekt nicht tragen (Kiyoi *et al.*, 1999; Abu-Duhier *et al.*, 2000; Rombouts *et al.*, 2000; Kottaridis *et al.*, 2001; Meshinchi *et al.*, 2001). Neuere Studien zeigen die prognostische Relevanz der FLT3-ITD/FLT3-WT Ratio. Patienten mit geringer ITD/WT-Ratio haben keine schlechtere Prognose als Patienten ohne FLT3-Mutation, wohingegen eine hohe ITD/WT-Ratio als ungünstiger prognostischer Faktor gilt (Thiede *et al.*, 2002). Der vollständige Verlust des FLT3 Wildtyp-Allels, zum Beispiel durch den Verlust eines Chromosoms 13, hat eine weitere Verschlechterung der Prognose zur Folge (Whitman *et al.*, 2001). Einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen dieser genetischen Veränderung und der Progression der Erkrankung gibt eine Studie, in der Deletionen des WT-Allels häufiger bei Rezidiven als nach Neudiagnose nachgewiesen wurden (Schnittger *et al.*, 2002).

Whitman *et al.* haben ein Modell erstellt, welches demonstrieren soll, wie die schlechtere Prognose durch einen hemizygoten FLT3-ITD Genotyp ($FLT3^{ITD/-}$) verursacht werden könnte (Whitman *et al.*, 2001): In Zellen mit normalem FLT3-Genotyp erfolgt die Aktivierung von FLT3 ausschließlich durch Liganden-induzierte Dimerisierung. Nach ITD-Mutation eines FLT3-Allels und Verlust des FLT3-WT-Allels bilden sich in der Zelle mit hoher Frequenz FLT3-ITD Homodimere, durch die es zu konstitutiver Aktivierung physiologischer und möglicherweise auch unphysiologischer Signalkaskaden kommt. Demnach hat diese Zelle

gegenüber Zellen mit normalem Genotyp einen Proliferationsvorteil und ist somit Ursache der schlechteren Prognose. Bleibt der Zelle jedoch trotz ITD-Mutation eines FLT3-Allels noch ein gesundes Allel erhalten (FLT3^{ITD/WT}), bilden sich neben Homodimeren beider Klassen auch Heterodimere zwischen ITD- und WT-Rezeptor. Die Aktivität der Heterodimere ist noch ungeklärt. Zellen mit FLT3^{ITD/WT}-Genotyp sind teilweise durch den FLT3-Liganden reguliert und die zu konstitutiver Aktivierung führende FLT3-ITD Homodimerbildung findet nur noch mit geringerer Frequenz statt (Whitman *et al.*, 2001).

Basierend auf diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellmodell erstellt, das den heterozygoten FLT3^{ITD/WT}-, und den hemizygoten FLT3^{ITD/-}-Genotyp imitiert. Entgegen der Hypothese von Whitman *et al.* hatten die „heterozygoten“ FLT3^{ITD/WT}-Zellen einen Proliferationsvorteil gegenüber den „hemizygoten“ FLT3^{ITD/-}-Zellen. Dies wurde sowohl in lymphatischen als auch in myeloiden Zellen beobachtet. Damit können zellkontextspezifische Einflüsse weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Heterodimerbildung zwischen FLT3-WT und FLT3-ITD führt auch in Abwesenheit des FLT3-Liganden zur Transphosphorylierung beider Protomere (Kiyoi *et al.*, 1998). Dadurch werden Signalwege aktiviert, die zur Transformation faktorabhängiger Zelllinien führen (Kiyoi *et al.*, 2002). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Heterodimere das selbe transformierende Potenzial besitzen wie die FLT3-ITD Homodimere. Unter der Voraussetzung, dass eine Heterodimerbildung zwischen FLT3-ITD und FLT3-WT ein ebenso starkes promitogenes Signal wie die FLT3-ITD Homodimerbildung hervorruft, könnte der Proliferationsvorteil der FLT3^{ITD/WT}-Zellen auf die stärkere FLT3-Proteinexpression zurückgeführt werden. Jedoch untergräbt diese Theorie die Hypothese eines geringeren promitogenen Signals durch die Bildung von Heterodimeren und die daraus resultierende geringere Frequenz an FLT3-ITD Homodimeren.

Die Proliferation der FLT3^{ITD/WT}-Zellen war nach Zugabe des FLT3-Liganden negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu, konnte in FLT3^{ITD/-}-Zellen keine Veränderung der proliferativen Aktivität durch den FLT3-Liganden beobachtet werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die FLT3-WT Homodimere, welche sich ausschließlich in Anwesenheit des Liganden bilden, ein schwächeres promitogenes Signal hervorrufen als WT/ITD-Heterodimere und ITD-Homodimere, die in Abwesenheit von FL in diesen Zellen entstehen. Damit wäre die Aussage von Whitman *et al.* bestätigt, wonach die Proliferation „heterozygoter“ FLT3^{ITD/WT}-Zellen noch teilweise durch den FLT3-Liganden reguliert ist (Whitman *et al.*, 2001).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es nicht möglich war, die von Whitman *et al.* aufgestellte Hypothese durch Koexpression von FLT3-WT und FLT3-ITD in murinen hämatopoetischen Zelllinien zu bestätigen. Eine endgültige Aussage sollte aber erst nach Optimierung des Modells getroffen werden. Dafür stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

Zum einen die Anpassung der FLT3-Expressionstärke in der FLT3^{ITD/-}-Zelllinie und zum anderen die Verwendung humaner AML-Zelllinien mit endogener FLT3-ITD Expression (MV4-11; MUTZ-11) (Quentmeier *et al.*, 2003). Eine funktionelle Nachbildung des „hemizygoten“ und „heterozygoten“ Genotyps im Zellmodell wäre von großer Bedeutung für die präklinische Untersuchung therapeutischer Maßnahmen.

4.4 Vergleichende Untersuchung des onkogenen Potentials verschiedener FLT3-Mutanten im murinen Knochenmarkstransplantationsmodell

Das murine Knochenmarkstransplantationsmodell ermöglicht die Untersuchung potentieller Onkogene *in vivo*. Durch Transplantation myeloablativ bestrahlter Mäuse mit retroviral transduzierten Knochenmarkzellen, kann der Einfluss des transduzierten Gens auf die Hämatopoese untersucht werden. Mit diesem Modell konnte bereits die Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung durch FLT3-ITD nachgewiesen werden (Kelly *et al.*, 2002b). Das onkogene Potential von FLT3-Tyrosinkinasedomänenmutanten wurde bislang noch nicht im Mausmodell untersucht.

Die Ergebnisse klinischer Studien weisen auf unterschiedliche Eigenschaften von FLT3-ITD und den TKD-Mutanten in hämatologischen Neoplasien hin. Zum Einen scheinen Tyrosinkinasedomäne-Mutationen im FLT3-Rezeptor im Gegensatz zu FLT3-ITD keinen Einfluss auf die klinische Prognose von AML-Patienten zu haben (Frohling *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003; Thiede *et al.*, 2003). Zum Anderen können FLT3 TKD Mutationen häufig bei Kindern mit MLL, einer Form der akut lymphatischen Leukämie (ALL), und hyperdiploider ALL sowie bei Patienten mit T-Zell-Leukämie nachgewiesen werden (Armstrong *et al.*, 2004; Paietta *et al.*, 2004; Taketani *et al.*, 2004). Dagegen wird FLT3-ITD in lymphatischen Leukämien nur selten detektiert (Nakao *et al.*, 1996; Yokota *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Brown und Small, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese potenziell unterschiedlichen Eigenschaften von FLT3-ITD und FLT3 TKD-Mutanten im Mausmodell untersucht. Interessanterweise spiegelt sich in den Ergebnissen das in Patienten beobachtete Bild wieder: Die Expression der FLT3 TKD-Mutanten in murinen Knochenmarkzellen führte zu lymphatischen Erkrankungen, während FLT3-ITD in Analogie zu den bereits publizierten Daten (Kelly *et al.*, 2002b) eine myeloproliferative Erkrankung hervorrief.

Die Expression der am häufigsten in hämatologischen Neoplasien nachgewiesenen FLT3-Mutante (D838Y) (Gilliland und Griffin, 2002), induzierte in allen transplantierten Mäusen einen lymphatischen Phänotyp mit unterschiedlicher hämatologischer Manifestierung. Hierbei trat sowohl eine T-Zell-Lymphom ähnliche Erkrankung, als auch eine akut

lymphatische B-Zell-Leukämie (B-ALL) auf. Das parallele Auftreten B- und T-lymphoider Phänotypen in einem Transplantationsexperiment könnte entweder durch die Infektion multipotenter Progenitorzellen oder durch die Transduktion früher lymphatischer Zellen beider Reihen bedingt sein. Für die Infektion multipotenter Progenitorzellen spricht die Anwesenheit FLT3 D838Y (EGFP)-positiver, myeloischer Zellen im peripheren Blut dieser Mäuse. Jedoch weisen B- und T-Zellphänotyp unterschiedliche retrovirale Integrationsmuster auf, was eher auf eine Entwicklung aus verschiedenen leukämischen Vorläufern hinweist.

Neben FLT3 D838Y wurde das selten in Patienten detektierte FLT3 I839M+R (Thiede *et al.*, 2002) im Mausmodell untersucht. Die Transplantation von 240.000 FLT3 I839M+R-positiven Zellen führte in allen Mäusen zur Entwicklung einer T-Zell-Lymphom ähnlichen Erkrankung. Im Gegensatz dazu waren 38.000 Zellen nicht ausreichend, um eine hämatologische Neoplasie auszulösen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die transformierenden Eigenschaften von FLT3 I839M+R *in vivo* schwächer sind als die von FLT3 D838Y, womit auch die geringere Frequenz dieser Mutation in Patienten erklärt werden könnte. Neben der geringeren Penetranz der durch FLT3 I839M+R induzierten Erkrankung spricht auch die längere Latenzzeit sowie die schwächere Organinfiltration mit malignen Zellen für das geringere onkogene Potential von FLT3 I839M+R im Vergleich zu FLT3 D838Y.

Ein wichtiges Merkmal der unterschiedlichen Eigenschaften von FLT3-ITD und den TKD-Mutanten war die Latenzzeit der Erkrankungen. Das Überleben der mit FLT3-ITD transduziertem Knochenmark transplantierten Mäuse war signifikant kürzer als das der Mäuse, die mit FLT3 TKD-Mutanten infiziertem Knochenmark transplantiert wurden. Die äquivalente FLT3-Proteinexpression im Knochenmark wurde vor Transplantation nachgewiesen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der FLT3-Proteinexpressionsstärke für die Induktion der verschiedenen Phänotypen bzw. die unterschiedlichen Latenzzeiten verantwortlich waren. Die längere Latenz kann darauf hinweisen, dass das onkogene Potential der FLT3 TKD-Mutanten alleine nicht ausreicht, um eine hämatologische Erkrankung zu induzieren, sondern zusätzlich weitere, sekundäre Mutationen notwendig sind. Da ein direkter Nachweis sekundärer Mutationen nicht möglich ist, wurde die Klonalität der Erkrankungen untersucht. Poly- oder Oligoklonalität deuten darauf hin, dass mehrere Zellklone an der Entstehung der Erkrankung beteiligt waren. Somit ist die Wahrscheinlichkeit sekundärer, für die Erzeugung der Erkrankung zusätzlich notwendiger Mutationen geringer als bei Monoklonalität. Ist nur ein Klon beteiligt, spricht das für eine sekundäre Mutation, durch die der Klon vollständig transformiert wurde und somit als alleinige maligne Stammzelle fungierte. Sowohl das FLT3 D838Y-induzierte T-Zell-Lymphom als auch die durch das selbe Onkogen hervorgerufene B-ALL erwiesen sich als oligoklonale Erkrankungen. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Kelly *et al.*, 2002b), war auch die

FLT3-ITD induzierte myeloproliferative Erkrankung oligoklonalen Ursprungs. Durch die Oligoklonalität der FLT3 D838Y-induzierten Erkrankung ist jedoch die Möglichkeit sekundärer Mutationen nicht vollständig ausgeschlossen. Retroviren integrieren an zufälligen Lokalisationen in das Zellgenom. Eine Induktion genetischer Alterationen in den Knochenmarkszellen ist direkt nach der retroviralen Transduktion möglich (retrovirale Insertionsmutagenese). Da die retrovirale Integration zu veränderter Genexpression führen kann, ist eine Beeinflussung des Phänotyps durch kooperierende Onkogene denkbar. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass durch FLT3 D838Y-Expression in allen Mäusen eine Erkrankung hervorgerufen wurde. Wären zur Induktion dieser Erkrankung sekundäre Mutationen notwendig, würde sich das in einer geringeren Penetranz der Erkrankung widerspiegeln.

Sowohl bei FLT3-ITD als auch bei FLT3 D838Y konnte eine direkte Korrelation zwischen transplantierte Zellzahl und Latenzzeit der Erkrankung festgestellt werden. Die Transplantation einer geringeren Anzahl FLT3-positiver Knochenmarkszellen hatte bei beiden Mutanten eine Verlängerung der Latenzzeit zur Folge. Außerdem wurde eine signifikant längere Latenzzeit bei der Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung durch FLT3-ITD beobachtet, wenn im Knochenmark FLT3-ITD nur schwach exprimiert wurde. Interessanterweise entwickelten Mäuse, die mit einer geringen Anzahl schwach FLT3-ITD exprimierender Zellen transplantiert wurden, weder eine myeloproliferative noch eine lymphatische Erkrankung. Diese Ergebnisse weisen auf eine zweifache Dosis-Wirkungsbeziehung hin. Zum Einen scheint die Proteinexpressionsstärke eine wichtige Rolle bei der Induktion der Erkrankung zu spielen, da durch schwache Expression des FLT3-ITD Proteins die Latenz der myeloproliferativen Erkrankung signifikant verlängert war. Das ist insofern wichtig, als eine längere Latenz nicht unbedingt die Notwendigkeit sekundärer Mutationen einschließt. Zum Anderen lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass sich im Knochenmark nur eine limitierte Anzahl potentieller Leukämie-auslösender Zellen befindet, welche durch den Retrovirus infiziert werden müssen, um eine hämatologische Neoplasie auszulösen. Dies würde auch erklären, warum Mäuse, die mit einer geringen Anzahl infizierter Zellen transplantiert wurden, keine maligne Erkrankung entwickelten.

Der durch die FLT3 TKD-Mutanten induzierte lymphatische Phänotyp sowie die längere Latenzzeit bis zum Auftreten dieser Erkrankungen weisen auf Unterschiede bei der Aktivierung von Signalkaskaden durch FLT3-ITD und die FLT3 TKD-Mutanten hin. Dafür sprechen auch Studien, die für FLT3 TKD-Mutanten im Gegensatz zu FLT3-ITD keinen Einfluss auf die klinische Prognose von AML-Patienten zeigen (Frohling *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003; Thiede *et al.*, 2003). Einen Hinweis auf Unterschiede in der

STAT5-Aktivierung durch verschiedene FLT3-Mutanten gaben bereits die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit (siehe auch Kapitel 4.1). Die Untersuchung der durch FLT3 aktivierten Signalmoleküle (Hayakawa *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Stirewalt und Radich, 2003) in murinen Knochenmarkzellen zeigte ebenfalls eine wesentlich stärkere Aktivierung von STAT5 durch FLT3-ITD als durch die TKD-Mutanten. Die Vermutung liegt daher nahe, dass eine starke Aktivierung von STAT5 eine maßgebliche Rolle bei der Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung durch FLT3-ITD spielt. Auch wenn zellkontextspezifische Unterschiede in den durch FLT3 aktivierten Signalwegen nicht ausgeschlossen werden können, weisen diese Daten auf die Bedeutsamkeit des STAT5-Signalwegs bei der Entwicklung verschiedener Phänotypen hin.

Das transformierende Potential der verschiedenen FLT3-Mutanten scheint außerdem vom Zellkontext abhängig zu sein. Obwohl es in TKD-Mäusen zur Expansion FLT3-positiver myeloischer Zellen kam, entwickelten diese Mäuse keine myeloproliferative Erkrankung. In FLT3-ITD Mäusen wurden auch bei geringer initialer Tumorlast keine lymphatischen Erkrankungen beobachtet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die TKD-Mutanten in der Maus nur lymphatische Zellen vollständig transformieren, während FLT3-ITD sein onkogenes Potential in myeloiden Zellen voll entfaltet. Diese Hypothese wird durch Studien unterstützt, die zeigen, dass FLT3-ITD wesentlich häufiger in akut myeloischen Leukämien (AML) (Yokota *et al.*, 1997; Thiede *et al.*, 2002; Kottaridis *et al.*, 2003) als in akut lymphatischen Leukämien (ALL) (Nakao *et al.*, 1996; Yokota *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Brown und Small, 2004) nachgewiesen werden kann, die FLT3 TKD-Mutanten dagegen häufiger bei ALL auftreten (Armstrong *et al.*, 2004; Taketani *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die aberrante Aktivierung von Signalkaskaden durch FLT3 TKD-Mutanten möglicherweise zur Pathogenese der ALL und anderer lymphatischer Erkrankungen beiträgt. Deshalb ist das beschriebene Mausmodell ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der molekularen Pathogenese FLT3-positiver lymphatischer Neoplasien. Des Weiteren ist dieses Modell zur Untersuchung von therapeutischen Maßnahmen, insbesondere von neu entwickelten spezifischen Kinaseinhibitoren für die Behandlung solcher Erkrankungen geeignet.

5 Zusammenfassung

Aktivierende Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase FLT3 stellen die häufigste genetische Alteration bei der akut myeloischen Leukämie (AML) dar. Sowohl ITD-Mutationen (*internal tandem duplications*) der juxtamembranären Domäne, als auch Punktmutationen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne (TKD) von FLT3 führen zur konstitutiven, Liganden unabhängigen Aktivierung des Rezeptors. Die deregulierte Kinaseaktivität des mutierten FLT3-Rezeptors hat eine konstitutive Aktivierung promotogener Signalkaskaden zur Folge. Das onkogene Potential der FLT3-Mutanten zeigt sich in deren Fähigkeit, myeloide und lymphatische Zellen zu transformieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das onkogene Potential der vor kurzem in AML-Patienten nachgewiesenen FLT3 TKD-Mutanten FLT3 I836del und FLT3 I836M+R untersucht. Sowohl nach Überexpression in Phoenix E-Zellen als auch bei stabiler Expression in hämatopoetischen Zelllinien (Ba/F3; 32D) lagen beide FLT3 TKD-Mutanten konstitutiv phosphoryliert vor. Die Kinaseaktivität beider Mutanten führte zur Aktivierung der promotogenen Signalmoleküle AKT, ERK1/2 und STAT5. Die biologische Relevanz der untersuchten FLT3-Mutanten konnte durch den Nachweis der transformierenden Eigenschaften bestätigt werden. Beide Mutanten waren in der Lage sowohl lymphatische (Ba/F3) als auch myeloische (32D) Zellen zur Faktorunabhängigkeit zu transformieren.

Des Weiteren wurde die Sensitivität von FLT3-ITD, FLT3 D835Y, FLT3 I836del und FLT3 I836M+R gegenüber selektiven FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren untersucht. Hierbei erwies sich die Empfindlichkeit der verschiedenen FLT3-Mutanten als stark abhängig von der Art der Mutation im FLT3-Rezeptor. Für den Einsatz selektiver FLT3-Kinaseinhibitoren bei klinischen Studien ist dies von großer Bedeutung. Eine Identifikation der Mutation im FLT3-Rezeptor und die exakte Bestimmung dessen Sensitivität gegenüber dem jeweiligen Inhibitor sollte der Behandlung von Patienten mit Tyrosinkinaseinhibitoren vorangehen.

Die klinische Prognose für AML-Patienten mit einer ITD-Mutation des FLT3-Rezeptors ist signifikant schlechter als für Patienten, die diesen genetischen Defekt nicht tragen. Der zusätzliche Verlust des FLT3 Wildtyp-Allels hat eine weitere Verschlechterung der Prognose zur Folge. Basierend auf diesen Daten wurde ein Zellmodell erstellt, das den „heterozygoten“ FLT3^{ITD/WT}- und den „hemizygoten“ FLT3^{ITD/-}-Genotyp imitiert. Die funktionelle Charakterisierung dieser Zellen ergab, dass die Proliferation „heterozygoter“ FLT3^{ITD/WT}-Zellen noch teilweise durch den FLT3-Liganden reguliert ist, während in „hemizygoten“ FLT3^{ITD/-}-Zellen keine Veränderung der proliferativen Aktivität durch den FLT3-Liganden beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse klinischer Studien weisen auf unterschiedliche Eigenschaften von FLT3-ITD und den TKD-Mutanten in hämatologischen Neoplasien hin. Zum Einen scheinen

Tyrosinkinasedomäne-Mutationen im FLT3-Rezeptor im Gegensatz zu FLT3-ITD keinen Einfluss auf die klinische Prognose von AML-Patienten zu haben. Zum Anderen können FLT3 TKD Mutationen häufig bei Kindern mit MLL, einer Form der akut lymphatischen Leukämie (ALL), und hyperdiploider ALL sowie bei Patienten mit T-Zell-Leukämie nachgewiesen werden. Dagegen wird FLT3-ITD in lymphatischen Leukämien nur selten detektiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese potentiell unterschiedlichen Eigenschaften von FLT3-ITD und FLT3 TKD-Mutanten in einem murinen Knochenmarkstransplantationsmodell untersucht. Interessanterweise spiegelt sich in den Ergebnissen das in Patienten beobachtete Bild wider: Die Expression der FLT3 TKD-Mutanten in murinen Knochenmarkszellen führte zu lymphatischen Erkrankungen, während FLT3-ITD in Analogie zu den bereits publizierten Daten eine myeloproliferative Erkrankung hervorrief. Der Phänotyp der Erkrankungen wurde hierbei weder durch die transplantierte Zellzahl noch durch die FLT3-Proteinexpressionsstärke beeinflusst. Als mögliche molekulare Ursache für die Induktion unterschiedlicher Phänotypen wurde eine stärkere Aktivierung der STAT5-Signalkaskade durch FLT3-ITD im Vergleich zu den TKD-Mutanten nachgewiesen. Die Untersuchungen im Mausmodell weisen darauf hin, dass die aberrante Aktivierung von Signalkaskaden durch FLT3 TKD-Mutanten möglicherweise zur Pathogenese der ALL und anderer lymphatischer Erkrankungen beiträgt. Deshalb ist das beschriebene Tiermodell ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der molekularen Pathogenese FLT3-positiver lymphatischer Neoplasien. Des Weiteren ist dieses Modell zur Untersuchung von therapeutischen Maßnahmen, insbesondere von neu entwickelten spezifischen Kinaseinhibitoren für die Behandlung solcher Erkrankungen geeignet.

6 Literaturverzeichnis

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.

Agnes, F., Shamoon, B., Dina, C., Rosnet, O., Birnbaum, D. und Galibert, F. (1994). "Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III." *Gene* 145(2): 283-8.

Arcasoy, S. M., Latoche, J. D., Gondor, M., Pitt, B. R. und Pilewski, J. M. (1997). "Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro." *Gene Ther* 4(1): 32-8.

Armstrong, S. A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., Sallan, S. E., Lander, E. S., Golub, T. R. und Korsmeyer, S. J. (2002). "MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia." *Nat Genet* 30(1): 41-7.

Armstrong, S. A., Mabon, M. E., Silverman, L. B., Li, A., Gribben, J. G., Fox, E. A., Sallan, S. E. und Korsmeyer, S. J. (2004). "FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia." *Blood* 103(9): 3544-6.

Bagrintseva, K., Geisenhof, S., Kern, R., Eichenlaub, S., Reindl, C., Ellwart, J. W., Hiddemann, W. und Spiekermann, K. (2004). "FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with Acute Myeloid Leukemia (AML) confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L)." *Blood* First Edition Paper, prepublished online December 30, 2004.

Barnard, E. A. (1992). "Receptor classes and the transmitter-gated ion channels." *Trends Biochem Sci* 17(10): 368-74.

Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H. und Wetzler, M. (2003). "Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias." *Blood* 101(8): 2940-54.

Birg, F., Courcoul, M., Rosnet, O., Bardin, F., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tabilio, A., Mannoni, P. und Birnbaum, D. (1992). "Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages." *Blood* 80(10): 2584-93.

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

Brown, P. und Small, D. (2004). "FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer." *Eur J Cancer* 40(5): 707-21, discussion 722-4.

Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. und Soltoff, S. (1991). "Oncogenes and signal transduction." *Cell* 64(2): 281-302.

- 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/FIk2) in human leukemias." *Blood* 87(3): 1089-96.
- Chaturvedi, P., Reddy, M. V. und Reddy, E. P. (1998). "Src kinases and not JAKs activate STATs during IL-3 induced myeloid cell proliferation." *Oncogene* 16(13): 1749-58.
- Chin, H., Arai, A., Wakao, H., Kamiyama, R., Miyasaka, N. und Miura, O. (1998). "Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway." *Blood* 91(10): 3734-45.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Coffman, R. L. (1982). "Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development." *Immunol Rev* 69: 5-23.
- Cohen, G. B., Ren, R. und Baltimore, D. (1995). "Modular binding domains in signal transduction proteins." *Cell* 80(2): 237-48.
- Conti, C., Mastromarino, P., Riccioli, A. und Orsi, N. (1991). "Electrostatic interactions in the early events of VSV infection." *Res Virol* 142(1): 17-24.
- Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Fabbro, D., Clark, J. J., Griffin, J. D., Marynen, P. und Gilliland, D. G. (2004). "Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia." *Cancer Res* 64(18): 6385-9.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. und Stark, G. R. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science* 264(5164): 1415-21.
- DaSilva, N., Hu, Z. B., Ma, W., Rosnet, O., Birnbaum, D. und Drexler, H. G. (1994). "Expression of the FLT3 gene in human leukemia-lymphoma cell lines." *Leukemia* 8(5): 885-8.
- Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M. und Fitch, F. W. (1983). "Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule." *J Immunol* 131(5): 2445-51.
- Drexler, H. G. (1996). "Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells." *Leukemia* 10(4): 588-99.
- 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.
- Fenaux, P. (2001). "Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes." *Int J Hematol* 73(4): 429-37.

- 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.
- Fleming, T. J., Fleming, M. L. und Malek, T. R. (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." *J Immunol* 151(5): 2399-408.
- Fowlkes, B. J. und Pardoll, D. M. (1989). "Molecular and cellular events of T cell development." *Adv Immunol* 44: 207-64.
- Frohling, S., Schlenk, R. F., Breitnick, 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.
- Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J. H., Ashman, L. K., Kanayama, Y. und et, a. I. (1993). "Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product." *J Clin Invest* 92(4): 1736-44.
- Gabbianelli, M., Pelosi, E., Montesoro, E., Valtieri, M., Luchetti, L., Samoggia, P., Vitelli, L., Barberi, T., Testa, U., Lyman, S. und et, a. I. (1995). "Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors." *Blood* 86(5): 1661-70.
- Gilliland, D. G. und Griffin, J. D. (2002). "The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia." *Blood* 100(5): 1532-42.
- Griffin, J. D. (2001). "Point mutations in the FLT3 gene in AML." *Blood* 97(8): 2193A-2193.
- 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.
- Gupta, R., Knight, C. L. und Bain, B. J. (2002). "Receptor tyrosine kinase mutations in myeloid neoplasms." *Br J Haematol* 117(3): 489-508.
- 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.
- Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S., Bazan, J. F., Kastelein, R., Hudak, S., Wagner, J., Mattson, J. und et, a. I. (1994). "Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs." *Nature* 368(6472): 643-8.
- Hathcock, K. S., Hirano, H., Murakami, S. und Hodes, R. J. (1992). "CD45 expression by B cells. Expression of different CD45 isoforms by subpopulations of activated B cells." *J Immunol* 149(7): 2286-94.

- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H. und Naoe, T. (2000). "Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines." *Oncogene* 19(5): 624-31.
- Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C. J., Joseph, N., Singer, S., Griffith, D. J., Haley, A., Town, A., Demetri, G. D., Fletcher, C. D. und Fletcher, J. A. (2003). "PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors." *Science* 299(5607): 708-10.
- Heldin, C. H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." *Cell* 80(2): 213-23.
- Hjertson, M., Sundstrom, C., Lyman, S. D., Nilsson, K. und Nilsson, G. (1996). "Stem cell factor, but not flt3 ligand, induces differentiation and activation of human mast cells." *Exp Hematol* 24(6): 748-54.
- 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.
- Hunter, T. (1991). "Protein kinase classification." *Methods Enzymol* 200: 3-37.
- Hunter, T. (1997). "Oncoprotein networks." *Cell* 88(3): 333-46.
- Hunter, T. (2000). "Signaling--2000 and beyond." *Cell* 100(1): 113-27.
- Huse, M. und Kuriyan, J. (2002). "The conformational plasticity of protein kinases." *Cell* 109(3): 275-82.
- Ihle, J. N. (1995). "Cytokine receptor signalling." *Nature* 377(6550): 591-4.
- Irusta, P. M., Luo, Y., Bakht, O., Lai, C. C., Smith, S. O. und DiMaio, D. (2002). "Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor." *J Biol Chem* 277(41): 38627-34.
- Ishii, E., Zaitso, M., Ihara, K., Hara, T. und Miyazaki, S. (1999). "High expression but no internal tandem duplication of FLT3 in normal hematopoietic cells." *Pediatr Hematol Oncol* 16(5): 437-41.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation." *Annu Rev Immunol* 10: 645-74.
- Jiang, J., Paez, J. G., Lee, J. C., Bo, R., Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Galinsky, I., Wolpin, B. M., Jonasova, A., Herman, P., Fox, E. A., Boggon, T. J., Eck, M. J., Weisberg, E., Griffin, J. D., Gilliland, D. G., Meyerson, M. und Sellers, W. R. (2004). "Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML." *Blood* 104(6): 1855-8.
- Jordan, J. D., Landau, E. M. und Iyengar, R. (2000). "Signaling networks: the origins of cellular multitasking." *Cell* 103(2): 193-200.

Karin, M. (1992). "Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease." *Faseb J* 6(8): 2581-90.

Kelly, L. M., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., Amaral, S. M., Curley, D. P., Ley, T. J. und Gilliland, D. G. (2002a). "PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 8283-8.

Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L. und Gilliland, D. G. (2002b). "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.

Kelly, L. M., Yu, J. C., Boulton, C. L., Apatira, M., Li, J., Sullivan, C. M., Williams, I., Amaral, S. M., Curley, D. P., Duclos, N., Neuberg, D., Scarborough, R. M., Pandey, A., Hollenbach, S., Abe, K., Lokker, N. A., Gilliland, D. G. und Giese, N. A. (2002c). "CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML)." *Cancer Cell* 1(5): 421-32.

Killeen, N., Irving, B. A., Pippig, S. und Zingler, K. (1998). "Signaling checkpoints during the development of T lymphocytes." *Curr Opin Immunol* 10(3): 360-7.

Kindler, T., Breitenbuecher, F., Kasper, S., Estey, E., Giles, F., Feldman, E., Ehninger, G., Schiller, G., Klimek, V., Nimer, S. D., Gratwohl, A., Choudhary, C. R., Mueller-Tidow, C., Serve, H., Gschaidmeier, H., Cohen, P. S., Huber, C. und Fischer, T. (2005). "Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML)." *Blood* 105(1): 335-40.

Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., Takeshita, A., Saito, K., Hasegawa, S., Shimodaira, S., Tamura, J., Shimazaki, C., Matsue, K., Kobayashi, H., Arima, N., Suzuki, R., Morishita, H., Saito, H., Ueda, R. und Ohno, R. (1997). "Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho)." *Leukemia* 11(9): 1447-52.

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.

Kiyoi, H., Naoe, T., Nakano, Y., Yokota, S., Minami, S., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Jinnai, I., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Oh, H., Motoji, T., Omoto, E., Saito, H., Ohno, R. und Ueda, R. (1999). "Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia." *Blood* 93(9): 3074-80.

Kiyoi, H., Ohno, R., Ueda, R., Saito, H. und Naoe, T. (2002). "Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain." *Oncogene* 21(16): 2555-63.

Klejman, A., Schreiner, S. J., Nieborowska-Skorska, M., Slupianek, A., Wilson, M., Smithgall, T. E. und Skorski, T. (2002). "The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells." *Embo J* 21(21): 5766-74.

- 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.
- Kottaridis, P. D., Gale, R. E. und Linch, D. C. (2003). "Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia." *Leuk Lymphoma* 44(6): 905-13.
- Kovalenko, M., Gazit, A., Bohmer, A., Rorsman, C., Ronnstrand, L., Heldin, C. H., Waltenerger, J., Bohmer, F. D. und Levitzki, A. (1994). "Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation." *Cancer Res* 54(23): 6106-14.
- Kovalenko, M., Ronnstrand, L., Heldin, C. H., Loubtchenkov, M., Gazit, A., Levitzki, A. und Bohmer, F. D. (1997). "Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor beta-receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrphostin AG1296." *Biochemistry* 36(21): 6260-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Lagasse, E. und Weissman, I. L. (1996). "Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes." *J Immunol Methods* 197(1-2): 139-50.
- Ledbetter, J. A., Rouse, R. V., Micklem, H. S. und Herzenberg, L. A. (1980). "T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views." *J Exp Med* 152(2): 280-95.
- Leenen, P. J., de Bruijn, M. F., Voerman, J. S., Campbell, P. A. und van Ewijk, W. (1994). "Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies." *J Immunol Methods* 174(1-2): 5-19.
- Lemmon, M. A. und Schlessinger, J. (1994). "Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization." *Trends Biochem Sci* 19(11): 459-63.
- Levis, M., Tse, K. F., Smith, B. D., Garrett, E. und Small, D. (2001). "A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations." *Blood* 98(3): 885-7.
- 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.
- Li, S., Ilaria, R. L., Jr., Million, R. P., Daley, G. Q. und Van Etten, R. A. (1999). "The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity." *J Exp Med* 189(9): 1399-412.

- Liao, A. T., Chien, M. B., Shenoy, N., Mendel, D. B., McMahon, G., Cherrington, J. M. und London, C. A. (2002). "Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors." *Blood* 100(2): 585-93.
- Lin, J. X., Mietz, J., Modi, W. S., John, S. und Leonard, W. J. (1996). "Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells." *J Biol Chem* 271(18): 10738-44.
- Longley, B. J., Reguera, M. J. und Ma, Y. (2001). "Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy." *Leuk Res* 25(7): 571-6.
- 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.
- Lux, M. L., Rubin, B. P., Biase, T. L., Chen, C. J., Maclure, T., Demetri, G., Xiao, S., Singer, S., Fletcher, C. D. und Fletcher, J. A. (2000). "KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors." *Am J Pathol* 156(3): 791-5.
- Lyman, S. D., James, L., Zappone, J., Sleath, P. R., Beckmann, M. P. und Bird, T. (1993). "Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor- like tyrosine kinase gene." *Oncogene* 8(4): 815-22.
- Ma, Y., Carter, E., Wang, X., Shu, C., McMahon, G. und Longley, B. J. (2000). "Indolinone derivatives inhibit constitutively activated KIT mutants and kill neoplastic mast cells." *J Invest Dermatol* 114(2): 392-4.
- Ma, Y., Zeng, S., Metcalfe, D. D., Akin, C., Dimitrijevic, S., Butterfield, J. H., McMahon, G. und Longley, B. J. (2002). "The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations." *Blood* 99(5): 1741-4.
- Mackarechtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P. und Lemischka, I. R. (1995). "Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors." *Immunity* 3(1): 147-61.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. und Sudarsanam, S. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* 298(5600): 1912-34.
- Margolis, B. (1999). "The PTB Domain: The Name Doesn't Say It All." *Trends Endocrinol Metab* 10(7): 262-267.
- Maroc, N., Rottapel, R., Rosnet, O., Marchetto, S., Lavezzi, C., Mannoni, P., Birnbaum, D. und Dubreuil, P. (1993). "Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase." *Oncogene* 8(4): 909-18.
- Matthews, W., Jordan, C. T., Wiegand, G. W., Pardoll, D. und Lemischka, I. R. (1991). "A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations." *Cell* 65(7): 1143-52.

- Meierhoff, G., Dehmel, U., Gruss, H. J., Rosnet, O., Birnbaum, D., Quentmeier, H., Dirks, W. und Drexler, H. G. (1995). "Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines." *Leukemia* 9(8): 1368-72.
- Meshinchi, S., Woods, W. G., Stirewalt, D. L., Sweetser, D. A., Buckley, J. D., Tjoa, T. K., Bernstein, I. D. und Radich, J. P. (2001). "Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia." *Blood* 97(1): 89-94.
- 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., Matsumura, I., Schmidt, R., Muller, C., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., Buchner, T., Kienast, J., Kanakura, Y., Berdel, W. E. und Serve, H. (2000). "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways." *Blood* 96(12): 3907-14.
- Moore, T. A. und Zlotnik, A. (1997). "Differential effects of Flk-2/Flt-3 ligand and stem cell factor on murine thymic progenitor cells." *J Immunol* 158(9): 4187-92.
- 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.
- Morley, G. M., Uden, M., Gullick, W. J. und Dibb, N. J. (1999). "Cell specific transformation by c-fms activating loop mutations is attributable to constitutive receptor degradation." *Oncogene* 18(20): 3076-84.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Murata, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Tamitsu, K., Irie, M., Nakajima, H., Suzu, S., Shibuya, M., Kamihira, S., Nosaka, T., Asano, S. und Kitamura, T. (2003). "Selective cytotoxic mechanism of GTP-14564, a novel tyrosine kinase inhibitor in leukemia cells expressing a constitutively active Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)." *J Biol Chem* 278(35): 32892-8.
- Nagata, H., Worobec, A. S., Oh, C. K., Chowdhury, B. A., Tannenbaum, S., Suzuki, Y. und Metcalfe, D. D. (1995). "Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23): 10560-4.
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T. und Misawa, S. (1996). "Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia." *Leukemia* 10(12): 1911-8.

- Namikawa, R., Muench, M. O., de Vries, J. E. und Roncarolo, M. G. (1996). "The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin-7 in promoting stromal- cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells in vitro." *Blood* 87(5): 1881-90.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P. H. (1982). "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields." *Embo J* 1(7): 841-5.
- Ning, Z. Q., Li, J. und Arceci, R. J. (2001). "Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells." *Blood* 97(11): 3559-67.
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A. L. und Kitamura, T. (1999). "STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells." *Embo J* 18(17): 4754-65.
- Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M. und Hynes, N. E. (1999). "ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases." *J Biol Chem* 274(24): 17209-18.
- Paietta, E., Ferrando, A. A., Neuberg, D., Bennett, J. M., Racevskis, J., Lazarus, H., Dewald, G., Rowe, J. M., Wiernik, P. H., Tallman, M. S. und Look, A. T. (2004). "Activating FLT3 Mutations in CD117/KIT Positive T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemias." *Blood* 104(2): 558-560.
- Paukku, K., Valgeirsdottir, S., Saharinen, P., Bergman, M., Heldin, C. H. und Silvennoinen, O. (2000). "Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 is mediated by PDGF beta-receptor and is not dependent on c-src, fyn, jak1 or jak2 kinases." *Biochem J* 345 Pt 3: 759-66.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." *Nature* 373(6515): 573-80.
- Pawson, T. und Nash, P. (2000). "Protein-protein interactions define specificity in signal transduction." *Genes Dev* 14(9): 1027-47.
- 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.
- Piao, X. und Bernstein, A. (1996). "A point mutation in the catalytic domain of c-kit induces growth factor independence, tumorigenicity, and differentiation of mast cells." *Blood* 87(8): 3117-23.
- Pignon, J. M., Giraudier, S., Duquesnoy, P., Jouault, H., Imbert, M., Vainchenker, W., Vernant, J. P. und Tulliez, M. (1997). "A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease." *Br J Haematol* 96(2): 374-6.
- Potter, H. (1988). "Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation." *Anal Biochem* 174(2): 361-73.

- Quentmeier, H., Reinhardt, J., Zaborski, M. und Drexler, H. G. (2003). "FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines." *Leukemia* 17(1): 120-4.
- Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., Ford, J., Kregenow, R., Marlicz, W. und Gewirtz, A. M. (1996). "FLT3/FLK-2 (STK-1) Ligand does not stimulate human megakaryopoiesis in vitro." *Stem Cells* 14(1): 146-50.
- Ray, R. J., Paige, C. J., Furlonger, C., Lyman, S. D. und Rottapel, R. (1996). "Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7." *Eur J Immunol* 26(7): 1504-10.
- Reilly, J. T. (2003). "Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis." *Blood Rev* 17(4): 241-8.
- Rieger, P. T. (2004). "The biology of cancer genetics." *Semin Oncol Nurs* 20(3): 145-54.
- Robertson, S. C., Tynan, J. und Donoghue, D. J. (2000). "RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad." *Trends Genet* 16(8): 368.
- Robinson, D. R., Wu, Y. M. und Lin, S. F. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome." *Oncogene* 19(49): 5548-57.
- Rodrigues, G. A. und Park, M. (1994). "Oncogenic activation of tyrosine kinases." *Curr Opin Genet Dev* 4(1): 15-24.
- Rodriguez-Tarduchy, G., Collins, M. und Lopez-Rivas, A. (1990). "Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores." *Embo J* 9(9): 2997-3002.
- Rombouts, W. J., Blokland, I., Lowenberg, B. und Ploemacher, R. E. (2000). "Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene." *Leukemia* 14(4): 675-83.
- Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O. und Birnbaum, D. (1991a). "Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family." *Oncogene* 6(9): 1641-50.
- Rosnet, O., Mattei, M. G., Marchetto, S. und Birnbaum, D. (1991b). "Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene." *Genomics* 9(2): 380-5.
- Rosnet, O. und Birnbaum, D. (1993). "Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases." *Crit Rev Oncog* 4(6): 595-613.
- Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tonnelle, C., Toiron, Y., Birg, F. und Birnbaum, D. (1993a). "Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells." *Blood* 82(4): 1110-9.
- Rosnet, O., Stephenson, D., Mattei, M. G., Marchetto, S., Shibuya, M., Chapman, V. M. und Birnbaum, D. (1993b). "Close physical linkage of the FLT1 and FLT3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse." *Oncogene* 8(1): 173-9.

- Rosnet, O., Buhring, H. J., Marchetto, S., Rappold, I., Lavagna, C., Sainty, D., Arnoulet, C., Chabannon, C., Kanz, L., Hannum, C. und Birnbaum, D. (1996). "Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells." *Leukemia* 10(2): 238-48.
- Roussel, M. F., Downing, J. R., Rettenmier, C. W. und Sherr, C. J. (1988). "A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential." *Cell* 55(6): 979-88.
- Rusten, L. S., Lyman, S. D., Veiby, O. P. und Jacobsen, S. E. (1996). "The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro." *Blood* 87(4): 1317-25.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* 103(2): 211-25.
- 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.
- Schwaller, J., Frantsve, J., Aster, J., Williams, I. R., Tomasson, M. H., Ross, T. S., Peeters, P., Van Rompaey, L., Van Etten, R. A., Ilaria, R., Jr., Marynen, P. und Gilliland, D. G. (1998). "Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes." *Embo J* 17(18): 5321-33.
- Shah, A. J., Smogorzewska, E. M., Hannum, C. und Crooks, G. M. (1996). "Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro." *Blood* 87(9): 3563-70.
- Shah, N., Nicoll, J., Nagar, B., Gorre, M., Paquette, R., Kuriyan, J. und Sawyers, C. (2002). "Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia." *Cancer Cell* 2(2): 117.
- 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 Fold Des* 8(11): 1105-13.
- Small, D., Levenstein, M., Kim, E., Carow, C., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Burrow, C., Ratajczak, M. Z., Gewirtz, A. M. und et al. (1994). "STK-1, the human homolog of Fik-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 459-63.
- Smith, B. D., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K. M., Dausen, 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.

Smith, M. L., Arch, R., Smith, L. L., Bainton, N., Neat, M., Taylor, C., Bonnet, D., Cavenagh, J. D., Andrew Lister, T. und Fitzgibbon, J. (2005). "Development of a human acute myeloid leukaemia screening panel and consequent identification of novel gene mutation in FLT3 and CCND3." *Br J Haematol* 128(3): 318-23.

Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J. und et al. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." *Cell* 72(5): 767-78.

Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* 98(3): 503-17.

Spain, L. M. und Mulligan, R. C. (1992). "Purification and characterization of retrovirally transduced hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9): 3790-4.

Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schoch, C., Haferlach, T., Hiddemann, W. und Schnittger, S. (2002a). "A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia." *Blood* 100(9): 3423-5.

Spiekermann, K., Faber, F., Voswinckel, R. und Hiddemann, W. (2002b). "The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells." *Exp Hematol* 30(7): 767-73.

Spiekermann, K., Pau, M., Schwab, R., Schmieja, K., Franzrahe, S. und Hiddemann, W. (2002c). "Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells." *Exp Hematol* 30(3): 262-71.

Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K. und Hiddemann, W. (2003a). "Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells." *Clin Cancer Res* 9(6): 2140-50.

Spiekermann, K., Dirschinger, R. J., Schwab, R., Bagrintseva, K., Faber, F., Buske, C., Schnittger, S., Kelly, L. M., Gilliland, D. G. und Hiddemann, W. (2003b). "The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3." *Blood* 101(4): 1494-504.

Springer, T., Galfre, G., Secher, D. S. und Milstein, C. (1979). "Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody." *Eur J Immunol* 9(4): 301-6.

Sternberg, D. W., Tomasson, M. H., Carroll, M., Curley, D. P., Barker, G., Caprio, M., Wilbanks, A., Kazlauskas, A. und Gilliland, D. G. (2001). "The TEL/PDGFBetaR fusion in chronic myelomonocytic leukemia signals through STAT5-dependent and STAT5-independent pathways." *Blood* 98(12): 3390-7.

Stirewalt, D. L. und Radich, J. P. (2003). "The role of FLT3 in haematopoietic malignancies." *Nat Rev Cancer* 3(9): 650-65.

- Stone, R. M., Deangelo, D. J., Klimek, V., Galinsky, I., Estey, E., Nimer, S. D., Grandin, W., Lebwohl, D., Wang, Y., Cohen, P., Fox, E. A., Neuberg, D., Clark, J., Gilliland, D. G. und Griffin, J. D. (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.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. und Dixon, R. A. (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." *Annu Rev Biochem* 63: 101-32.
- Sukharev, S. I., Titomirov, A. V. und Klenchin, V. A. (1994). Electrically-induced DNA transfer into cells. Electrotransfectin in vivo. *Gene Therapeutics. Methods and Applications of Direct Gene Transfer*. J. A. Wolff. Boston, Birkhäuser: 210-232.
- Sun, L., Tran, N., Tang, F., App, H., Hirth, P., McMahon, G. und Tang, C. (1998). "Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases." *J Med Chem* 41(14): 2588-603.
- Taketani, T., Taki, T., Sugita, K., Furuichi, Y., Ishii, E., Hanada, R., Tsuchida, M., Ida, K. und Hayashi, Y. (2004). "FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy." *Blood* 103(3): 1085-8.
- 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.
- Thiede, C., Schnittger, S., Kern, W., Haferlach, T., Steudel, C., Schoch, C., Illmer, T., Schaich, M., Büchner, T., Hiddemann, W. und Ehninger, G. (2003). "Point Mutations of the FLT3-Receptor Tyrosine Kinase in Patients with Acute Myeloid Leukemia- Results of an Intergroup Analysis of the AML CG Study and the AML96 Study of the SHG." *Blood* 102(11): 606a.
- Tomasson, M. H., Sternberg, D. W., Williams, I. R., Carroll, M., Cain, D., Aster, J. C., Ilaria, R. L., Jr., Van Etten, R. A. und Gilliland, D. G. (2000). "Fatal myeloproliferation, induced in mice by TEL/PDGFBetaR expression, depends on PDGFBetaR tyrosines 579/581." *J Clin Invest* 105(4): 423-32.
- Tse, K. F., Novelli, E., Civin, C. I., Bohmer, F. D. und Small, D. (2001). "Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor." *Leukemia* 15(7): 1001-10.
- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." *Cell* 61(2): 203-12.
- Veiby, O. P., Lyman, S. D. und Jacobsen, S. E. (1996). "Combined signaling through interleukin-7 receptors and flt3 but not c- kit potently and selectively promotes B-cell commitment and differentiation from uncommitted murine bone marrow progenitor cells." *Blood* 88(4): 1256-65.

- von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C. und Duyster, J. (2002). "BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study." *Lancet* 359(9305): 487-91.
- Wadleigh, M., DeAngelo, D. J., Griffin, J. D. und Stone, R. M. (2005). "After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies." *Blood* 105(1): 22-30.
- Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A. und Kabat, D. (1991). "Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter." *Nature* 352(6337): 729-31.
- 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.
- Whitman, S. P., Archer, K. J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B. D., Carroll, A. J., Mrozek, K., Vardiman, J. W., George, S. L., Kolitz, J. E., Larson, R. A., Bloomfield, C. D. und Caligiuri, M. A. (2001). "Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study." *Cancer Res* 61(19): 7233-9.
- Wu, L., Scollay, R., Egerton, M., Pearse, M., Spangrude, G. J. und Shortman, K. (1991). "CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus." *Nature* 349(6304): 71-4.
- Wybenga-Groot, L. E., Baskin, B., Ong, S. H., Tong, J., Pawson, T. und Sicheri, F. (2001). "Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region." *Cell* 106(6): 745-57.
- Xu, F., Taki, T., Yang, H. W., Hanada, R., Hongo, T., Ohnishi, H., Kobayashi, M., Bessho, F., Yanagisawa, M. und Hayashi, Y. (1999). "Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children." *Br J Haematol* 105(1): 155-62.
- Xu, F., Taki, T., Eguchi, M., Kamada, N., Ishii, E., Endo, M. und Hayashi, Y. (2000). "Tandem duplication of the FLT3 gene is infrequent in infant acute leukemia. Japan Infant Leukemia Study Group." *Leukemia* 14(5): 945-7.
- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R. und Naoe, T. (2001). "Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies." *Blood* 97(8): 2434-9.

Yasutomo, K., Doyle, C., Miele, L., Fuchs, C. und Germain, R. N. (2000). "The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate." *Nature* 404(6777): 506-10.

Yee, K. W., O'Farrell, A. M., Smolich, B. D., Cherrington, J. M., McMahon, G., Wait, C. L., McGreevey, L. S., Griffith, D. J. und Heinrich, M. C. (2002). "SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase." *Blood* 100(8): 2941-9.

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., Fukuda, S., Lee, Y., Hangoc, G., Cooper, S., Spolski, R., Leonard, W. J. und Broxmeyer, H. E. (2000). "Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling." *J Exp Med* 192(5): 719-28.

Zhang, X. und Ren, R. (1998). "Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia." *Blood* 92(10): 3829-40.

Zheng, R., Levis, M., Piloto, O., Brown, P., Baldwin, B. R., Gorin, N. C., Beran, M., Zhu, Z., Ludwig, D., Hicklin, D., Witte, L., Li, Y. und Small, D. (2004). "FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells." *Blood* 103(1): 267-74.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der humanen Rezeptortyrosinkinasen (nach Blume-Jensen und Hunter, 2001).....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen	4
Abb. 3: Struktur der FLT3-Rezeptortyrosinkinase	7
Abb. 4: Expression von FLT3 in der normalen Hämatopoese (nach Stirewalt und Radich, 2003).....	8
Abb. 5: Darstellung der Apoptose-Messung durch Annexin V-FITC/ PI-Färbung.....	44
Abb. 6: Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen	47
Abb. 7: Schematische Darstellung des chimären FLT3-Rezeptor (nach Mizuki <i>et al.</i> , 2000).....	49
Abb. 8: Analyse der durch PCR-Mutagenese generierten FLT3 D838Y Punktmutante	50
Abb. 9: Mutationen an Position I839 bewirken eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors	51
Abb. 10: Kompetitiver Proliferationsvorteil der die FLT3-Mutanten exprimierenden Ba/F3 Zellen	53
Abb. 11: FLT3-Mutanten induzieren in Ba/F3- und 32D-Zellen IL-3-unabhängige Proliferation.....	55
Abb. 12: Aktivierung verschiedener Signalwege durch FLT3-Mutanten in Ba/F3-Zellen.....	56
Abb. 13: Strukturformel von AG1296 (6,7-Dimethoxy-3-phenylquinoxalin)	57
Abb. 14: Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von AG1296.....	58
Abb. 15: Induktion von Apoptose durch AG1296	59
Abb. 16: AG1296 inhibiert FLT3-induzierte STAT5-Phosphorylierung	60
Abb. 17: Strukturformel von PKC412 (N-Benzoylstaurosporin)	61
Abb. 18: Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von PKC412.....	62
Abb. 19: Induktion von Apoptose durch PKC412	63
Abb. 20: PKC412 inhibiert die FLT3-induzierte STAT5-Phosphorylierung	64
Abb. 21: Strukturformel von SU5614 (5-Chloro-3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylen]-2-indolinon).....	65
Abb. 22: Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von SU5614	65
Abb. 23: Induktion von Apoptose durch SU5614	66
Abb. 24: SU5614 inhibiert die FLT3-induzierte STAT5-Phosphorylierung.....	67
Abb. 25: Modell der Signaltransduktionsaktivität in Zellen mit unterschiedlichem FLT3-Genotyp (nach Whitman <i>et al.</i> , 2001).....	68
Abb. 26: Schematische Darstellung der Generierung FLT3-WT/ITD-koexprimierender Zellen.....	69
Abb. 27: Koexpression von FLT3-WT und FLT3-ITD.....	70
Abb. 28: Proliferationskurven FLT3-WT-, FLT3-ITD- oder FLT3-WT/ITD-exprimierender Zellen.....	70
Abb. 29: Schematische Darstellung des murinen Knochenmarkstransplantationsmodells	73
Abb. 30: Generierung und Titration eines FLT3-ITD tragenden Retrovirus und retroviraler Transfer von FLT3-ITD in murines Knochenmark.....	74
Abb. 31: Die FLT3-Expression korreliert mit der Transduktionseffizienz in murinen Knochenmarkzellen	76
Abb. 32: Vergleich der Proteinexpression der FLT3-ITD-Konstrukte.....	77
Abb. 33: Verlauf der Leukozytenwerte im peripheren Blut nach Transplantation	78
Abb. 34: FLT3-ITD verursacht Splenomegalie und Granulozytose.....	79
Abb. 35: Immunphänotypisierung von Knochenmark und peripherem Blut.....	81

Abb. 36: Kaplan-Meier Überlebenskurve der FLT3-ITD transplantierten Mäuse	82
Abb. 37: Immunphänotypisierung von Knochenmark und peripherem Blut.....	83
Abb. 38: FLT3 D838Y-induzierte Vergrößerung von Thymus, Lymphknoten und Milz.....	85
Abb. 39: Immunphänotypisierung der mit FLT3 D838Y-Zellen infiltrierten Organe einer mit 318.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierten Maus.....	86
Abb. 40: Kaplan-Meier Überlebenskurve der FLT3 TKD-Mutanten transplantierten Mäuse	88
Abb. 41: Immunphänotypisierung von Thymus- und Knochenmarkzellen einer mit 30.000 FLT3 D838Y-positiven Zellen transplantierten Maus.....	88
Abb. 42: Immunphänotypisierung von Thymus-, Knochenmark- und peripheren Blutzellen einer mit 240.000 FLT3 I839M+R-positiven Zellen transplantierten Maus.....	89
Abb. 43: Immunphänotypisierung der die Splenomegalie verursachenden Zellen.....	91
Abb. 44: Überleben von FLT3-ITD- im Vergleich zu FLT3 TKD-transplantierten Mäusen.....	92
Abb. 45: Integrationsmuster des FLT3-IRES-EGFP Provirus in Milzzellen erkrankter Mäuse	93
Abb. 46: STAT5 wird von FLT3-ITD stärker aktiviert als von FLT3 TKD-Mutanten	95

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher danke ich für die Übernahme dieser Dissertation in den Fachbereich Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Cornelius Miething für die Einweisung in die hohe Kunst der Mausearbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft und die große Hilfsbereitschaft.

Frau Claudia Mugler danke ich für die ausgezeichnete Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken.

Herzlichen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Duyster, Bernhard und Licht für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Bei Christine von Klitzing, Wibke Leibig, Robert Mader, Stylianos Michalakis, Torsten Wedderer und meinem Vater bedanke ich mich herzlich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

9 Publikationen

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.

Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C. und Duyster, J. (2005). "FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce two distinct phenotypes in a murine bone marrow transplant model." *Blood* First Edition Paper, prepublished online February 17, 2005.

Hoepfl, J., Miething, C., Grundler, R., Gotze, K. S., Peschel, C. und Duyster, J. (2002). "Effects of imatinib on bone marrow engraftment in syngeneic mice." *Leukemia* 16(9):1584-8.

Miething, C., Grundler, R., Fend, F., Hoepfl, J., Mugler, C., von Schilling, C., Morris, S. W., Peschel, C. und Duyster, J. (2003). "The oncogenic fusion protein nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) induces two distinct malignant phenotypes in a murine retroviral transplantation model." *Oncogene* 22(30): 4642-7.

Miething, C., Mugler, C., Grundler, R., Hoepfl, J., Bai, R. Y., Peschel, C. und Duyster, J. (2003). "Phosphorylation of tyrosine 393 in the kinase domain of Bcr-Abl influences the sensitivity towards imatinib in vivo." *Leukemia* 17(9): 1695-9.