

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Aberrante Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase FLT3
in der akuten myeloischen Leukämie**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Carola Reindl
aus
Fürstenfeldbruck

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Hiddemann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Rupp
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Ch. Straka Prof. Dr. J. P. Johnson
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. K. Spiekermann
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	15.01.2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. Karsten Spiekermann für die stets freundliche Unterstützung und aktive Betreuung dieser Arbeit, besonders für seine Diskussionsbereitschaft, seinen wissenschaftlichen Rat und die Korrektur dieser Arbeit.

Frau Priv. Doz. Dr. Susanne Schnittger für die Analyse der AML-Patientenproben, Herrn Dr. Hilmar Quentmeier für die Analyse der AML- und ALL-Zelllinien und Frau Gudrun Mellert für die technische Assistenz im Labor für Leukämiediagnostik.

Der gesamten „Spiekermann“-Arbeitsgruppe – allen ehemaligen und momentanen Mitgliedern - für die hervorragende Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima im Labor. Insbesondere danke ich Ruth, Sabine und Ksenia für die nette Unterstützung und stete Hilfe in der Anfangszeit und Sridhar für viele wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen, die Einführung in die indische Lebensweise und viele Tassen Tee während des Schreibens dieser Arbeit.

Allen anderen Mitgliedern der KKG Leukämie für die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und die äußerst nette und freundschaftliche Atmosphäre, die diese Gruppe auszeichnet und den Laboralltag sehr angenehm gestaltet hat!

Meinen Eltern, meinem Bruder und allen Freunden, die mich stets unterstützt haben und es immer wieder geschafft haben, so manchen Frust nach langen Labortagen verfliegen zu lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil in folgenden Publikationen veröffentlicht oder werden in Kürze zur Publikation eingereicht:

Reindl C, Vempati S, Quentmeier H, Mellert G, Hiddemann W und Spiekermann K.
„Oncogenic CBL mutants confer a transforming potential to cells expressing the FLT3 tyrosine kinase”, *manuscript in preparation*

Reindl C und Spiekermann K.
„From kinases to cancer: Leakiness, loss of autoinhibition and leukemia”
Cell Cycle 2006, 5 (6), 599 – 602

Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K.
“Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML”
Blood 2006, 107 (9), 3700-07

Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, Eichenlaub S, **Reindl C**, Ellwart JW, Hiddemann W.
“FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L)”
Blood 2005, 105 (9), 3679-85

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytenleukämie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all-trans-retinoic acid
BSA	Bovins Serumalbumin
BP	Basenpaare
CBL	Casitas B-lineage lymphoma protein
CD	cluster of differentiation
CHO	chinese hamster ovary
CIN85	CBL-interacting protein of 85 kDa
CML	chronische myeloische Leukämie
CLL	chronische lymphatische Leukämie
FMS	macrophage colony-stimulating factor receptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FAB	French-American-British
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
FL	FLT3-Ligand
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
GFP	green fluorescent protein
GIST	gastrointestinale Stroma Tumore
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
HGFR	hepatocyte growth factor receptor
HRP	horseradish peroxidase

IC ₅₀	Die Konzentration an Inhibitor, bei der 50% der ausgesäten Zellen noch viabel sind
IL-3	Interleukin-3
ITD	internal tandem duplication
JM	juxtamembranös
KI	Kinaseinsert
KIT	stem cell factor receptor
LB	Luria Bertani
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MSCV	murine stem cell virus
PBS	phosphat buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PE	Phycoerythrin
PI3K	phosphatidyl inositol-3 kinase
PKC	protein kinase C
PS	Phosphatidylserin
PTK	Proteintyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	SRC-homology 2
SH3	SRC-homology 3
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
TKB	Tyrosinkinasebindung
TKD	Tyrosinkinasedomäne
U	unit
UBA	ubiquitin-associated domain
UV	ultraviolett
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization
YFP	yellow fluorescent protein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die akute myeloische Leukämie.....	1
1.2	Das ´two-hit´-Modell der Entstehung akuter Leukämien.....	2
1.3	Die Rezeptortyrosinkinase FLT3.....	4
1.3.1	Die FLT3-Kristallstruktur.....	5
1.3.2	Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese.....	7
1.3.3	FLT3-PTK-Inhibitoren.....	8
1.4	Das Protoonkogen CBL.....	10
1.4.1	Die Domänen des CBL-Proteins und seine Interaktionspartner.....	10
1.4.2	Die Rolle von CBL bei der Regulation der Endozytose und Ubiquitinierung von RTKs.....	12
1.4.3	CBL als Onkogen.....	14
2	Zielsetzung der Arbeit.....	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Materialien.....	18
3.1.1	Antikörper.....	18
3.1.2	Plasmide.....	19
3.1.3	Oligonukleotide.....	20
3.1.4	Zelllinien.....	23
3.1.5	Chemikalien, Enzyme, Inhibitoren, Zytokine.....	23
3.1.6	Kits.....	25
3.1.7	Laboraausstattung.....	26
3.1.8	Software.....	27
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Bakterienkultur.....	27
3.2.1.1.	Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen.....	27
3.2.1.2.	Herstellung kompetenter Bakterien.....	28
3.2.1.3.	Transformation der kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien.....	28
3.2.1.4.	Präparation von Plasmid-DNA.....	29
3.2.1.4.a	Mini-Präparation.....	29
3.2.1.4.b	Maxi-Präparation.....	29
3.2.2	Zellkultur.....	30
3.2.2.1	Zellkulturbedingungen.....	30
3.2.2.1.a	Adhärent wachsende Zelllinien.....	30
3.2.2.1.b	Suspensionszelllinien.....	31
3.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
3.2.2.3	Transfektion von 293-Zellen.....	31
3.2.2.3.a	Überexpression von Proteinen.....	32
3.2.2.3.b	Produktion von Retroviren.....	33

3.2.2.4	Stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen.....	33
3.2.2.5	Sortierung der Zellen im FACS.....	33
3.2.2.6	Bestimmung der Lebendzellzahl (Proliferationsexperimente).....	34
3.2.2.6.a	Trypan-Blau-Exklusion.....	34
3.2.2.6.b	WST-Assay.....	34
3.2.2.7	Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Zellkultur.....	35
3.2.2.7.a	Apoptose-Test mit Annexin- und 7-AAD-Färbung.....	35
3.2.2.7.b	Färbung der Zellnuclei mit Propidiumiodid (Zellzyklusanalyse).....	36
3.2.2.8	Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie.....	37
3.2.2.9	Internalisierung des FLT3-Rezeptors.....	37
3.2.2.10	Hungern der Zellen vor der Zelllyse.....	37
3.2.2.11	Stimulierung der Zellen vor der Zelllyse mit Zytokinen oder Inhibitoren.....	38
3.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	38
3.2.3.1	Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen.....	38
3.2.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
3.2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
3.2.3.4	Ortsgerichtete Mutagenese.....	40
3.2.3.5	Sequenzierung.....	41
3.2.3.6	Isolierung von mRNA.....	41
3.2.3.7	Reverse Transkription: Synthese von cDNA.....	41
3.2.3.8	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	41
3.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.2.4.1	Präparation von Protein-Lysaten.....	42
3.2.4.2	Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
3.2.4.3	Chemisches Crosslinking von Rezeptoren.....	43
3.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
3.2.4.5	Western-Blot.....	44
3.2.4.6	Immunopräzipitation.....	45
3.2.4.7	Strippen der Nitrocellulose-Membran.....	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Punktmutationen in der juxtamembranösen Domäne von FLT3.....	47
4.1.1	Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 treten selten bei Patienten mit AML auf.....	47
4.1.2	Stabile Expression der FLT3-JM-PM und FLT3-ITD/FLT3-TKD in Ba/F3-Zellen.....	48
4.1.3	FLT3-JM-PM-exprimierende Ba/F3-Zellen zeigen IL-3-unabhängiges Wachstum.....	49
4.1.4	Stimulierung mit FL führt zur Hyperproliferation von FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen.....	50
4.1.5	FLT3-JM-PM-exprimierende Ba/F3-Zellen weisen eine Apoptose-resistenz nach IL-3-Entzug auf.....	51
4.1.6	FLT3-JM-PM-Rezeptoren sind an Tyrosinresten konstitutiv phosphoryliert und zeigen eine höhere spontane Dimerisierungsrate.....	52

4.1.7	In FLT3-JM-PM-Zellen ist STAT5 konstitutiv aktiviert und Bcl-x(L) hochreguliert.....	54
4.1.8	Der FLT3-PTK-Inhibitor PKC412 induziert Wachstumsstopp und inhibiert die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT5 in FLT3-JM-PM-Zellen.....	57
4.2	Charakterisierung des onkogenen Potentials von CBL-Deletionsmutanten in FLT3-exprimierenden Zellen und Analyse der Inzidenz in der AML	59
4.2.1	CBL wird in allen AML-Subgruppen, CML- und CLL-Blasten sowie gesunden Knochenmarkproben exprimiert.....	59
4.2.2	CBL-WT und potentiell onkogene CBL-Konstrukte wurden stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert.....	60
4.2.3	Liganden-Stimulierung von FLT3-WT-exprimierenden Ba/F3-Zellen führt zur Phosphorylierung von endogenem CBL.....	61
4.2.4	CBL-70Z und v-CBL induzieren eine Transformation in FLT3-exprimierenden Zellen.....	62
4.2.5	Die selektiven FLT3-PTK-Inhibitoren SU5614 und PKC412 heben die Proliferation in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen auf....	64
4.2.6	Spezifische Inhibitoren des PI3K/mTOR-Signalweges hemmen das Wachstum der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen.....	66
4.2.7	Der FLT3-Rezeptor ist in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen konstitutiv aktiviert.....	67
4.2.8	Die FLT3-Signalwege STAT5 und AKT sind in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen hyperaktiv.....	68
4.2.9	Die Einführung der Mutation G306E in v-CBL reduziert signifikant das transformierende Potential der FLT3-WT/v-CBL-Zellen.....	70
4.2.10	Die Punktmutation der Tyrosine Y589 und Y599 in FLT3 reduziert die Aktivierung von CBL nach FL-Stimulierung.....	71
4.2.11	Die Internalisierung des FLT3-WT-Rezeptors wird durch Koexpression von CBL-70Z nicht beeinflusst.....	72
4.2.12	Überexpression von CBL-WT fördert die Dephosphorylierung und Degradierung des FLT3-Rezeptors.....	73
4.2.13	Screening von AML-Zelllinien und AML-Patientenproben auf CBL-Deletionsmutanten.....	74
4.2.13.1	PCR-Screening-Assay: Die AML-Zelllinien MOLM-13 und MOLM-14 exprimieren ein verkürztes CBL-Transkript.....	74
4.2.13.2	Die CBL-Deletionsmutante der MOLM-13-Zellen entsteht durch eine 'splice site'-Mutation.....	76
5	Diskussion.....	78
5.1	Charakterisierung der Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 (FLT3-JM-PM).....	78
5.1.1	FLT3-JM-PM-Mutationen definieren eine neue Klasse aktivierender FLT3-Mutationen.....	78
5.1.2	Einfluss von FLT3-JM-PM-Mutationen auf die Konformation der autoinhibitorischen JM-Domäne.....	82

5.1.3	Die JM-Domäne ist innerhalb der Klasse-III-RTKs hoch konserviert – Ein Vergleich mit Mutationsanalysen anderer RTKs dieser Familie.....	83
5.1.4	Punktmutationen in der JM-Domäne von Klasse-III-RTKs treten auch in anderen malignen Erkrankungen auf.....	85
5.2	Analyse des Phänotyps von onkogenen CBL-Deletionsmutanten in FLT3- exprimierenden Zellen und das Vorkommen in der AML.....	86
5.2.1	CBL-70Z und v-CBL transformieren FLT3-exprimierende Ba/F3-Zellen.....	87
5.2.2	CBL-Deletionsmutanten könnten an der Pathogenese der AML beteiligt sein.....	95
6	Ausblick.....	97
7	Zusammenfassung.....	98
8	Abstract.....	100
9	Literaturverzeichnis.....	102
10	Curriculum vitae.....	117

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) entsteht in einem Mehrstufenprozess durch die maligne Transformation pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen (Appelbaum, 2001), die ihre Fähigkeit zur Differenzierung in funktionstüchtige Granulozyten und Monozyten verloren haben und deren Vermehrung unkontrolliert erfolgt. Klinisch führt dies zur Expansion und Akkumulation unreifer Blasten im Knochenmark und Verdrängung der normalen Blutbildung. Die betroffenen Patienten leiden durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese an Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie. Die AML ist die häufigste Subform akuter Leukämien im Erwachsenenalter. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 1-2/100.000 und steigt kontinuierlich mit dem Lebensalter, wobei das mediane Alter der AML-Patienten bei ca. 65 Jahren liegt (Schoch, 2001). Nach der WHO ('World Health Organization')-Klassifikation ist eine akute Leukämie bei einem Blastenanteil von über 20% im Knochenmark gegeben. Die Diagnose und Einteilung der AML basiert auf der Analyse von Blut- und Knochenmarkausstrichen mittels konventionellen zytomorphologischen und zytochemischen Methoden nach der French-American-British (FAB)-Klassifikation aus dem Jahr 1976 (Bennett, 1976). Dabei erfolgt die Einteilung entsprechend des Reifungsgrades der Blasten und ihrer hämatopoetischen Linienzugehörigkeit (Tab. 1.1, S. 2).

Ein entscheidender Fortschritt in der Aufklärung der Pathogenese gelang jedoch durch die Identifikation von zyto- und molekulargenetischen Alterationen bei ca. 50 % aller AML-Patienten (Mrozek, 1997). Diese rekurrierenden genetischen Alterationen in AML-Blasten wurden neben Zytomorphologie und Zytochemie in die neue WHO-Klassifikation integriert (Harris, 1999), die vier Kategorien unterscheidet: 1. alle definierten Subgruppen mit zytogenetischen Translokationen, wie z.B. t(8;21), t(15;17) oder inv(16). Diese chromosomalen Rearrangements führen zur Bildung eines Fusionsgens und der Expression eines chimären Proteins. 2. AML mit multilineärer Dysplasie. 3. Patienten mit sekundärer AML. Dazu gehören Patienten, die längerer Zeit Toxinen, z.B. Chemikalien wie Benzen, ausgesetzt waren oder die nach einer chemotherapeutischen Behandlung eine therapieassoziierte AML entwickeln. 4. AML nicht anderweitig spezifiziert.

FAB-Typ	Monoclonals for precursor cells			Myeloid markers			Monocyte markers			Cytogenetics
	Tdt	HLA-DR	CD34 (My10)	CD13 (My7)	CD33 (My9)	CD15 (Leu Mi)	CD11 (My01)	CD14 (My4)	Other	
	M0 (minimally differentiated AML)	±	+	+	+	±	±	-	-	
M1 (myeloid leukemia without maturation)	±	+	+	+	+	-	±	-		-5,-7,-17 del 3p+21,+8
M2 (myeloid leukemia with maturation)	-	+	-	+	+	+	±	-		t(8;21) del 3p or inv 3 -5,-7 t(6;9),+8
M3 (promyelocytic APL)	-	-	-	+	+	±	-	-		t (15;17)
M4 (myelomonocytic)	-	+	-	+	+	+	+	+		inv (16) or -16q t (16;16) occ t(8;21), -5,-7 t(6,9)
M5 (monocytic leukemia)	-	+	-	±	+	+	+	+		t(9;11)(p21;p23)+8
M6 (erythroid)	-	±	-	±	±	-	±	-	Glyco-protein A	-5q,-5,-7,-3,+8
M7 (megacaryocytic)	-	+	+	-	±	-	-	-	Platelet glyco-protein	inv or del 3 +8,+21

Tab. 1.1 FAB-Klassifikation der AML. Nach der FAB-Klassifikation werden acht Subgruppen der AML unterschieden (M0 – M7). Die Immunophänotypisierung, die die Expression spezifischer Oberflächenantigene untersucht, trägt neben der morphologischen und zytochemischen Analyse der Blasten zur Identifikation der jeweiligen Subgruppe bei. Chromosomale Aberrationen können einzelnen Subgruppen zugeordnet werden. Tabelle aus (Kufe, 2003)

Die zytogenetische Analyse des Karyotyps von AML-Blasten erlaubt eine pathogenetisch basierte prognostische Einteilung der AML (Schoch und Haferlach, 2002). Z.B. sind die balancierten Translokationen t(8;21) und t(15;17) sowie die Inversion (16) mit einer guten klinischen Prognose assoziiert, dagegen ist der Verlust von Chromosom 5 oder 7, häufig im Rahmen eines komplexen Karyotyps, mit einer schlechten Prognose verbunden.

1.2 Das 'two-hit'-Modell der Entstehung akuter Leukämien

Die Untersuchung der bei AML-Patienten gefundenen genetischen Alterationen in Mausmodellen ergab, dass ein einzelnes genetisches Ereignis nicht ausreicht, um eine akute Leukämie zu induzieren. Beispielsweise wurde in transgenen Mäusen und im Knochenmark-Transplantationsmodell gezeigt, dass die alleinige Expression der chimären Proteine PML/RARα (t(15;17)) oder AML1/ETO (t(8;21)) zu einer Beeinträchtigung der hämatopoetischen Entwicklung der Zellen und zur Expansion des Stammzell-Pools führen kann, jedoch nicht ausreicht, um eine akute Leukämie in diesen Mäusen zu verursachen

(Grisolano, 1997; He, 1997; Schessl, 2005). In gleicher Weise induziert die Expression von aktiviertem RAS und aktiviertem FLT3 ('FMS-like tyrosine kinase 3') eine Myeloproliferation, aber keine akute Leukämie (Kelly, 2002b).

Daher wird nach dem gegenwärtigen Modell der Leukämogenese angenommen, dass mindestens zwei genetische Alterationen zusammenwirken müssen: Eine Mutation, die auf Signaltransduktionskaskaden abzielt und einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil für hämatopoetische Vorläuferzellen bietet (Klasse I Mutationen, z.B. aktivierende Mutationen in RAS, FLT3, KIT) sowie eine zweite Mutation, die hämatopoetische Transkriptionsfaktoren betrifft und damit die Differenzierung und die Apoptose der Zellen blockiert (Klasse II Mutationen, z.B. PML/RAR α , AML1/ETO, HOX Fusionsgene) (Dash und Gilliland, 2001). Akute Leukämien, die charakterisiert sind durch verstärkte Proliferation und/oder Überleben der Zellen und blockierte Differenzierung, stellen somit die Konsequenz der Expression beider Klassen von Mutationen dar (Abb.1.1).

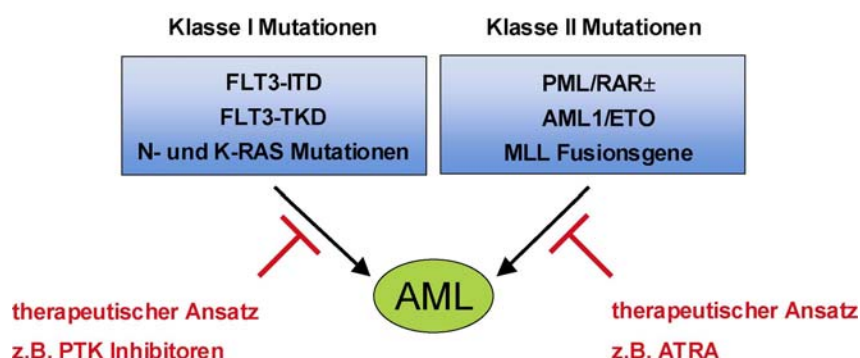


Abb.1.1 Modell der Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (AML). Zwei kooperierende Mutationen der Klassen I und II müssen zusammenwirken, um eine AML zu induzieren (modifiziert nach (Gilliland und Griffin, 2002)). Der therapeutische Ansatz müsste folglich die Wirkung beider Mutationen durch eine Kombinationstherapie unterbinden.

Eine der häufigsten molekulargenetischen Alterationen in der AML stellen Klasse I Mutationen dar und betreffen die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) 'FMS-like tyrosine kinase 3' (FLT3), 'stem cell factor receptor' (KIT) und 'macrophage colony-stimulating factor receptor' (FMS), die durch konstitutive Aktivierung mitogener Signalketten zur Pathogenese der AML beitragen (Reilly, 2003).

1.3 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

RTKs vermitteln Wachstums-, Differenzierungs- und Entwicklungssignale. 58 humane RTKs wurden bisher identifiziert, von denen mehr als die Hälfte in die Genese maligner Tumoren involviert sind (Blume-Jensen und Hunter, 2001).

RTKs sind transmembrane Rezeptoren, die Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität besitzen. Ihre Aktivität in nicht-transformierten Zellen ist normalerweise streng reguliert. In der Abwesenheit von spezifischen Liganden sind die RTKs hauptsächlich als Monomere in einer inaktiven Konformation in der Membran lokalisiert. Ligandenbindung führt zur Dimerisierung, die die Trans-Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren ermöglicht und die Aktivierung der enzymatischen Aktivität sowie die Signaltransduktion durch Bereitstellung von Andock-Stellen für nachgeordnete Signalproteine mit phospho-Tyrosin-Erkennungssequenz zur Folge hat. Nach der Aktivierung werden die Ligand-Rezeptor-Komplexe schnell internalisiert und abgebaut bzw. recycelt (Polo, 2004; Turner, 1996).

RTKs besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, deren strukturelle Motive zusammen mit der Sequenz der Tyrosinkinasedomäne (TKD) zur Einteilung in die 20 Subfamilien dienen. Intrazellulär befindet sich die juxtamembranöse (JM) Domäne, die die transmembrane Domäne von der TKD trennt. Die Kinasedomänen sind innerhalb der Proteinkinasen hochkonserviert (Hanks, 1988) und lassen drei Strukturen unterscheiden: Die Aktivierungsschleife ('activation loop', 'A-loop'), die ATP-Bindungstasche ('ATP binding pocket') und die katalytisch aktive Kinaseschleife ('catalytic loop'). In der inaktiven Konformation blockiert die Aktivierungsschleife sterisch die ATP-Bindungstasche. Die aus dem 'N lobe' und 'C lobe' bestehende Kinasedomäne kann bei manchen Vertretern der RTKs durch ein hydrophobes Kinaseinsert (KI) geteilt sein. Die an die Kinasedomäne anschließende C-terminale Domäne dient durch zahlreiche Autophosphorylierungsstellen als Andock-Stelle für Signaltransduktionsproteine und kann auch als inhibitorische Domäne dienen (Shewchuk, 2000). Den typischen Aufbau von RTKs und deren Aktivierung zeigt Abbildung 1.2 (S. 5).

FLT3 gehört zur Familie der Klasse III RTKs, zu denen auch der 'macrophage colony-stimulating factor receptor' (FMS), 'platelet-derived growth factor receptor' (PDGFR) α und β und 'stem cell factor receptor' (KIT) gehören (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Diese Familie wird charakterisiert durch eine extrazelluläre Domäne, die aus fünf 'immunoglobuline like'-Domänen besteht, sowie einer zytoplasmatischen TKD, die durch eine KI-Domäne geteilt ist.

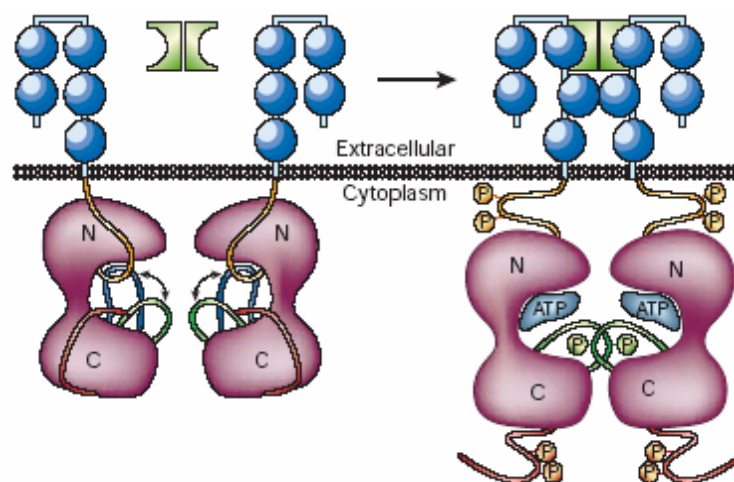


Abb. 1.2 Der Aufbau und die Aktivierung von RTKs. Extrazelluläre Domäne (blau), Kinasedomäne aus 'N lobe' und 'C lobe' (violett), Ligand (grün). Links: Inaktive Konformation. In der TKD-Domäne befinden sich Aktivierungs- und katalytische Schleife in einem Gleichgewicht zwischen Substrat-abweisender (blau) und Substrat-zugänglicher (grün) Konformation. Zusätzlich können die JM-Domäne (orange) und die C-terminale-Domäne (rot) den Substrat-Zugang inhibieren. Rechts: Aktive Konformation. Die Bindung des Liganden induziert eine Konformationsänderung, die Dimerisierung und Tyrosin-Phosphorylierung der Rezeptoren erlaubt und zur Aufhebung der inhibitorischen Effekte der Aktivierungsschleife, der JM- und C-terminalen-Domäne führt. Abbildung aus (Blume-Jensen und Hunter, 2001)

1.3.1 Die FLT3-Kristallstruktur

Im Jahr 2004 wurde die Kristallstruktur der autoinhibierten, unphosphorylierten Form der TKD und JM-Domäne von FLT3 gelöst (Griffith, 2004). Die grundsätzlichen Merkmale der autoinhibierten FLT3-Struktur sind die bilobale Kinasedomäne, die Aktivierungsschleife und die JM-Domäne (Abb. 1.3, S. 6).

Die Kinasestruktur von FLT3 entspricht der typischen, in den meisten Proteinkinasen gefundenen Faltung aus N- und C-terminaler Domäne ('N lobe' und 'C lobe') (Knighton, 1991). Ein einziges flexibles Polypeptidband verbindet den 'N lobe' und 'C lobe' und ermöglicht beträchtliche Rotationsbewegungen der beiden Domänen relativ zueinander. Rotiert der 'N lobe' in Richtung 'C lobe', adaptiert die Kinase die katalytisch aktive Konformation und umgekehrt, rotiert der 'N lobe' weg von der C-terminalen Domäne, befindet sich die Kinase in der katalytisch inaktiven Form.

Die Kinase-Aktivierungsschleifen beinhalten normalerweise ein bis drei Tyrosinreste, die im nicht-phosphorylierten Zustand eine offene Konformation und damit die Bindung von ATP und Proteinsubstraten erlauben. Die FLT3-Aktivierungsschleife besitzt einen Tyrosinrest (Y842).

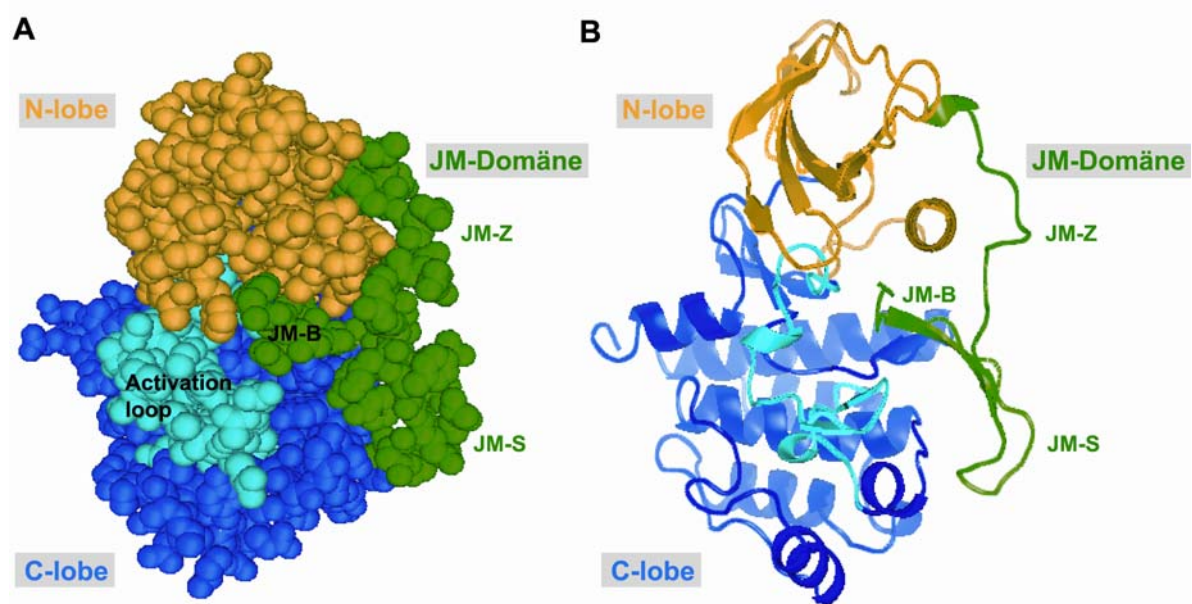


Abb. 1.3 Die Kristallstruktur der intrazellulären Region des FLT3 Proteins in der inaktiven Konformation ('Protein Data Bank (PDB) Accession No.' 1RJB). 'Space fill'(A) und 'Ribbon' (B) Modell der JM-Domäne und TKD. Gezeigt sind die JM-Domäne (grün) mit den drei Regionen JM-B, JM-S und JM-Z sowie die TKD bestehend aus 'N lobe' (gelb), 'C lobe' (blau) und die Aktivierungsschleife (cyan). Die JM-Domäne ist das wichtigste autoinhibitorische Element der inaktiven FLT3-Kinase. Abbildung modifiziert aus (Reindl und Spiekermann, 2006)

Ein einzigartiges Merkmal der FLT3 Kristallstruktur ist die JM-Domäne, die in ihrer Gesamtheit als autoinhibitorisches Element dient und mit allen Schlüssel-Bestandteilen des FLT3-Proteins interagiert (Griffith, 2004). Die JM-Domäne kann in drei topologische Komponenten unterteilt werden: 'JM binding motif' (JM-B), 'JM switch motif' (JM-S) und 'JM zipper or linker peptide' (JM-Z) (Abb. 1.3). JM-B (Y572 – M578) wird Bindungsmotiv genannt, da es fast vollständig in die FLT3-Struktur eingebettet ist. Obwohl JM-B nur aus sieben Aminosäuren besteht, steht es in Kontakt mit nahezu allen strukturell wichtigen Komponenten, die in den Aktivierungs- und Inaktivierungszyklus der zytosomatischen Domäne von FLT3 involviert sind. JM-S (V579 – V592) bildet ein antiparalleles β -Faltblatt, das äusserlich am 'C lobe' lokalisiert ist. JM-S wird als 'switching'-Motiv bezeichnet, da es zwei wichtige Tyrosinreste, Y589 und Y591, enthält, deren Zustand der Phosphorylierung in die Aktivierung und Regulation der enzymatischen Aktivität des Rezeptors involviert ist (Mol, 2003). JM-Z (D593 – W603) ist am C-Terminus der JM-Domäne lokalisiert und ist hauptsächlich mit dem 'N lobe' assoziiert, an dem es sich außen entlang faltet.

Lange Zeit wurde über die Funktion der JM-Domäne der Klasse-III-RTKs spekuliert. Die Struktur von FLT3 erlaubte den ersten direkten Einblick in den Mechanismus, durch den die JM-Domäne ihren autoinhibitorischen Effekt auf die katalytische Aktivität der Kinase ausübt.

1.3.2 Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese

FLT3 spielt eine wichtige Rolle in der normalen Hämatopoese und Leukämogenese (Matthews, 1991; Rosnet, 1991) und wird hauptsächlich in frühen myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen im Knochenmark, Thymus und den Lymphknoten (Rosnet, 1993) sowie in den leukämischen Blasten von 70 – 90 % der Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) und AML exprimiert (Carow, 1996; Rosnet, 1996). Mit zunehmender Differenzierung der Zellen in die verschiedenen hämatopoetischen Linien geht die FLT3-Expression verloren.

FLT3 ist an der onkogenen Transformation in AML-Blasten durch verschiedene Mechanismen beteiligt. Es wurden sowohl FLT3-Überexpression und autokrine Stimulierung durch FLT3-Ligand (FL) als auch aktivierende Mutationen im *FLT3*-Gen nachgewiesen. Eine der häufigsten genetischen Alterationen in der AML stellen Mutationen im *FLT3*-Gen dar, die bei 27 – 35 % der Patienten vorkommen (Yamamoto, 2001; Yokota, 1997). Abbildung 1.4 zeigt ein Schema der FLT3-Struktur und die Lokalisation der zwei bekannten Klassen aktivierender Mutationen im FLT3-Protein.

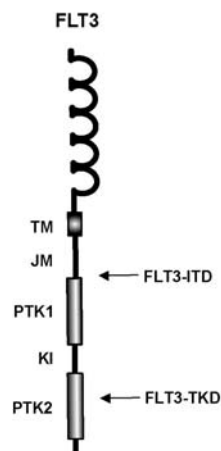


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der FLT3-Struktur und die Lokalisation der zwei bekannten Cluster aktivierender Mutationen bei Patienten mit AML. Die Lokalisation der zwei Cluster aktivierender Mutationen, die bei Patienten mit AML gefunden werden, sind dargestellt: 'internal tandem duplications' in der JM-Domäne und beginnenden TKD (FLT3-ITD) und Punktmutationen und kleine Insertionen in der TKD (FLT3-TKD). (TM: transmembrane Domäne; JM: juxtamembranöse Domäne; PTK1: Protein-Tyrosinkinase-Domäne 1; KI: Kinase-Insert-Domäne; PTK2: Protein-Tyrosinkinase-Domäne 2)

Die erste Klasse aktivierender Mutationen repräsentieren die Mehrheit der FLT3-Mutationen: 'internal tandem duplications' (FLT3-ITDs) in der JM-Domäne und beginnenden TKD. Sie wurden erstmals 1996 von Nakao et al. bei 20 – 25 % der

Patienten mit AML beschrieben (Nakao, 1996). FLT3-ITDs entstehen durch Duplikation eines Fragments der kodierenden Sequenz, das in der Länge von 3 bis ≥ 400 Basenpaaren variieren kann und unter Beibehaltung der ursprünglichen Orientierung inseriert wird. Der Leserahmen wird dabei immer aufrecht erhalten, in manchen Fällen durch Insertion eines zusätzlichen Nukleotids (Schnittger, 2002). Die zweite Klasse aktivierender Mutationen findet man bei 7 – 10 % der AML-Patienten: Punktmutationen oder kleine Insertionen in der Aktivierungsschleife der TKD von FLT3 (FLT3-TKD). Am häufigsten ist die Asparaginsäure an Position 835 betroffen (Spiekermann, 2002; Yamamoto, 2001).

Der Erwerb einer FLT3-ITD- oder FLT3-TKD-Mutation führt zur konstitutiven Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung spezifischer Signalwege, u.a. des 'signal transducer and activator of transcription 5' (STAT5)- und 'mitogen-activated protein kinase' (MAPK)-Signalweges, sowie zu liganden-unabhängigem Zellwachstum in verschiedenen Zelllinien (Abu-Duhier, 2001; Hayakawa, 2000; Kiyoi, 1998; Mizuki, 2000; Spiekermann, 2002; Spiekermann, 2003a; Tse, 2000; Yamamoto, 2001). Die Transplantation von retroviral FLT3-ITD-transduziertem Knochenmark im Knochenmark-Transplantations-Modell in Mäuse führt zu einer myeloproliferativen Erkrankung. Ein ähnlicher Phänotyp wird bei transgener Expression von FLT3-ITDs in Mäusen beobachtet. (Grundler, 2005; Kelly, 2002b; Lee, 2005). Zusätzliche Punktmutationen in FLT3-ITD-Rezeptoren, die die FLT3-Kinase-Aktivität inaktivieren, induzieren keine Erkrankung in Mausmodellen. Daher scheint die FLT3-Kinase-Aktivität zwingend notwendig für die Entwicklung eines myeloproliferativen Phänotyps zu sein.

1.3.3 FLT3-PTK-Inhibitoren

FLT3-Mutationen sind ein unabhängiger, ungünstiger prognostischer Indikator bei Patienten mit AML unter 65 Jahren (Kiyoi, 1999; Kottaridis, 2001; Thiede, 2002) und stellen eine vielversprechende Struktur für therapeutische Interventionen dar. Die Effektivität der gezielten Inhibition einer onkogenen Kinase und deren Signalübertragung wurde eindrucksvoll durch den Einsatz des Kinaseinhibitors Imatinib (STI571, Gleevec®) bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML), CML-Blastenkrise sowie auch im Kontext von soliden Tumoren bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), gezeigt (Druker, 2001a; Druker, 2001b; Savage und Antman, 2002; Sawyers, 2002; van Oosterom, 2001). Imatinib inhibitiert selektiv die zytoplasmatische Kinase ABL und auch das durch die reziproke Translokation (9;22) entstandene chimäre Protein BCR-ABL, das für die CML charakteristisch ist, sowie die RTKs KIT und PDGFR α und β (Buchdunger,

1996; Carroll, 1997). FLT3 wird aufgrund einer sterischen Hinderung durch ein nicht-konserviertes Phenylalanin (F691) nicht inhibiert (Bohmer, 2003). Diese Erfolge führten zu einer intensiven Suche nach potentiellen FLT3-PTK-Inhibitoren. Mindestens vier Verbindungen zeigten vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien und sind momentan in klinischen Studien der Phase I oder Phase II: CEP-701 (Smith, 2004); MLN518 (CT53518) (Kelly, 2002c), SU11248 (O'Farrell, 2003), SU5416 (Yee, 2002) und PKC412 (Weisberg, 2002b). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete PKC412 ist ein oral verabreichtes Benzoylstaurosporin, das ursprünglich als 'vascular endothelial growth factor receptor' (VEGFR) und 'protein kinase C' (PKC) Inhibitor entwickelt wurde, und sowohl KIT als auch FLT3 hemmt. Eine Phase-II-Studie mit AML-Patienten, die eine FLT3-ITD- oder FLT3-TKD-Mutation aufwiesen und entweder rückfällig oder nicht für Chemotherapie geeignet waren, zeigte vielversprechende Ergebnisse. In 14 von 20 behandelten Patienten reduzierte sich die Anzahl der peripheren Blasten und in 5 Patienten die Anzahl der Blasten im Knochenmark um mehr als 50% (Stone, 2005). Im Vergleich zu Baseline wurde 24 Stunden nach der ersten Gabe von PKC412 eine Abnahme der FLT3-Autophosphorylierung in 75 % der AML-Blastenproben beobachtet. Dies bestätigte, dass das Zielprotein inhibiert wurde.

Die anfänglichen Ergebnisse der Studien mit FLT3-PTK-Inhibitoren belegen, dass diese Verbindungen biologische Aktivität bei Patienten mit AML besitzen. Jedoch nur wenige Patienten konnten eine komplette oder dauerhafte Remission mit der alleinigen Therapie mit FLT3-PTK-Inhibitoren erzielen, so dass eine Kombination mit Chemotherapie oder anderen gezielten Therapien wie z.B. 'all-trans-retinoic acid' (ATRA) in der akuten Promyelozytenleukämie (APL) angewandt werden muss.

1.4 Das Protoonkogen CBL

Das Proto-Onkogen CBL (für Casitas B-lineage lymphoma) und andere Mitglieder der CBL-Familie (im Säugetier: CBL-B und CBL-3) haben in den letzten Jahren aufgrund folgender Entdeckungen das Interesse der Wissenschaft geweckt: 1. Ein CBL-Protein wurde in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* identifiziert, das die Signale von RTKs negativ reguliert. 2. Alle CBL-Proteine haben eine einzigartige Domäne, die phosphorylierte Tyrosinreste aktivierter Tyrosinkinase erkennt. 3. CBL-Proteine rekrutieren Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2s oder 'ubiquitin carrier enzymes') zu aktivierten RTKs und regulieren deren Multi-Ubiquitinierung und Degradierung. CBL-Proteine sind demnach Negativ-Regulatoren von RTKs und PTKs.

In der Maus wird das 120 kDa CBL-Protein ubiquitär exprimiert und ist im Zytoplasma lokalisiert, mit höchstem Expressionsgrad in hämatopoetischen Zellen, Thymus und Hoden (Langdon, 1989b).

1.4.1 Die Domänen des CBL-Proteins und seine Interaktionspartner

Das CBL-Protein besteht aus zahlreichen Domänen, denen unterschiedliche Funktionen und Interaktionspartner zugeordnet werden (Abb. 1.5).

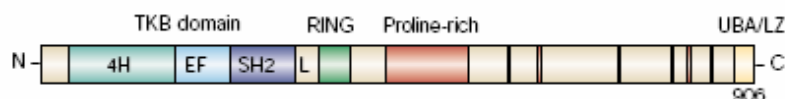


Abb. 1.5 Die Domänen des CBL Proteins. Die Tyrosinkinasebindungs (TKB)-Domäne besteht aus 4H- (mint), EF- (hellblau) und varianter SH2- (violett) Domäne und wird durch die Linker (L)-Region von der RING-Finger-Domäne (grün) getrennt. C-terminal folgt die Prolin-reiche Region (rot) und am Ende des C-Terminus die UBA- bzw. LZ-Domäne. Abbildung aus (Thien und Langdon, 2001)

Die stark konservierte, N-terminale Region besteht aus der Tyrosinkinasebindungs (TKB)-Domäne, einer kurzen Linker-Region und der RING-Finger-Domäne. Die TKB-Domäne kann an aktivierte RTKs und PTKs binden. Die Bindung wird vermittelt durch drei Domänen, die ein vier-Helix Bündel (4H), eine Calcium-bindende EF-Hand (EF)-Domäne und eine Variante der 'SRC-homology 2' (SH2)-Domäne umfassen. Zusammen erkennen diese Domänen spezifische phospho-Tyrosinreste an aktivierten Tyrosinkinase (Meng, 1999). Die Interaktion phosphorylierter RTKs mit der TKB-Domäne konnte u.a. für den

‘epidermal growth factor receptor’ (EGFR) (de Melker, 2001; Levkowitz, 1998), ‘hepatocyte growth factor receptor’ (HGFR) (Peschard, 2001), PDGFR α (Bonita, 1997) und FMS (Lee, 1999) gezeigt werden.

Die RING-Finger-Domäne rekrutiert E2-Enzyme (Joazeiro, 1999; Levkowitz, 1999; Yokouchi, 1999; Zheng, 2000) und vermittelt damit den Transfer von Ubiquitin auf Zielproteine. Sowohl die Kristallstruktur als auch biologische Daten zeigen, dass die Linker-Region wesentlich an der korrekten Positionierung der TKB-Domäne zur RING-Finger-Domäne beteiligt ist und die räumliche Orientierung des Substrats und E2 stabilisiert, damit ein wirksamer Transfer von Ubiquitin möglich ist (Zheng, 2000).

C-terminal zum RING-Finger befindet sich eine kleine säure-reiche Domäne mit unbekannter Funktion und die Prolin-reiche Region, die 15 potentielle SH3-Domänen-Bindungsmotive enthält. Beispielsweise interagiert das Adaptor-Protein GRB2 über die Aminosäurereste 481-563 mit der Prolin-reichen Region (Odai, 1995). Auch die p85-Untereinheit der ‘phosphatidyl inositol-3 kinase’ (PI3K) bindet an die distale Prolin-reiche Region (Elly, 1999; Fang, 2001). Vor kurzem wurde die Interaktion mit Mitgliedern der CAP/ArgBP2/Ponsin und CIN85 (‘CBL-interacting protein of 85 kDa’)/CMS-Protein-Familie nachgewiesen (Kirsch, 2001; Soubeyran, 2002; Szymkiewicz, 2002; Take, 2000). Außerdem wurden zwei 14-3-3 Protein-bindende Motive identifiziert, die Bindung an Serin- oder Threonin-phosphorylierte Proteine vermitteln.

Der C-Terminus endet mit einer ‘ubiquitin-associated’ (UBA)-Domäne. Es ist unbekannt, ob diese Region eine direkte Funktion in der E3-Ligase-Aktivität von CBL hat. Diese Domäne weist auch Ähnlichkeiten mit Domänen in DNA-bindenden Proteinen auf, die durch Leucin-Seitenketten dimerisieren (Leucin-Zipper (LZ)-Domäne) (Blake, 1991). CBL kann über diese Domäne Homodimere bilden (Bartkiewicz, 1999).

CBL besitzt 22 Tyrosinreste, einige von ihnen werden als Antwort auf externe Stimuli phosphoryliert (Andoniou, 1994; Donovan, 1994). Tyrosine 700, 731 und 774 sind die wichtigsten Phosphorylierungsstellen *in vivo* und vermitteln Interaktionen mit Signalproteinen, die SH2-Domänen beinhalten, z.B. die SH2-Domäne von CRK, CRK-L (Elly, 1999; Sawadikosol, 1996), VAV, der p85-Untereinheit der PI3K (Feshchenko, 1998) und die SH2-Domäne der Tyrosinphosphatase SHP2 (Chernock, 2001).

CBL ist als multifunktionelles Adaptormolekül (bisher sind > 100 Bindungspartner identifiziert) (Abb. 1.6, S. 12) und Ubiquitin-Ligase an vielfältigsten zellulären Prozessen beteiligt. Es ist involviert in die Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und Zellmorphologie und auch in die Pathologie verschiedener Erkrankungen, z.B. Autoimmunerkrankungen und Krebserkrankungen.

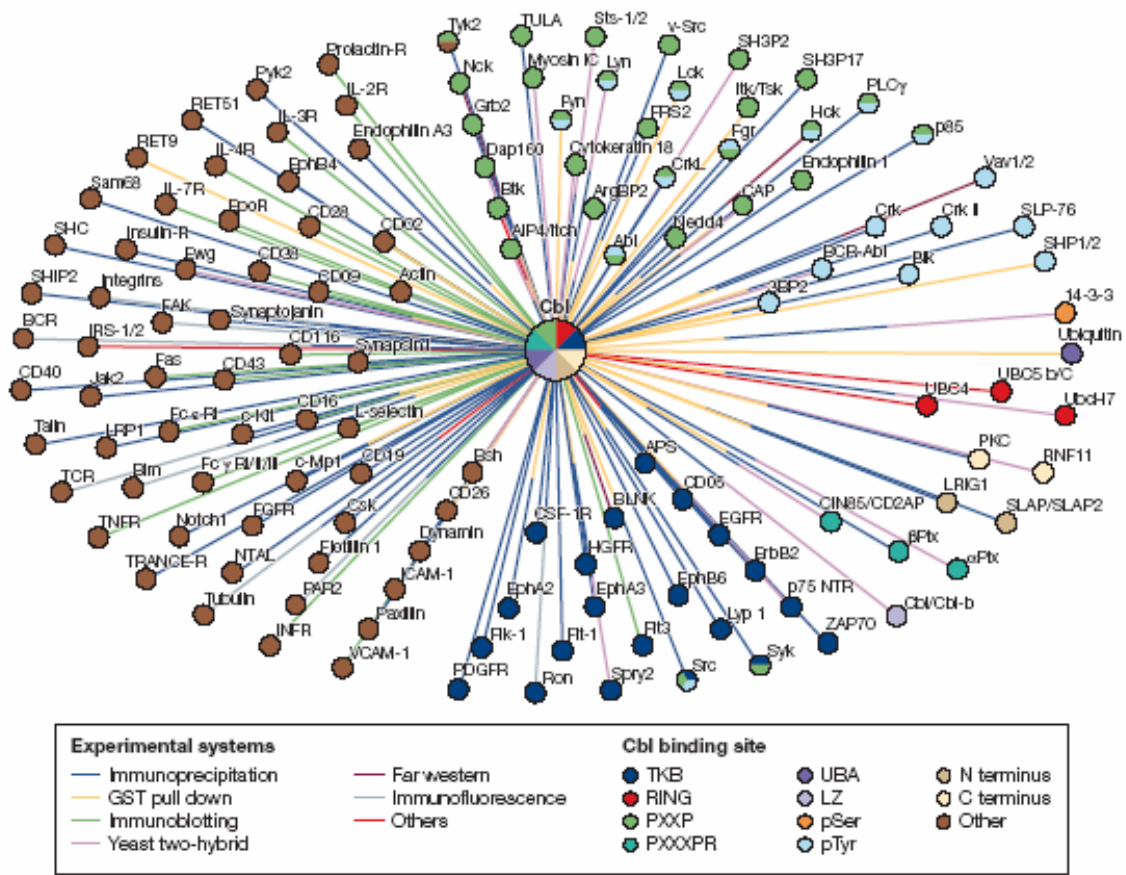


Abb. 1.6 Das CBL-Interaktom. Das Osprey-Diagramm zeigt die momentan bekannten mit CBL und CBL-B interagierenden Proteine. Die Proteine wurden entsprechend der CBL-Bindungsstelle gruppiert (farbige Punkte). Die Methode zur Detektion der jeweiligen Protein-Protein Interaktion wird durch unterschiedliche Farben der Linien repräsentiert. Interaktionen, bei denen die exakte Bindungsstelle in CBL nicht bestimmt wurde, wurden unter „Immunoblotting“ zusammengefasst. GST: Glutathion-S-Transferase; LZ: Leuzin-Zipper; pSer: phosph-Serin; pTyr: phospho-Tyrosin, PXXP und PXXXPR: Prolin-reiche Domänen; TKB: Tyrosinkinasebindungs-Domäne; UBA: Ubiquitin-assoziierte-Domäne. Abbildung aus (Schmidt und Dikic, 2005).

1.4.2 Die Rolle von CBL bei der Regulation der Endozytose und Ubiquitinierung von RTKs

Durch die Beteiligung an der Endozytose und Degradierung von Rezeptoren hat CBL einen entscheidenden Einfluss auf die Intensität und Länge der Rezeptoraktivität.

CBL reguliert auf zwei unterschiedliche Arten die Endozytose von RTKs. Zum einen rekrutiert und überträgt CBL über die RING-Finger-Domäne Ubiquitin auf RTKs (E3-Ligase-Aktivität), zum anderen rekrutiert der C-Terminus den CIN85-Endophilin-Komplex, der die Invagination der Plasmamembran fördert (Abb. 1.7, S. 13).

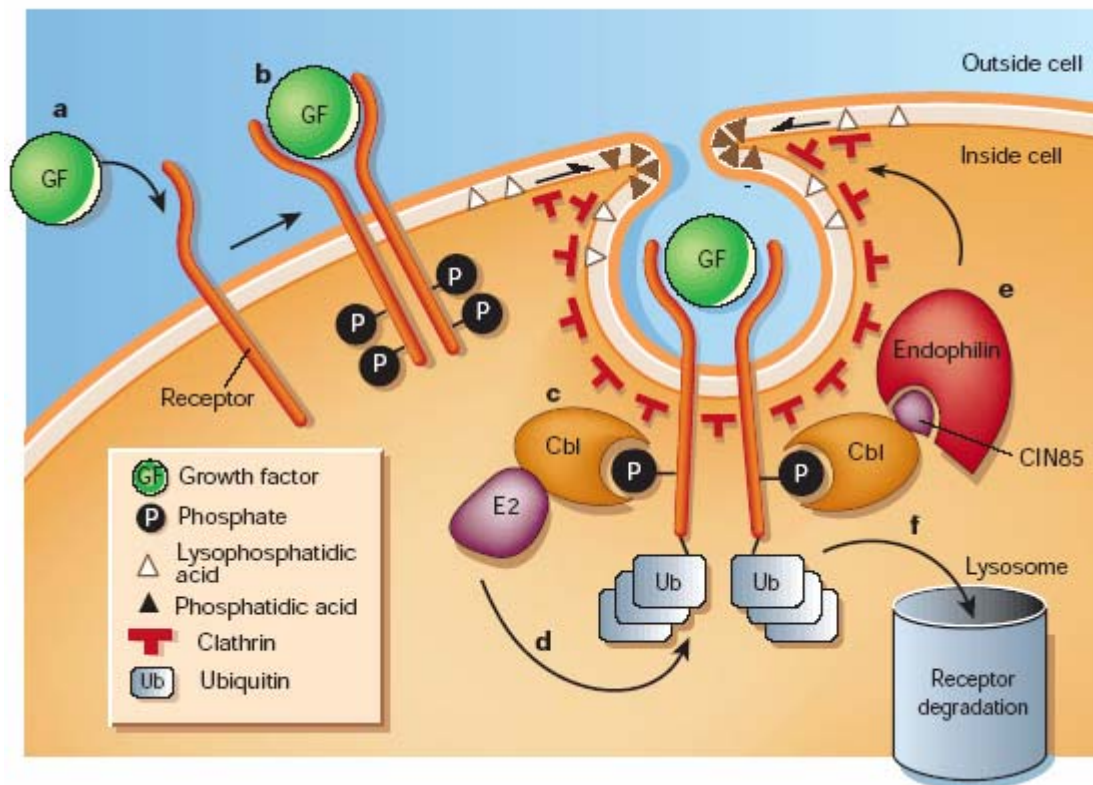


Abb. 1.7 Duale Rolle von CBL in der Termination der RTK-Aktivität. a. Der Wachstumsfaktor ('growth factor', GF) bindet an den Rezeptor. b. Die Rezeptoren dimerisieren und werden phosphoryliert c. CBL dockt an spezifischen phospho-Tyrosinresten an und fördert die Aufnahme aktivierter Rezeptoren durch Internalisierung von Clathrin-ummantelten Membraneinstülpungen. d. CBL rekrutiert Ubiquitin-beladene E2-Enzyme, die die Rezeptoren ubiquitinieren. e. CBL rekrutiert den Endophilin-CIN85-Komplex. Endophiline katalysieren die Umwandlung von Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure, was die Wölbung des inneren Blattes der Plasmamembran und damit die Invagination und Abschnürung der Vesikel begünstigt. f. Die Wachstumsfaktor-Rezeptor-Komplexe werden zu den Lysosomen transportiert und degradiert. Abbildung aus (Oved und Yarden, 2002).

Die Liganden-vermittelte Endozytose der RTK beginnt mit der schnellen Rekrutierung der aktivierten Rezeptoren zu Clathrin-ummantelten Einstülpungen der Zellmembran, die sich abschnüren und Clathrin-ummantelte Vesikel bilden, die sich zu frühen Endosomen differenzieren. Es wurde gezeigt, dass CBL an der Zellmembran mit dem aktivierten EGFR assoziiert ist und ihn ubiquitiniert (de Melker, 2001; Stang, 2000). Auch die Stimulierung des FMS mit seinem Liganden CSF1 führt zur Rekrutierung von CBL zur Plasmamembran und fördert die schnelle Internalisierung des Rezeptors (Lee, 1999). CBL bleibt dabei mit den RTKs in frühen und späten Endosomen assoziiert (de Melker, 2001; Levkowitz, 1998), wodurch weitere Ubiquitinierung ermöglicht und die Degradierung sichergestellt wird. Im Lysosom oder Proteasom erfolgt der letztendliche vollständige Abbau. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CBL die Ubiquitinierung

verschiedener Rezeptoren (EGFR, PDGFR und FMS) verstärkt (Lee, 1999; Levkowitz, 1998; Miyake, 1998). Die E3-Ligase-Aktivität von CBL wurde deutlich, als man entdeckte, dass der isolierte RING-Finger von CBL die Addition von Ubiquitin an Zielproteine *in vitro* und *in vivo* katalysieren kann (Waterman, 1999). Die Mutation des kritischen Cysteins (C381A) und des hoch-konservierten Tryptophans (W408) im RING-Finger hebt die Ubiquitin-Ligase-Funktion von CBL auf (Joazeiro, 1999). CBL kann auch die Ubiquitinierung von Proteinen vermitteln, die an seine C-terminale Region (nicht an die TKB-Domäne) binden, z.B. die p85-Untereinheit der PI3K (Fang, 2001) und die CIN85/CMS Protein-Familie (Haglund, 2002).

Die Endozytose von RTKs wird jedoch auch über Signalwege reguliert, die nicht mit der Ubiquitin-Ligase-Aktivität verknüpft sind. CBL scheint durch die Interaktion mit multiplen Proteinen der Link zwischen RTKs und endozytotischem Kompartiment zu sein, z.B. ist die Aktivität der SRC-Kinase, welche über ihre SH3-Domäne an CBL bindet, in die EGFR-Internalisierung über Clathrin-ummantelte Einstülpungen involviert. SRC bindet, phosphoryliert und aktiviert Dynamin (Ahn, 2002) und phosphoryliert die schweren Ketten des Clathrin (Wilde, 1999). Eine weitere Regulation der RTK-Internalisierung erfolgt über die Bindung von CBL an das Adaptorprotein CIN85 (Petrelli, 2002; Soubeyran, 2002; Szymkiewicz, 2002). CIN85 ist konstitutiv mit Endophilinen assoziiert, einer Familie von Proteinen, die die Plasmamembran-Invagination während der Internalisierung kontrollieren können. CIN85 kontrolliert im Komplex mit aktivierten RTKs also die frühen Schritte der Rezeptor-Endozytose (Petrelli, 2002; Soubeyran, 2002).

Angesichts der wachsenden Zahl von CBL-Interaktionspartnern und wachsenden Beweisen für eine Beziehung zwischen Ubiquitinierung und Internalisierung, scheint CBL eine wichtige Funktion in den multiplen Schritten der Endozytose zu spielen.

1.4.3 CBL als Onkogen

CBL kann durch Deletionen oder Mutationen, die die Negativ-Regulation aktivierter RTKs verhindern, als Onkogen fungieren. Die intensive Erforschung der CBL-Proteine hatte seinen Ursprung in der Identifikation des v-CBL Onkogens, das durch den 'mouse Cas NS-1 Retrovirus' transduziert wird und pre- und pro-B-Lymphome sowie gelegentlich myeloische Leukämien induziert (Langdon, 1989a). v-CBL ist eine Deletionsmutante des humanen CBL-Genprodukts und kodiert nur noch für die TKB-Domäne (Blake, 1991). v-CBL assoziiert zwar mit EGFRs, ist aber in seiner Funktion als Ubiquitin-Ligase und der Degradierung der RTKs beeinträchtigt, was zu verstärkten Signalen und zur onkogenen Transformation führt (Levkowitz, 1998). Eine Punktmutation innerhalb der TKB-Domäne

(G306E) ist in der Lage, das onkogene Potential von v-CBL außer Kraft zu setzen (Bonita, 1997; Thien und Langdon, 1997a). Es wurde gefolgert, dass das transformierende Potential auf eine Konkurrenz mit CBL-WT um die TKB-Bindungsstellen zurückzuführen ist und v-CBL die normale Funktion des endogenen CBL-WT blockiert.

Eine weitere natürlich auftretende onkogene Mutante, CBL-70Z, die aus dem '70Z/3 mouse pre-B Zell Lymphom' isoliert wurde, trägt eine 17 AS umfassende Deletion in der Linker-Region und der beginnenden RING-Finger-Domäne (humane AS 366-382) (Andoniou, 1994). NIH3T3 serum-gehungerte Zellen, die CBL-70Z exprimieren, zeigten nach Liganden-Stimulierung einen 10fachen Anstieg in der EGFR-Kinase-Aktivität (Thien und Langdon, 1997b). Die Transformation von NIH3T3-Fibroblasten mit CBL-70Z führte zu einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung endogener zellulärer Substrate, zur konstitutiven Rekrutierung nachgeordneter Signalproteine zum hyperphosphorylierten PDGFR α und zu verstärkter Zellproliferation (Bonita, 1997).

Jedoch konnte gezeigt werden, dass die durch CBL vermittelte Transformation nicht alleine durch eine Störung der RING-Finger-Domäne und der Fähigkeit, E2-Enzyme zu rekrutieren, bedingt ist. So wurden RING-Finger-Mutanten von CBL beschrieben, die bei Expression in NIH3T3-Fibroblasten die CBL-vermittelte Ubiquitinierung des EGFR verhindern und die Internalisierung des Rezeptors stören, jedoch nicht transformierend sind (Thien, 2001). Als bedeutend für die onkogene Transformation kultivierter Zellen wird die Linker-Region, die an die RING-Finger-Domäne angrenzt, angesehen (Thien, 2001; Zheng, 2000).

Ferner sind zahlreiche maligne Erkrankungen bekannt, bei denen onkogene RTKs in CBL vermittelten nachgeordneten Signalwegen defekt sind. In Gehirn-Tumoren wurden onkogene Formen des humanen EGFR sowie in kongenitalen Sarkomen und AML chimäre TrkC-Rezeptoren gefunden, denen die CBL-Bindungsstelle fehlt (Ekstrand, 1992; Wai, 2000). CBL ist direkt mit einem spezifischen phospho-Tyrosinrest am C-Terminus des FMS assoziiert, welcher im retroviralen onkogenen v-Fms fehlt (Mancini, 2002). Die hier gezeigten Beispiele liefern deutliche Hinweise, dass die Entkopplung von CBL und RTKs in einer defekten Regulation der Rezeptor-Aktivität und in onkogener Transformation resultiert. Ferner ist CBL an der Genese von Leukämien beteiligt. CBL ist auf dem menschlichen Chromosom 11q23 lokalisiert, welches häufig mit leukämischen Chromosomenbrüchen assoziiert ist. In Leukämie-Patienten wurden Translokationen (t(4;11);t(11;14)) mit Beteiligung von CBL, interstitielle Deletionen und ein CBL-MLL Fusionsgen beschrieben (Fu, 2003; Savage, 1991). Interessanterweise zeigen ALLs, bei denen diese Region durch Translokationen unterbrochen ist, phänotypische Ähnlichkeiten

mit v-CBL-induzierten pro-B-Zell-Lymphomen: sie koexprimieren myeloische und frühe B-Linien-Oberflächenmarker (Langdon, 1984; Langdon, 1989a; Yunis und Brunning, 1986). Diese Beispiele belegen, dass CBL in vielfältiger Weise an der malignen Transformation von Zellen beteiligt sein kann.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Beteiligung von RTKs an der Pathogenese maligner Neoplasien ist seit langem bekannt. Es wurden mehrere Mechanismen der Transformation von Zellen durch RTKs beschrieben, z.B. Überexpression und aktivierende Mutationen.

Seit der Entdeckung der ersten aktivierenden Mutationen im *FLT3*-Gen, FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutationen in einem Drittel aller adulten Patienten mit AML wurde die funktionelle Relevanz dieser molekularen Alterationen eingehend untersucht. Zahlreiche Studien bestätigten einen pro-proliferativen und anti-apoptotischen Phänotyp *in vitro* und *in vivo*. Durch intensive Erforschung des *FLT3*-Gens konnte in unserer Arbeitsgruppe eine bisher unbekannte Punktmutation in der JM-Domäne von FLT3 identifiziert werden (Spiekermann, 2003b). Ein Screening von AML-Patientenproben identifizierte weitere Fälle von Punktmutationen in dieser Region des FLT3-Proteins. Daraus resultierte die Fragestellung, ob diese Mutationen funktionelle Relevanz in der AML haben. Es sollte untersucht werden, ob eine einzelne Punktmutation in der strukturell wichtigen autoinhibitorischen JM-Domäne von FLT3 zur Autoaktivierung des FLT3-Rezeptors und zur Transformation hämatopoetischer Zellen führen könne.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Hypothese geklärt werden, ob CBL, ein bekannter Negativ-Regulator von RTKs, eine Rolle in der Regulation der FLT3-Rezeptoraktivität hat und ob funktionelle oder strukturelle Alterationen im CBL-Protein zur Transformation FLT3-exprimierender Zellen führen können. Durch eine mögliche Beteiligung von CBL an der Endozytose und Ubiquitinierung sowie Degradierung von FLT3 könnte eine Störung dieser Funktion zur aberranten Aufrechterhaltung der FLT3-Rezeptoraktivität in FLT3-exprimierenden AML-Blasten führen und somit zur malignen Transformation beitragen. Damit würde ein neuer Mechanismus der malignen Transformation FLT3-exprimierender Zellen identifiziert. Weiterhin sollten AML-Zelllinien und Patientenproben auf die Anwesenheit von CBL-Mutationen untersucht werden, um zu klären, ob diese an der Pathogenese der AML beteiligt sein könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Antikörper

Primärantikörper

α - β -Actin (A5441, AC-15)	Maus, monoklonal	Sigma (Taufkirchen)
α -AKT (#9272)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -Bcl-x(L) (H-5, sc-8392)	Maus, monoklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -CBL (C15, sc-170)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -FLT3 (S18, sc-480)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -FLT3 (C20, sc-479)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -HA (HA.11, MMS-101R)	Maus, monoklonal	Covance (Berkeley, USA)
α -HA (Y-11)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -p44/42MAP-Kinase (#9102)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -STAT5 (C17, sc-835)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
normal IgG (sc-2027)	Kaninchen	Santa Cruz (CA, USA)
normal IgG (sc-2025)	Maus	Santa Cruz (CA, USA)

Phosphospezifische Primärantikörper

α -pTyr(PY99) (sc-7020)	Maus, monoklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -pSTAT5 (Tyr-694) (#9351)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -p44/p42 MAP Kinase (#9101)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -pAKT (Ser473) (#9271)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)

Sekundärantikörper

α -Maus IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz (CA, USA)
α -Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Sigma (Taufkirchen)

FACS Antikörper

CD135-PE IgG1 (2234)	Maus	Immunotech (Marseille, FRA)
IgG1-PE Kontrolle (A07796)	Maus	Immunotech (Marseille, FRA)

3.1.2 Plasmide

Expressionsvektoren

pcDNA6A	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pSR α MSVtkneo (pSR α)	siehe (Takebe, 1988); zur Verfügung gestellt von I. Dikic, Institut für Biochemie II, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

Retrovirale Expressionsvektoren

pMSCV-eGFP-IRES (MIG)	'murine stem cell virus'; zur Verfügung gestellt von R.K. Humphries (Terry Fox Laboratory, Vancouver, Kanada)
pMSCV-eYFP-IRES (MIY)	

Verwendete Plasmide

MIY-FLT3-WT	hergestellt in der AG Spiekermann, KKG Leukämie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit; ursprüngliches Konstrukt pcDNA6A-FLT3-WT von D.G. Gilliland (Harvard Medical School, Boston, MA, USA).
-------------	--

FLT3-ITD-Konstrukte:

MIY-FLT3-W51	hergestellt in der AG Spiekermann, KKG Leukämie;
MIY-FLT3-W78	ursprüngliches Konstrukt von D.G. Gilliland, Boston, MA, USA);
MIY-FLT3-NPOS	Abb. 3.1 zeigt die Aminosäuresequenz

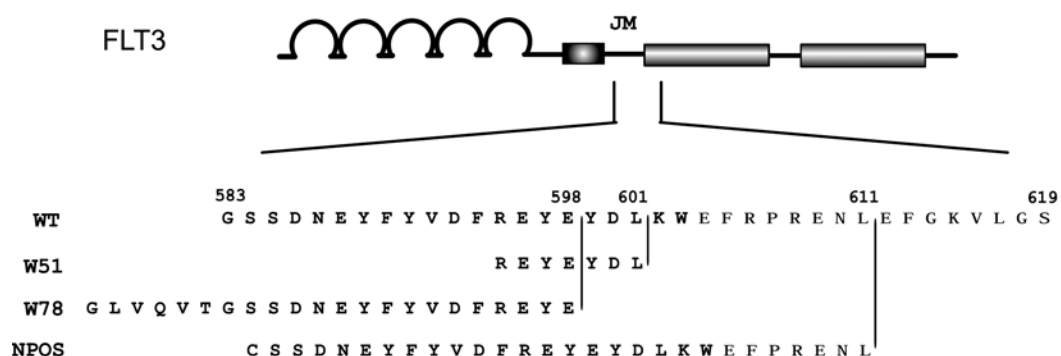


Abb. 3.1 Aminosäuresequenz der verwendeten FLT3-ITD Konstrukte. FLT3-W51 enthält eine 7 AS duplizierte Sequenz (REY EYDL), inseriert zwischen AS 601/602; FLT3-W78 eine 22 AS duplizierte Sequenz (GLVQVTGSSDNEYFYVDFREYE), inseriert zwischen AS 598/599; FLT3-NPOS eine 28 AS duplizierte Sequenz (CSSDNEYFYVDFREY EYDLKWEFPREN L), inseriert zwischen AS 611/612 des humanen FLT3-WT.

FLT3-TKD-Konstrukte:

MIY-FLT3-D835Y hergestellt in der AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY-FLT3-D835V

FLT3-JM-PM-Konstrukte:

MIY-FLT3-V579A in dieser Arbeit hergestellte Konstrukte
MIY-FLT3-F594L
MIY-FLT3-F590GY591D
MIY-FLT3-V592A hergestellt in der AG Spiekermann, KKG Leukämie

Andere FLT3-Konstrukte:

MIY-FLT3-K664R hergestellt in der AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY-FLT3-Y589F
MIY-FLT3-Y599F
MIY-Bcl-x(L) hergestellt in der AG Spiekermann, KKG Leukämie;
ursprüngliches Konstrukt zur Verfügung gestellt von S.J.
Korsmeyer (Howard Hughes Medical Institute, Dana-
Farber Cancer Institut, Harvard Medical School, Boston,
MA)
pcDNA6A-CBL-WT in dieser Arbeit hergestellte Konstrukte; cDNA zur
pcDNA6A-CBL-70Z Verfügung gestellt von I. Dikic, Institut für Biochemie II,
pcDNA6A-CBL-655 Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

MIG-CBL-WT in dieser Arbeit hergestellte Konstrukte
MIG-CBL-70Z
MIG-CBL-655
MIG-vCBL
MIG-vCBLG306E

Alle cDNAs sind humanen Ursprungs.

3.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (München) synthetisiert.
Die Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung angegeben.

Oligonukleotide zur Mutagenese von FLT3

FW FLT3 V579A

5'-GASAGCCAGCTACAGATGGCACAGGTGACCGGCTCCTCAG-3'

RV FLT3 V579A

5'-CTGAGGAGCCGGTCACCTGTGCCATCTGTAGCTGGCTTTC-3'

FW FLT3 F594L

5'-CGGCTCCTCAGATASTGAGTACTTCTACGTTGATTTGAGAGASTATG-3'

RV FLT3 F594L

5'-CATATTCTCTCASATCASC GTAGASGTACTCATTATCTGAGGAGCCG-3'

FW FLT3 590G591D

5'-CCTCAGATASTGAGTACGGCGACGTTGATTTTCAGAGASTATGA-3'

RV FLT3 590G591D

5'-TCATATTCTCTGASATCASC GTCCG TACTCATTATCTGAGG-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung von FLT3

Die cDNA Sequenz von FLT3 wurde mit Hilfe der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, MD, USA) ermittelt (Genbank Accession Nr. NM_004119).

pMSCVkurz

5'-CCCTTGASCCTCCTCGTTCG-3' 1 - 260 BP v. FLT3

pFLT3-2

5'-ASGACCTCGGGTGTGCGTTG-3' 260 - 600 BP

pFLT3-3

5'-ACGCCCTGGTCTGCATATC-3' 600 - 940 BP

pFLT3-4 (843F)

5'-CGGGCTCACCTGGGASTTAG-3' 940 - 1280 BP

pFLT3-5

5'-TTTGCATCATASGCACCAGC-3' 1280 - 1620 BP

pFLT3-6

5'-ATACASTTCCCTTGGCACATC-3' 1620 - 1960 BP

pFLT3-7

5'-ASCAGGAGTCTCASTCCAGG-3' 1960 - 2300 BP

pFLT3-8 (2205F)

5'-CAGCATGCCTGGTTCASGAG-3' 2300 - 2640 BP

pFLT3-9

5'-AGGCATCTACACCATTASGAG-3' 2640 - 2980 BP

Oligonukleotide zur Mutagenese von CBL

FW vCBL

5'-GACTGGCTTATGTGASCCASCTTAGCASGACCATATCASAGTGACCC-3'

RV vCBL

5'-GGGTCACCTTTGATATGGTCTTGCTASGTTGGTTCACATASGCCAGTC-3'

FW CBL-G306E

5'-GGTCAGTGGGCTATTGAGTATGTTACTGCTGATGG-3'

RV CBL-G306E

5'-CCATCAGCAGTASCATACTCASTAGCCCACTGACC-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung von CBL

Die cDNA Sequenz von CBL wurde mit Hilfe der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, MD, USA) ermittelt (Genbank Accession Nr. NM_005188).

pMSCVkurz

5'-CCCTTGASCCTCCTCGTTCG-3'

CBL_Sequ1

5'-CTGCTTCTCTCCCTCGCTC-3'

CBL_Sequ2

CACTATTGATCTGACCTGCASTGA-3'

CBL_Sequ3

5'-GGCTGGTGCCASGGTGGAS-3'

CBL_Sequ4

5'-CCTCTACGGCCTTTGGATACAT-3'

Oligonukleotide zur Amplifikation von CBL Exon 7 - 9

FW CBL_Exon8del

5'-TCCCTCACASTASACCTCTCTTCC-3'

RV CBL_Exon8del

5'-GCCATGGAGASTGGAGASGGC-3'

3.1.4 Zelllinien

Human

HEK-293	embryonale Nierenepithel-Zelllinie (Graham, 1977)
MOLM-13	akute myeloische Leukämie-Zelllinie, aus peripherem Blut eines 20-jährigen Mannes mit AML FAB M5a etabliert (Matsuo, 1997)

Murin

Ba/F3	IL-3-abhängige pro-B Zelllinie
WEHI-3B	myelomonozytische Leukämie-Zelllinie (Warner, 1969); makrophagen-ähnliche Zellen aus einer BALB/c-Maus; Zellen produzieren den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren IL-3

3.1.5 Chemikalien, Enzyme, Inhibitoren, Zytokine

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 30%	(Roth, Karlsruhe)
Agarose	(Sigma, Taufkirchen)
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	(BioRad, München)
Aprotinin	(Sigma, Taufkirchen)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagenz	(BioRad, München)
Bovinseralbumin (BSA)	(Fluka, Buch, Schweiz)
Bromphenolblau	(Sigma, Taufkirchen)
BS3 (Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat)	(Pierce, Rockford, USA)
Dimethylsulfoxid	(Sigma, Taufkirchen)
1,4-Dithioerythritol	(Merck, Darmstadt)
DNA Leiter	(Promega, Mannheim)
dNTPs	(Roche, Mannheim)
ECL Detektionsreagenz	(Amersham Pharmacia, Freiburg)
EGTA (Ethylen Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)	(Sigma, Taufkirchen)
Essigsäure	(Merck, Darmstadt)
Ethanol	(Merck, Darmstadt)
Fötale Kälberserum (FKS)	(Sigma, Taufkirchen)
Glycerin	(Sigma, Taufkirchen)

HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid))	(Sigma, Taufkirchen)
High Performance Chemiluminescence Film	(Amersham Pharmacia, Freiburg)
Leupeptin A	(Sigma, Taufkirchen)
2-Mercaptoethanol	(Sigma, Taufkirchen)
Methanol	(Merck, Darmstadt)
Natriumacetat	(Sigma, Taufkirchen)
Natriumazid	(Roth, Karlsruhe)
Natriumcitrat	(Sigma, Taufkirchen)
Natriumfluorid	(Sigma, Taufkirchen)
tetra-Natriumdiphosphatdekahydrat	(Sigma, Taufkirchen)
Natriumvanadat	(Sigma, Taufkirchen)
N-Ethylmaleimid	(Sigma, Taufkirchen)
Nitrocellulose Membran	(Schleicher&Schüll, Dassel)
NP-40	(Sigma, Taufkirchen)
Okadaische Säure	(Roche, Mannheim)
Pepstatin A	(Sigma, Taufkirchen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	(Sigma, Taufkirchen)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	(Sigma, Taufkirchen)
Ponceau	(Sigma, Taufkirchen)
Polyfect Transfektionsreagenz	(Qiagen, Hilden)
Polybren	(Sigma, Taufkirchen)
Proteinase Inhibitor Cocktail (P8340)	(Sigma, Taufkirchen)
Protein G-Agarose	(Roche, Mannheim)
Protein A-Agarose	(Roche, Mannheim)
Propidiumiodid-Lösung	(Sigma, Taufkirchen)
Rainbow Marker	(Amersham, Freiburg)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	(BioRad, München)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	(Serva, Heidelberg)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	(Merck, Darmstadt)
Triton-X-100	(Sigma, Taufkirchen)
Trypan Blau	(Invitrogen, Karlsruhe)
Tween 20	(Merck, Darmstadt)
Zellproliferations-Reagenz WST-1	(Roche, Mannheim)

Enzyme

Taq DNA Polymerase	(Roche, Mannheim)
Pfu Turbo DNA Polymerase	(Stratagene, Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	(Roche, Mannheim)
T4-DNA-Ligase	(Fermentas, St.Leon-Rot)
Restriktionsenzyme	(NEB, Frankfurt)

Inhibitoren

Imatinib (STI571)	(Novartis, Basel, Schweiz)
LY294002	(Calbiochem, Schwalbach)
MG-132	(Calbiochem, Schwalbach)
PD98059	(Calbiochem, Schwalbach)
PKC412 (CGP 41251)	(Novartis, Basel, Schweiz)
Rapamycin	(Calbiochem, Schwalbach)
SU5614	(Calbiochem, Schwalbach)
SU6656	(Calbiochem, Schwalbach)

Die verwendeten Inhibitoren wurden nach Herstellerangaben in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Inhibitoren sofort verwendet und Reste verworfen. Verdünnungen wurden mit dem entsprechenden Zellkultur-Medium hergestellt. Die empirisch ermittelte Toxizitätsgrenze von 0,25 % DMSO im Medium für die behandelten Zellen wurde nicht überschritten.

Zytokine

FLT3-Ligand (FL), rekombinant human	(Promocell, Heidelberg)
Interleukin-3 (IL-3), rekombinant murin	(Biosource, Camarillo, USA)

Die Zytokine wurden in lyophilisiertem Zustand erworben und in 0,1 % BSA-Lösung rekonstituiert. Aliquots wurden bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden sie bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

3.1.6 Kits

Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I	(BecktonDickinson, Heidelberg)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	(Appl. Biosystems, FosterCity, USA)

PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen, Hilden)
Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit	(Qiagen, Hilden)
Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAprep-spin Miniprep Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen, Hilden)
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	(Stratagene, Heidelberg)

3.1.7 Laborausstattung

Bakterien-Brutschrank	(Heraeus, Osterode)
Blotting-Kammer	(BioRad, München)
CO ₂ -Inkubator für Zellkultur	(Heraeus, Osterode)
DNA-ThermoCycler	(Perkin-Elmer, Überlingen)
Entwicklermaschine M35X-OMAT Processor	(Kodak, Stuttgart)
Eppendorf Ultrazentrifuge 2K15	(Sigma, Taufkirchen)
Expositionskassetten	(Amersham, Pharmacia, Freiburg)
FACS Calibur	(Beckton Dickinson, Heidelberg)
FACS Sorter	(Beckton Dickinson, Heidelberg)
Flow Hood Werkbank	(Bio Flow Technik, Meckenhein)
Flüssigstickstofftank	(Cryoson, Schöllkrippen)
Fluoreszenzmikroskop	(Carl Zeiss, Jena)
Gefrierschränke (-80°C) UF80-450S	(Colora Messtechnik, Lorch)
Gelelektrophoresekammer	(Owl Sep. Systems, Portsmouth, USA)
Heizblock BT 130-2	(Haep Labor Consult, Bovenenden)
Kühl-/Gefrierschränke (4°C, -20°C)	(Siemens, Erlangen)
Kühlzentrifuge	(Eppendorf, Hamburg)
Mikroskop	(Carl Zeiss, Jena)
pH-Meter 766	(VWR International, Ismaning)
Proteingelelektrophoresekammer	(BioRad, München)
Rotor Ti 75	(Beckman, Palo Alto, CA, USA)
Schüttler	(Edmund Bühler, Tübingen)
Sequenzierer (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)	(Appl. Biosys, ForsterCity, USA)
Spektrphotometer Smartspec TM 3000	(BioRad, München)
Ultrazentrifuge L7-65	(Beckman, Palo Alto, CA, USA)

Vortexer	(Cenco, Breda, Niederlande)
Wasserbad	(HASKE, Karlsruhe)
Zentrifugen ROTIXA/P	(Hettich, Tuttlingen)

3.1.8 Software

Adobe Illustrator	(Adobe Systems, Unterschleißheim)
Adobe Photoshop	(Adobe Systems, Unterschleißheim)
BioEdit 7.0	(ISIS Pharmaceutica, Carlsbad, USA)
Cellquest 3.3	(Beckton Dickinson, Heidelberg)
EndNote 6.0.2	(Thompson ISI, Carlsbad, CA, USA)
Microsoft Office 2000	(Microsoft, Redmond, WA, USA)
SigmaPlot 6.0	(SPSS Incorporated, Chicago, USA)
TINA 2.0	(Raytest, Straubenhardt)
WinMDI 2.8	(Joseph Trotter)

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterienkultur

3.2.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen

Bakterien wurden entweder auf LB-Agar-Platten im 37°C Brutschrank oder als Suspensionskultur in LB-Medium im Thermoschüttler bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Suspensionskulturen wurden durch Picken einer einzelnen Bakterienkolonie einer LB-Agar-Platte und Infektion von LB-Medium erhalten. Transformierte Bakterien konnten aufgrund der Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids durch Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin zum LB-Medium selektioniert werden. Die Lagerung der Bakterien über längere Zeiträume erfolgte auf Agar-Platten bei 4°C.

LB-Medium:	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,0
LB-Agar-Platten:	15 g Agar auf 1 l LB-Medium

3.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Behandlung von *E.coli*-Zellen mit Ca^{2+} -Ionen bewirkt aufgrund eines bisher nicht verstandenen Mechanismus, dass die Zellen mit hoher Effizienz Plasmid-DNA aufnehmen können.

Zur Expansion der Bakterien wurden 10 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) mit kompetenten Zellen eines *E.coli*-Stammes (*E.coli* XL-1 blue oder *E.coli* XL-10 Gold) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur 1:10 mit LB-Medium verdünnt und bei Erreichen einer Konzentration von ca. 1×10^9 Zellen pro ml (OD_{580} von 0,5 bis 0,9) 15 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Zellen bei 1000 g für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden die Zellen in 50 ml eiskaltem, sterilen Tfb I-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in eiskaltem Tfb II-Puffer aufgenommen. Aliquots von 100 µl wurden sofort auf Trockeneis oder flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tfb I:	30 mM KOAc, 100 mM KCl, 50 mM MnCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 15 % (v/v) Glycerin (Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C)
Tfb II:	5 ml 1 M NaMOPS (pH 7,0), 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin (Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C)

3.2.1.3 Transformation der kompetenten *E.coli*-Bakterien

Zur Transformation der Bakterien wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Für einen 50 µl Ansatz wurden 5 µl 5xKCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl_2 , 250 mM MgCl_2) und ca. 1 µg DNA (oder 10 µl Ligationsansatz oder 20 µl Mutagenese-PCR Produkt) mit Aqua dest. auf 25 µl Volumen aufgefüllt und mit 25 µl kompetenten Zellen versetzt. Der Ansatz wurde erst 20 min auf Eis, dann weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 250 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) zugefügt und zur Expression des Resistenzgens (meist β -Lactamase) 1 h bei 37°C geschüttelt. 150 µl des Transformationsansatzes wurden zur Selektion positiver Klone auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum (meist Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Waren Bakterien gewachsen, konnten am nächsten Tag Einzelkolonien isoliert werden und zur Präparation von Plasmid-DNA weiter expandiert werden.

3.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim, 1983).

3.2.1.4.a Mini-Präparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA in kleinerem Maßstab (Mini-Präparation) wurden 4 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Es wurde entweder das 'QIAprep Spin Miniprep Kit' (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet oder wie nachfolgend beschrieben mit selbst hergestellten Puffern gearbeitet. Die Bakterien der Übernacht-Kultur wurden in einem Eppendorf-Gefäß in der Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl E1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 300 µl frisch zubereiteter E2-Puffer zugegeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Lösung durch Zugabe von 300 µl E3-Puffer neutralisiert, durch leichtes Schwenken vorsichtig gemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die entstandene Debris (Zellreste und chromosomale DNA) wurde durch 20 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit abgetrennt und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die im Überstand gelöste DNA wurde dann durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen Isopropanol gefällt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit wurde die pelletierte DNA in 500 µl 70%igem Ethanol resuspendiert, erneut abzentrifugiert und anschließend an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer vollständig aufgelöst. Es wurde eine maximale Ausbeute von 20 µg DNA erzielt.

E1-Puffer:	50 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase, pH 8,0
E2-Puffer:	200 mM NaOH, 1 % SDS
E3-Puffer:	3,1 M Kaliumacetat, pH 5,5
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,5)

3.2.1.4.b Maxi-Präparation

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine einzelne Kolonie einer Selektionsplatte gepickt, eine 5 ml Vorkultur angeimpft und für 2 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Vorkultur wurde dann vollständig in 100 ml LB-Medium gegossen und über Nacht erneut bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Isolation der Plasmid-

DNA erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe des 'Qiagen Maxiprep Kits' (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die DNA wird dabei an eine Anionen-Austauscher Säule unter geeigneten Niedrig-Salz-Bedingungen und entsprechendem pH-Wert gebunden. Nach Waschen der DNA kann diese dann durch einen Hoch-Salz-Puffer eluiert werden. Es wurde eine maximale Ausbeute von 20 - 500 µg Plasmid-DNA erzielt.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Gegenwart von 5 % CO₂ kultiviert. Den verwendeten Kulturmedien, RPMI-1640 und DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), wurde 10 % fötales Kälberserum (FCS) sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugesetzt (Vollmedium).

3.2.2.1.a Adhärent wachsende Zelllinien

Die humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie 293 wurde in DMEM-Vollmedium kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen 1:5 verdünnt. Um die Zellen vom Kulturgefäß zu lösen, wurden sie einmal mit DPBS gewaschen, für 5 min mit Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt, dieses mit frischem DMEM-Vollmedium verdünnt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Ein Fünftel der Zellsuspension wurde in einem neuen Kulturgefäß ausgesät.

Die murine myelomonozytische Leukämie-Zelllinie WEHI-3B wurde in RPMI-1640 Vollmedium kultiviert. Die runden Einzel-Zellen wachsen zum überwiegenden Teil adhärent und zum Teil in Suspension. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen 1:5 verdünnt. Da die Zellen Trypsin-sensitiv sind, erfolgte das Ablösen der Zellen durch 10 min Inkubation in PBS (ohne Ca²⁺ oder Mg²⁺) und anschließendes Abschaben mit einem Zellschaber. Ein Fünftel der Zellsuspension wurde in einem frischen Kulturgefäß ausgesät. WEHI-3B-Zellen produzieren murines IL-3 und die Kultur diente als IL-3-Quelle zur Kultivierung der IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen.

3.2.2.1.b Suspensionszelllinien

Die IL-3-abhängige murine pro-B-Zelllinie Ba/F3 wurde in RPMI-Vollmedium mit Zusatz von 10 % WEHI-3B-konditioniertem Medium als Quelle des murinen IL-3 kultiviert. Die Ba/F3-Zellen wurden alle zwei bis drei Tage 1:20 gesplittet.

Die AML-Zelllinie MOLM-13 wurde in RPMI-1640 unter Zusatz von 20 % fötalem Kälberserum (FCS) sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert und alle drei Tage 1:3 gesplittet.

3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellstocks können für mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. $1 - 2 \times 10^7$ Zellen wurden pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, die Zellsuspension in 1,5 ml-Einfriergefäße (Nunc-Cryotube™) transferiert und diese in einem speziellen Einfriercontainer (Nalgene™Cryo 1°C Freezing Container) bei -80°C eingefroren. Der Einfriercontainer, der Isopropanol enthält, gewährleistet eine langsame Abkühlgeschwindigkeit von -1°C pro Minute. Zellen, die zur Langzeitlagerung bestimmt waren, wurden innerhalb einer Woche von -80°C in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension, die das zelltoxische DMSO enthält, wurde sofort mit 20 – 25 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 rpm (210 g) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Medium resuspendiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen vor Ansatz eines Experiments mindestens 3 Tage kultiviert.

Einfriermedium: 90 % FCS, 10 % DMSO

3.2.2.3 Transfektion von 293-Zellen

293-Zellen sind leicht und mit hoher Effizienz transfizierbar. Sie wurden zur Überexpression von Proteinen und als Verpackungszelllinie zur Produktion von retroviralem Überstand für die stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen verwendet. Zur Überexpression von Proteinen musste die cDNA in eukaryotischen Expressionsvektoren (z.B. pCDNA6, pSRaneo) vorliegen. Zur stabilen Transduktion von Ba/F3-Zellen durch retroviralen Gentransfer wurde die cDNA in die 'multiple cloning site' (MCS) des pMSCV ('murine stem cell virus')-Vektors kloniert (Abb. 3.2, S.32).



Abb. 3.2 Retrovirale Expressionsvektoren MIY (pMSCV-IRES-YFP, YFP exprimierend) und MIG (GFP exprimierend). In die 'multiple cloning site' wurde das 'gene of interest' kloniert. Erläuterung s. Text

Strangabwärts zur MCS befindet sich eine IRES ('internal ribosome entry site')-Sequenz und die codierende Sequenz für 'YFP' oder 'GFP' ('yellow fluorescent protein' bzw. 'green fluorescent protein'), so dass eine simultane Expression des 'gene of interest' und des Reportergens gegeben ist, die später eine Selektion positiver Zellen anhand der Fluoreszenz erlaubt. Die LTRs ('long terminal repeats') sind regulatorische Sequenzen, wobei der 5'-LTR Promotorfunktion besitzt und der 3'-LTR die Sequenz für die Transkriptionstermination enthält. Um die Bildung replikationskompetenter Retroviren zu vermeiden, fehlen dem Vektor Sequenzen, die für die Verpackungsproteine kodieren. Zur Produktion von Retroviren wurde daher DNA in Form des kommerziell erhältlichen EcoPack® (Clontech, Heidelberg) kotransfiziert, die die entsprechenden gag-, pol- und env-Sequenzen enthält.

3.2.2.3.a Überexpression von Proteinen

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen (5×10^5 Zellen pro well einer 6-well-Platte oder $1,2 \times 10^6$ Zellen pro 60 mm Platte) ausgesät. Am nächsten Tag sollten sie gut an der Oberfläche des Kulturgefäßes adhärirt und zu 60 – 70 % konfluent gewachsen sein. Zur Transfektion wurde entweder das Transfektionsreagenz Lipofect® (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben oder die Methode der Calciumphosphatpräzipitation (Graham und van der Eb, 1973) verwendet. Zur Transfektion von 5×10^5 Zellen mit Calciumphosphat wurden $54 \mu\text{l}$ 250 mM CaCl_2 -Lösung und $2 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA gut gemischt. Nach Zugabe von $54 \mu\text{l}$ HBS-Lösung wurde das Gemisch gevortext und zur Komplexbildung für 5 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 2 ml frisches DMEM-Medium zugegeben. Das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden mit dem Transfektionsgemisch für 12 – 18 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das Transfektionsgemisch abgenommen, die Zellen mit frischem DMEM-Medium versetzt und

die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und auf die Expression der Proteine überprüft.

3.2.2.3.b Produktion von Retroviren

Zur Produktion von Retroviren wurden die Zellen wie unter 3.2.2.3.a beschrieben transfiziert, nur wurde zusätzlich zur Plasmid-DNA 2 µg EcoPack®, zur Bildung der viralen Verpackungsproteine, kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurde der retrovirale Überstand von den Zellen abgenommen und steril filtriert. Er konnte dann zur stabilen Transduktion von Ba/F3-Zellen verwendet werden. Wurde der retrovirale Überstand nicht sofort weiter verwendet, wurde er bei –80°C gelagert.

3.2.2.4 Stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen

Die Transduktion von Ba/F3-Zellen mit retroviralem Überstand wurde in drei Parallelansätzen durchgeführt. In einer 48-well-Platte wurden je 200 µl Zellsuspension (Konzentration $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml) mit je 200 µl retroviralem Überstand (s. 3.2.2.3.b) gemischt, mit 8 µl Polybren-Lösung (Hexadimethrinbromid, Konzentration 8 µg/ml) versetzt und im Brutschrank kultiviert. Nach 8 – 12 h wurde je well 1 ml RPMI-Vollmedium zugegeben, um das Polybrene zu verdünnen. 48 h nach Transduktion wurden die drei Ansätze gepoolt und die Zellen bis zur Sortierung im FACS (‘Fluorescence Activated Cell Sorter’) in Zellkulturflaschen expandiert.

3.2.2.5 Sortierung der Zellen im FACS

Nach 5 Tagen wurden die transduzierten Ba/F3-Zellen mit Hilfe des FACS-Vantage SE Durchflusszytometers (Beckton Dickinson, Heidelberg), ausgestattet mit einem Turbo-Sort Device (erlaubt die Sortierung von 20.000 Zellen/s), und der Cellquest 3.3 Messsoftware anhand der YFP/GFP-Expression sortiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und in RPMI-Vollmedium, unter Zusatz von 1 µg/ml Propidiumiodid (zur Markierung nicht-viabler Zellen) aufgenommen. Die sortierten YFP/GFP positiven Zellen wurden expandiert und 3 Tage nach Sortierung im Analyse-Durchflusszytometer FACS Calibur (Beckton Dickinson, Heidelberg) auf die Reinheit der Population überprüft. Es wurde nur mit Zellpopulationen gearbeitet, die > 95 % YFP/GFP-positive Zellen enthielten.

3.2.2.6 Bestimmung der Lebendzellzahl (Proliferationsexperimente)

Die Bestimmung der Lebendzellzahl ist in der Zellkultur häufig notwendig, z.B. beim Aussäen von Zellen und Auszählen von Proliferationsexperimenten. Proliferationsexperimente wurden mit infizierten Ba/F3-Zellen unter verschiedensten Bedingungen durchgeführt, z.B. in Anwesenheit spezifischer Zytokine und Inhibitoren.

3.2.2.6.a Trypan-Blau-Exklusion

Eine Methode zur Bestimmung der Lebendzellzahl ist der Trypan-Blau-Exklusions-Test. Der Farbstoff Trypan-Blau kann die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren, jedoch in tote Zellen eindringen, deren Membran porös ist. Tote Zellen erscheinen daher im Lichtmikroskop blau, lebende Zellen farblos. Zellsuspension und Trypan-Blau wurden in einem definierten Verhältnis gemischt, 10 µl der Mixtur in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und lebende Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Formel zur Berechnung der Lebendzellzahl/ml lautet: Lebendzellzahl/ml = Anzahl lebender Zellen / 4 x Verdünnungsfaktor x 10.000

Für Proliferationsexperimente mit Ba/F3-Zellen wurden standardmäßig 4×10^4 Zellen pro ml Medium ausgesät und nach 72 h die Lebendzellzahl bestimmt.

Trypan-Blau: 0,4 % in wässriger NaCl-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe)

3.2.2.6.b WST-Assay

Der WST-Assay erlaubt die spektrophotometrische Quantifizierung des Zellwachstums und der Viabilität von Zellen in Proliferationsexperimenten. Das hellrote Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat) wird von zellulären Enzymen zu dunkelrotem Formazan (Absorptionsmaximum bei 450 nm) gespalten. Eine Expansion viabler Zellen führt zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität mitochondrialer Dehydrogenasen im Ansatz. Die Erhöhung der Enzymaktivität führt zu einer größeren Menge an gebildeten Formazan, welches direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen in Kultur korreliert.

Das Zellproliferations-Reagenz WST-1 (Roche, Mannheim) wurde zur Bestimmung der Zellviabilität von Ba/F3-Zellen eingesetzt. Die optimalen Bedingungen für diese Zelllinie, insbesondere Zelldichte und Inkubationszeit mit WST-1-Reagenz, wurden zu Beginn in

Testreihen bestimmt. In einer 96-well-Platte mit flachem Boden wurden je well 2000 Zellen ausgesät, je nach Versuch mit Zytokinen bzw. Inhibitoren versetzt, auf ein Gesamtvolumen von 100 µl Medium aufgefüllt und im Brutschrank kultiviert. Nach 72 h wurden je well 10 µl WST-1-Reagenz zugesetzt und die Platte für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde vor der Messung geschüttelt, um eine homogene Lösung zu erhalten und dann am ELISA-Reader vermessen. Jeder Wert wurde parallel 3x angesetzt. Als Blank-Kontrolle wurden mehrere wells ohne Zellen mit Medium alleine und WST-1-Reagenz gemessen. Der Mittelwert der Blank-Kontrolle wurde vom Mittelwert der drei Messwerte jedes Ansatzes abgezogen.

3.2.2.7 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Zellkultur

3.2.2.7.a Apoptose-Test mit Annexin- und 7-AAD-Färbung

Zur Detektion apoptotischer Zellen in einer Kultur wurde der 'Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit' (BD Biosciences, Heidelberg) nach Herstellerangaben verwendet. Der Test beruht auf einer Doppelfärbung apoptotischer bzw. toter Zellen mit Annexin V-PE (Annexin-V konjugiert mit Phycoerythrin) und 7-AAD (7-Amino-actinomycin D) und anschließender Analyse im Durchflusszytometer. Im Frühstadium der Apoptose wird bei noch intakter Zellmembran ein Zusammenbrechen der Membran-Asymmetrie beobachtet, indem das Phosphatidylserin (PS), welches sich bei lebenden Zellen im inneren Blatt der Plasmamembran befindet, in das äußere Blatt umgelagert wird (Martin, 1995). Annexin V-PE bindet Ca^{2+} -abhängig an das zur äußeren Zellumgebung hin exponierte PS und kann aufgrund der Konjugation mit dem Fluorochrom Phycoerythrin (PE) im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. 7-AAD ist ein langwellig emittierender Vitalfarbstoff, der tote Zellen anfärbt, jedoch die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Die Doppelfärbung mit Annexin-V-PE und 7-AAD erlaubt demnach die Identifikation drei unterschiedlicher Zellpopulationen: Lebende Zellen sind Annexin V-PE und 7-AAD negativ; Zellen im früh-apoptotischen Stadium sind Annexin V-PE positiv und 7-AAD negativ; Zellen im spät-apoptotischen Stadium sind Annexin V-PE positiv und 7-AAD positiv. Dieser Test ist sehr sensitiv und erfasst auch früh-apoptotische Zellen, die in anderen Tests, die z.B. DNA-Fragmentierung nachweisen, nicht detektiert werden können. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal FL-2 (detektiert Annexin V-PE) und Fluoreszenzkanal FL-3 (detektiert 7-AAD). Zur korrekten Einstellung des Geräts wurden vor jeder Messung ungefärbte bzw. einfach gefärbte Zellen gemessen.

Bestimmt wurde der Prozentsatz früh- und spät-apoptotischer Zellen jeder Zellpopulation. Zellen, die in der Kontrollpopulation bereits tot waren (7-AAD positiv), wurden von den anderen Populationen subtrahiert. Die Auswertung der Dotplots erfolgte mit Hilfe der WinMDI Software.

3.2.2.7.b Färbung der Zellnuclei mit Propidiumiodid (Zellzyklusanalyse)

Ein weiterer Marker, der im apoptotischen Prozess später als das Zusammenbrechen der Membransymmetrie auftritt, ist die Fragmentierung chromosomaler DNA durch spezielle apoptotische Endonukleasen (Wyllie, 1980). Die Färbung der Zellnuclei mit Propidiumiodid, das in die DNA interkaliert, erfolgte nach Nicoletti et al. (Nicoletti, 1991). 5×10^5 Zellen wurden ausgesät, entsprechend den Versuchsbedingungen mit Zytokinen versetzt und im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen gezählt, jeweils die gleiche Zellzahl pro Ansatz bei 4°C abzentrifugiert, 1x mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in 500 μl Propidiumiodid-Lysispuffer resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen am FACS Calibur Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal FL-3 gemessen. Bei Darstellung im Histogramm, wobei auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität und auf der y-Achse die Anzahl der Ereignisse aufgetragen ist, ergibt sich eine charakteristische Verteilung der Zellen (Abb. 3.3).

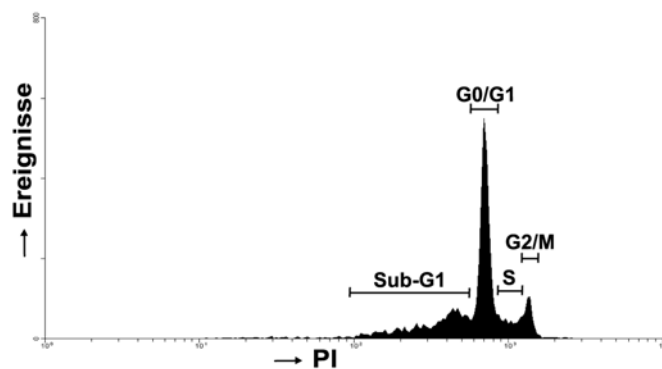


Abb. 3.3 Charakteristische Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Erläuterung s. Text

Der erste Peak repräsentiert Zellen in der G_0/G_1 -Phase, der zweite Peak mit ungefähr doppelter Fluoreszenzintensität Zellen in der G_2/M -Phase. Zellen in der S-Phase zeigen eine Fluoreszenzintensität zwischen diesen beiden Peaks.

Apoptotische Zellen weisen einen DNA-Gehalt auf, der niedriger ist als der DNA-Gehalt der Zellen in G_1 -Phase und heißen daher auch Sub- G_1 -Zellen. Zur Bestimmung der Anzahl

apoptotischer Zellen wird daher der Bereich der hypodiploiden Nuclei Sub-G₁ unterhalb des G1-Peaks quantifiziert.

Propidiumiodid-Lysispuffer: 0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100, 20 µg/ml Propidiumiodid, pH = 8,0

3.2.2.8 Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie

Die Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie wurde verwendet um die Expression des membrangebundenen FLT3-Rezeptors zu überprüfen. 1×10^6 Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und anschließend bei RT im Dunkeln für 15 min mit spezifischem PE markiertem FLT3-Antikörper (CD135-PE) inkubiert. Als Isotyp-Kontrolle zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung wurde ein zweiter Ansatz der gleichen Zellen mit murinem IgG1-PE gefärbt. Nach Inkubation wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und im FACS Calibur Durchflusszytometer gemessen.

3.2.2.9 Internalisierung des FLT3-Rezeptors

Die Internalisierung des FLT3-Rezeptors wurde durch Detektion des Oberflächenantigens und anschließender Messung im FACS Calibur Durchflusszytometer bestimmt. Pro Ansatz wurden 3×10^5 Zellen in 100 µl Puffer I aufgenommen und mit 100 ng FL für verschiedene Zeitintervalle (5, 10, 15, ... bis zu 60 min) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Puffer II gestoppt. Jeder Ansatz wurde 3x mit 1 ml Puffer II gewaschen, danach in 250 µl PBS aufgenommen und wie unter 3.2.2.8 beschrieben mit CD135-Antikörper gefärbt und im FACS Calibur Durchflusszytometer gemessen.

Puffer I: PBS + 5 % FCS

Puffer II: PBS + 0,1 % Natriumazid

3.2.2.10 Hungern der Zellen vor der Zellyse

Zur Analyse phosphorylierter Signalproteine spezifischer Signalwege war es nötig, die Zellen vor der Zellyse zu hungern, um den Hintergrund an phosphorylierten Proteinen zu reduzieren. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend in Hungermedium kultiviert. Die maximale Zeit, die eine Zelllinie ohne sichtbare

morphologische Veränderung der Zellen gehungert werden konnte, wurde empirisch bestimmt. Ba/F3-Zellen wurden für 24 h, 293-Zellen für 4 h gehungert.

Hungermedium: RPMI-1640 oder DMEM + 0,3 % FCS + 50 U/ml Penicillin + 50 U/ml Streptomycin

3.2.2.11 Stimulierung der Zellen vor der Zelllyse mit Zytokinen oder Inhibitoren

Vor der Zelllyse wurden Zellen häufig mit Zytokinen bzw. Inhibitoren behandelt. Die Zytokin-Stimulierung diente meist als Kontrolle, um zu zeigen, dass Signalwege in Anwesenheit von Zytokinen induzierbar sind. Inhibitoren wurden verwendet, um eine Downregulation von Signalwegen zu zeigen oder, wie im Falle von MG-132, die proteasomale Degradierung der Proteine zu blockieren

Für die Zytokin-Stimulierung wurden die Zellen in 1 ml Hungermedium aufgenommen und für 5 min mit einer definierten Menge an Zytokin im Brutschrank inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis in Lysispuffer (siehe 3.2.4.1) lysiert.

Die Behandlung mit Inhibitoren erfolgte für Ba/F3-Zellen in 1 ml Medium, für 293-Zellen in minimalem Volumen, so dass die Zellen gerade noch bedeckt waren. Folgende Konzentrationen und Dauer der Inkubation wurden verwendet: 50 nM PKC412 für 2 h, 50 µM MG-132 für 2 h.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen

Die nach Mini- oder Maxipräparation erhaltene Plasmid-DNA wurde durch enzymatische Restriktionsanalyse auf ihre Identität überprüft. Es wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Frankfurt) verwendet und die Bedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Der Restriktionsansatz wurde anschließend auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente durch Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert. DNA, die zur anschließenden Klonierung in einen Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut wurde, wurde nach dem Verdau auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des 'Gel Extraction Kits' (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

3.2.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA wurden pro Versuch standardmäßig drei Reaktionen mit einem Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA von 1:3, 1:5 und 1:10 sowie eine Reaktion ohne Insert (Religationskontrolle) angesetzt. Die Ligation von überhängenden Enden wurde mit der T4-Ligase von Roche (Mannheim) nach den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Initial wurden beide DNA-Fragmente gemischt, für 5 min bei 45°C inkubiert ('Annealing') und auf Eis mit Ligase und Ligase-Puffer versetzt. Die Ligation erfolgte für 4 h bei 16°C. Für die blunt-end Ligation wurde die T4-Ligase von Fermentas (St.Leon-Roth) in den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen verwendet, der Ansatz über Nacht bei RT und für weitere 5 h bei 16°C am folgenden Tag inkubiert. Vor der Transformation in Bakterien wurden die Enzyme für 10 min bei 65°C inaktiviert. Um die Religation linearisierter Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung des 5'-Endes durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau mit 1 U Alkalischer Phosphatase ('calf intestinal alkaline phosphatase', CIP) für 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde anschließend 1 µl 0,5 M EDTA-Lösung zugegeben und 10 min bei 65°C erhitzt. Um die Ligation nicht-kompatibler überhängender Enden zu ermöglichen, mussten universell kompatible glatte Enden produziert werden. Dazu wurde die Klenow-DNA-Polymerase verwendet, die DNA-Polymerase- und 3'-5'-Exonuclease-Aktivität hat. Die linearisierte DNA wurde mit 1 U Klenow-DNA-Polymerase (New England Biolabs) für 1 h bei 37°C in Klenow-Puffer inkubiert.

3.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt die Amplifikation eines DNA-Fragments ('Template') über einen Bereich, der von zwei dem Template komplementären Oligonukleotiden ('Primer') flankiert wird. Durch Einsatz einer temperaturstabilen DNA-Polymerase lassen sich in einer zyklischen Abfolge von Aufschmelzen (Denaturierung) des Templates, Anlagerung ('Annealing') der Primer und sukzessiver DNA-Polymerisation (Elongation) auch sehr geringe DNA-Mengen hochspezifisch vervielfältigen (Mullis, 1986). Die PCR wurde in den verschiedensten Bereichen angewendet, z.B. zur Klonierung und DNA-Analyse. Die Schmelztemperatur (T_M) der Primer wurde mit dem „ T_M Calculator for Oligos“ (Biomath Calculators, Promega, Mannheim) berechnet und die optimale Annealing-Temperatur (ca. 5°C niedriger als T_M) empirisch bestimmt. Für Standardanwendungen wurde die Taq-DNA-Polymerase

verwendet, für Klonierungen und Mutagenese (s. 3.2.3.4) die Pfu-DNA-Polymerase. Für eine Standardreaktion wurden 20 ng - 0,5 µg Template-DNA, je 10 pM Primer, je 200 µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 2,5 U DNA-Polymerase eingesetzt. Die PCR wurde in einem ThermoCycler durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte initial für 5 min, darauffolgend jeweils 30 s pro Zyklus. Das Annealing erfolgte je Zyklus für 30 s bei der für die Primer spezifischen Temperatur, gefolgt von der Elongation, deren Zeit und Temperatur abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase und dem zu amplifizierenden Fragment war. Die Taq-Polymerase arbeitet optimal bei 72°C mit einer Geschwindigkeit von 1,5 kBP/min, die Pfu-Polymerase nahe 75°C mit einer Geschwindigkeit von 500 BP/min. Standardmäßig wurden 30 Zyklen durchgeführt, gefolgt von einer finalen Elongation über 5 min, um eine komplette Synthese zu gewährleisten.

3.2.3.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA wurde das 'QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit' von Stratagene (La Jolla) verwendet. In einer PCR-Reaktion wird doppelsträngige Plasmid-DNA mit zwei Oligonukleotiden, die die gewünschte Mutation enthalten, amplifiziert. Die beiden komplementären Oligonukleotide sollten eine Länge von 30 bis 45 Nucleotiden haben und eine Schmelztemperatur $\geq 78^\circ\text{C}$. Die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase repliziert beide Plasmid-Stränge ohne die mutanten Oligonukleotide zu ersetzen. Nach der Amplifikation im Thermo-Cycler wird die parentale Plasmid-DNA mit *DpnI*, einer für methylierte DNA spezifischen Endonuklease, verdaut. Pro 50 µl Ansatz wurden 10 – 100 ng DNA mit je 10 pM Primer und 5 µl 5x Puffer in einem Volumen von 45 µl gemischt. Nach initialer Denaturierung der DNA im Thermo-Cycler wurde das PCR-Programm gestoppt und 4 µl dNTP (je 10 mM) und 1 µl (2,5 U) *PfuTurbo*-DNA-Polymerase zugesetzt. Folgendes Programm wurde in den meisten Fällen verwendet:

95°C 2 min; 4 Zyklen á 95°C 1 min, 52°C 1 min, 68°C 19 min; 14 Zyklen á 95°C 1 min, 55°C 1 min, 68°C 19 min; 68°C 7 min, 4°C ∞. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des synthetisierten Plasmids, Richtlinie ist eine Synthesegeschwindigkeit von 500 BP/min. Nach der Amplifikation wurde der Ansatz 1 h bei 37°C mit 10 U *DpnI* verdaut. Zur Kontrolle, ob eine Amplifikation stattgefunden hatte, wurden 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen. 20 µl des PCR-Produktes wurden in Bakterien transformiert. Die nach Minipräparation isolierte Plasmid-DNA wurde vollständig sequenziert, um die gewünschte Mutation zu verifizieren und ungewollte Sekundärmutationen auszuschließen.

3.2.3.5 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde der 'BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit' von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) verwendet. Je PCR-Reaktion wurde ca. 1 µg DNA und 10 pmol Primer eingesetzt. Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig verwendet: 25 Zyklen á 96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4 min, 4°C ∞. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde der Ansatz auf 100 µl verdünnt, mit 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) und 250 µl Ethanol versetzt, vorsichtig gemischt und bei 14000 rpm 15 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und bei 50°C getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl Aqua dest. gelöst und im ABI Prism 310 Genetic Analyzer analysiert.

3.2.3.6 Isolierung von mRNA

Die Isolierung von RNA aus Zellen wurde mit Hilfe des 'RNeasy® Mini-Kits' (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Zur Analyse der Patientenproben wurde mRNA mittels 'MagNA Pure LC Technik' (Roche, Mannheim) im Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, extrahiert.

3.2.3.7 Reverse Transkription: Synthese von cDNA

Bei der reversen Transkription dient mRNA als Matrize zur Synthese der komplementären DNA (cDNA). Die Synthese wird von einer retroviralen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) katalysiert. Es wurde mit dem 'Omniscrypt Reverse Transcriptase Kit' von Qiagen (Hilden) mit Oligo-dT-Primern nach Herstellerangaben gearbeitet. Pro Reaktion wurde maximal 2 µg Template-RNA eingesetzt.

3.2.3.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten, zur Abschätzung der DNA-Menge und zur Auftrennung und Isolierung aus dem Gel wurde DNA in einem Agarosegel anhand der Größe und damit korrespondierend der Laufstrecke aufgetrennt.

Der Agaroseanteil der Gele betrug zwischen 0,8 – 2 %, abhängig von der erwarteten Größe der Fragmente. Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der

Mikrowelle aufgelöst und nach Abkühlen in einer Gelkammer polymerisiert. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer verdünnt und in einer Gelelektrophoresekammer auf das Gel aufgetragen, das Gel mit 1xTBE überschichtet und durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (3 µg/ml) gefärbt und die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Marker mit definierten Fragmentgrößen aufgetragen.

TBE-Puffer (5x): 54,0 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung, ad 1000 ml

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 Präparation von Protein-Lysaten

Zur Analyse zellulärer Proteine wurden die Zellen in geeignetem Lysispuffer aufgenommen. Es wurden verschiedene Lysispuffer getestet (u.a. nach (Sambrook 1989) et al.), zumeist wurde mit dem unten angegebenen Lysispuffer die quantitativste Extraktion der gewünschten Proteine, insbesondere der Membranproteine, erzielt. Für die standardmäßige Analyse eines Ganzzellextrakts mittels Western-Blot-Technik wurden 3×10^7 Ba/F3-Zellen oder 2×10^6 293-Zellen pro ml Lysispuffer lysiert. Suspensionszellen wurden 5 min bei 1000 rpm (210 g) abzentrifugiert, 2x mit PBS gewaschen und nach Abkühlung des Gefäßes auf Eis mit Lysispuffer versetzt. Adhärenz Zellen wurden direkt im Kulturgefäß 2x mit PBS gewaschen, 10 min auf Eis mit Lysispuffer inkubiert, mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Um sicher zu stellen, dass die Zellen vollständig lysiert werden, wurden die Lysate bei 4°C 30 min auf einem Drehrad (9 rpm) inkubiert. 30 min Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletierte die Zelldebris. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C oder -80°C aufbewahrt.

Lysispuffer: 50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100, 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
frisch zugesetzt pro 10 ml: 50 µl Aprotinin (200x), 100 µl 0,1 M PMSF, 100 µl 0,1 M Orthovanadat

3.2.4.2 Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Assay verwendet eine saure Lösung des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G-250, dessen Absorptionsmaximum sich bei Bindung an basische und aromatische Gruppen eines Proteins von 465 nm auf 595 nm erhöht. Die Intensität des Farbstoffs korreliert direkt mit der Konzentration an Protein im Lysat und kann im Spektralphotometer gemessen werden.

Die Lysate wurden 1:10, das BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, München) 1:5 mit Wasser verdünnt. 20 µl des Lysats und 980 µl des BioRad-Dyes wurden gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gegen eine Blank-Kontrolle (BioRad-Dye mit Zusatz von Wasser) gemessen. Zur Bestimmung der absoluten Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA (100, 200, 400, 600 und 800 µg/ml) hergestellt und diese als Standard in gleicher Weise vermessen. Die Konzentration von Zelllysaten sollte zwischen 2 und 5 mg Protein pro ml liegen.

3.2.4.3 Chemisches Crosslinking von Rezeptoren

Ziel der Crosslinking-Experimente war, die spontane und Liganden-induzierte Dimerisierung von Zelloberflächen-Rezeptoren zu bestimmen. Es wurde der chemische Crosslinker Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS^3) verwendet, der homobifunktionell, wasserlöslich (bis zu 10 mM), nicht-spaltbar und membran-impermeabel ist (Staros, 1982). Der Crosslinker reagiert über die N-hydroxysuccinimidyl-Gruppe in wässriger Lösung bei pH 7 - 9 mit den primären Aminogruppen der Proteine. BS^3 vernetzt kovalent Proteine, die sich in genügender Nähe zueinander befinden, über den sog. 'spacer arm', der im Falle von BS^3 aus acht Atomen besteht und eine Länge von 11,4 Angström aufweist. 1×10^7 Ba/F3-Zellen wurden in 300 µl Medium aufgenommen und jeweils ein Ansatz ohne FL und ein Ansatz mit 100 ng FL 1 h auf Eis inkubiert. Die Crosslinking-Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µl 20 mM wässriger BS^3 -Lösung (Endkonzentration 2 mM) gestartet und der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 20 µl Quencher-Lösung zugegeben und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse erfolgte in 300 µl Lysispuffer (siehe 3.2.4.1).

Quencher-Lösung: 1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 6,8

3.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde im Wesentlichen wie von Laemmli beschrieben durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrem Molekulargewicht. Proteine eines Ganzzellextraktes wurden in einem 7,5% - 12,5%igen Gradientengel aufgetrennt. Zur Herstellung des Trenngels wurden die 7,5%ige und 12,5%ige Gellösung in einem Gradientenmischer gemischt, mit von unten nach oben abnehmender Konzentration in eine Gelvorrichtung (Größe des Gels: 16 x 15 cm, Dicke 0,8 mm) gefüllt und für ca. 2 - 3 h polymerisiert. Für die Auftrennung von Proteinen > 100 kDa wurde ein 7%iges Gel verwendet. Das Trenngel wurde mit 4%igem Sammelgel überschichtet, in das ein Kamm eingesetzt wurde, so dass Taschen zum Beladen mit Lysaten entstehen.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Zellysate im Verhältnis 1:2 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Beladen des Gels wurde die Elektrophorese über Nacht bei 30 mA in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Gelkammer durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der 'Rainbow Marker' (Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront, sichtbar durch das im Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau, das untere Ende des Gels erreicht hat.

Laemmli-Puffer (2x):	187,5 mM TRIS, 6 % SDS, 30 % Glycerin, Spatelspitze Bromphenolblau
7,5 % Gellösung:	5,65 ml 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8), 6,25 ml Polyacrylamidlösung (30 %), 150 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 2,9 ml H ₂ O, 1,5 µl TEMED
12,5 % Gellösung:	5,65 ml 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8), 3,75 ml Polyacrylamidlösung (30 %), 2 g Sucrose, 150 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 5,4 ml H ₂ O, 1,5 µl TEMED
4 % Sammelgel:	2,5 ml 1,5 M Tris-Puffer (pH 6,8), 1,3 ml Polyacrylamidlösung (30 %), 100 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 6,1 ml H ₂ O, 10 µl TEMED
Elektrophoresepuffer (10x):	151,4 g Tris, 720,65 g Glycin, 50 g SDS, ad 5000 ml, pH 8,3 mit HCl

3.2.4.5 Western-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese nach der 'semidry'-Methode von Towbin et al. (Towbin, 1979) und Kyhse-Anderson (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Porengröße 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgte

in Transblot-Puffer für 3 h bei 250 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau angefärbt, um den erfolgreichen Transfer und die Beladung aller Banden mit gleicher Proteinmenge zu verifizieren. Anschließend wurde die Membran 3x 20 min in G-Net inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Über Nacht bei 4°C erfolgte die Inkubation in G-Net mit primärem Antikörper in entsprechender Verdünnung (meist 1:1000). Am nächsten Morgen wurde die Membran 3x mit TBS-T gewaschen und danach für 1 h mit Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000 – 1:20.000 in G-Net, HRP ('horse radish peroxidase')-gekoppeltes anti-Kaninchen- oder anti-Maus-Immunglobulin) inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 3x mit TBS-T gewaschen, 1x mit PBS gespült und die Proteine mit Hilfe des Chemolumineszenz-Reagenzes (ECL; Amersham Pharmacia, Freiburg) auf einem Hyperfilm (Amersham Pharmacia) detektiert.

Transblot ohne MeOH (10x):	72,75 g Tris, 36,63 g Glycin, 0,475 g SDS, ad 5000 ml
Transblot-Puffer:	80 ml Transblot ohne MeOH, 200 ml MeOH, ad 1000 ml
Ponceau-Lösung:	0,5 g Ponceau S, 1 ml Eisessig, ad 100 ml
Net (10x):	438,3 g NaCl, 93,6 g Na ₂ EDTA, 302,85 g Tris, 25 g Triton-X-100, ad 5000ml, pH 7,7 mit HCl
G-Net:	2,5 g Gelatine, 100 ml Net (10x), 10 sec aufkochen, 20 min rühren, ad 1000 ml
TBS (10x):	12,11 g Tris, 87,66 g NaCl, ad 1000 ml (pH 8,8)
TBST:	100 ml TBS (10x), 1 ml Tween 20, ad 1000 ml

3.2.4.6 Immunopräzipitation

Zur Durchführung einer Immunopräzipitation wurden 300 – 500 µg Protein eines Ganzzelllysats eingesetzt. Die Zellysate wurden mit Lysispuffer (s. 3.2.4.1) auf das gleiche Volumen (mind. 500 µl) eingestellt und über Nacht mit spezifischem Antikörper (1 - 2 µg, abhängig vom Antikörper) auf einem Drehrad (9 rpm) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zur Bindung des Protein-Antikörper-Komplexes 20 µl Protein-A-Agarose- (polyklonale Antikörper) bzw. Protein-G-Sepharose (monoklonale Antikörper) zugegeben und für weitere 3 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit Lysispuffer gewaschen (Tischzentrifuge, 2 min, 2500 rpm, 4°C), in 20 µl Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE.

3.2.4.7 Strippen der Nitrocellulose-Membran

Mit Proteinen beladene Nitrocellulose-Membranen können zur Detektion unterschiedlicher Proteine mehrmals mit Antikörpern inkubiert werden, jedoch muss der zuvor verwendete Antikörper durch 'Strippen' der Membran entfernt werden. Dazu wird die Membran mit Stripping-Puffer (angewärmt auf 56°C), der β -Mercaptoethanol enthält, bedeckt und für 40 min bei 56°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung des Stripping-Puffers wird die Membran mindestens 3x 20 min in TBST gewaschen. Nach anschließendem Blocken (3x 20 min G-Net) kann erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden.

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris pH 6,8, 0,1 M β -Mercaptoethanol, 2 % SDS

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Punktmutationen in der juxtamembränen Domäne von FLT3

4.1.1 Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 treten selten bei Patienten mit AML auf

Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in den Zelllinien Mono-Mac-1 und Mono-Mac-6, die aus peripherem Blut eines 64-jährigen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie (AML FAB M5) etabliert wurden, die RTK FLT3 konstitutiv aktiviert ist (Spiekermann, 2003b). Die vollständige Sequenzierung der aus den Zelllinien gewonnenen FLT3 cDNA zeigte eine Punktmutation in der JM-Domäne: Substitution von Valin durch Alanin an Position 592 (V592A). Ein daraufhin im Labor für Leukämiediagnostik der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern, durchgeführtes Screening mittels Schmelztemperaturkurven-Assay im LightCycler, konnte in insgesamt 785 AML-Patientenproben zwei weitere Missense-Punktmutation in FLT3 identifizieren: Y591C in einem Patienten und F594L in zwei Patienten. In einer Studie von Stirewalt et al. wurden 140 AML-Patientenproben mittels 'single-stranded conformational polymorphism analysis' (PCR/SSCP) auf FLT3-Mutationen untersucht. Neben der bereits von uns beschriebenen V592A-Mutation wurden zwei weitere Missense-Punktmutationen gefunden: V579A und F590GY591D (Stirewalt, 2004). Die Häufigkeit der Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 liegt nach Stirewalt et al. bei ca. 2%. Diese Analyse umfasste die gesamte JM-Domäne, während das LightCycler-basierte Screening im Labor für Leukämiediagnostik lediglich Mutationen in einem Bereich von ca. 5 bis 6 Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung von V592 identifizieren konnte. Damit scheint die sich aus dem LightCycler-Screening ergebende Häufigkeit mit 0,38% die reelle Häufigkeit zu unterschätzen.

Diese Daten zeigen, dass außer FLT3-ITD und FLT3-TKD eine dritte Klasse von FLT3-Mutationen existiert: Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 (FLT3-JM-PM). Abb. 4.1 (S. 48) zeigt die Lokalisation der vier zur funktionellen Analyse selektierten Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3.

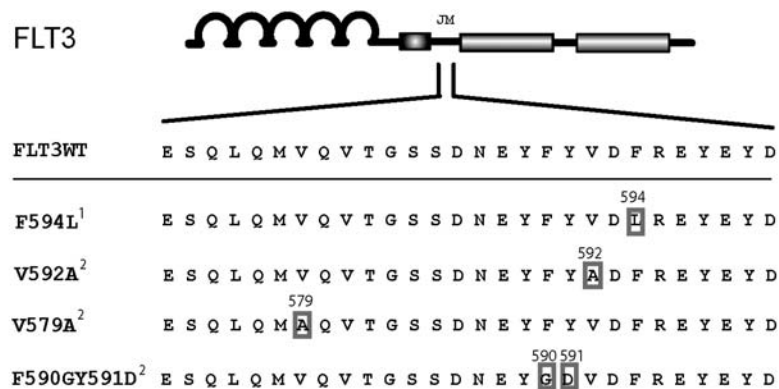


Abb. 4.1 Lokalisation der in AML-Patienten gefundenen Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3. Die erste Zeile repräsentiert die FLT3-WT-Aminosäuresequenz der JM-Domäne von AS 573 bis 600. Darunter sind die vier selektierten Punktmutanten gezeigt, die in unserer Studie (¹) sowie in der Studie von Stirewalt et al. (²) in AML-Patienten gefunden wurden (Stirewalt, 2004).

4.1.2 Stabile Expression der FLT3-JM-PM und FLT3-ITD/FLT3-TKD in Ba/F3-Zellen

Die Ba/F3-Zelllinie ist eine aus murinen lymphatischen pro-B-Zellen generierte IL-3-abhängige Zelllinie (Palacios, 1984), die ein geeignetes Modellsystem zur Analyse von Onkogenen darstellt (Hayakawa, 2000). Die Zellen zeigen nur nach Transduktion transformierender Gene wachstumsfaktor (IL-3)-unabhängiges Wachstum.

Die vier Punktmutationen, V592A, V579A, F594L und F590GY591D wurden durch ortsgerichtete Mutagenese in die FLT3-Wildtyp-Sequenz eingeführt, die bereits in dem pMSCV-IRES-YFP-Vektor (MIY) einkloniert vorlag. Durch vollständige Sequenzierung der FLT3 cDNA wurde verifiziert, dass keine zusätzlichen unerwünschten Mutationen eingeführt wurden. Die vier FLT3-JM-PM (V592A, V579A, F594L und F590GY591D) und MIY (als Vektor Kontrolle) wurden stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert. Um die FLT3-JM-PM direkt mit den beiden bereits bekannten Klassen von FLT3-Mutationen vergleichen zu können wurden zusätzlich drei FLT3-ITD Konstrukte (FLT3-W51, FLT3-W78, FLT3-NPOS) und zwei FLT3-TKD Konstrukte (FLT3-D835Y, FLT3-D835V) in Ba/F3-Zellen exprimiert. Positiv transduzierte Zellen wurden anhand der Koexpression des 'gene of interest' und YFP im FACS sortiert. Die sortierten Zellen wurden im Calibur Durchflusszytometer auf ihre YFP-Expression überprüft. Die Zellpopulation musste zu > 95% YFP-positiv sein, anderenfalls wurde erneut sortiert. Durch Anfärbung des FLT3-Rezeptors mit spezifischem PE-konjugiertem CD135-Antikörper und anschließender Analyse im Durchflusszytometer wurde die einheitliche Oberflächenexpression des FLT3-Rezeptors in den generierten

Zelllinien verifiziert. Abb. 4.2 zeigt, dass nur die FLT3-exprimierenden Zelllinien (Daten gezeigt für FLT3-WT, FLT3-W51 und FLT3-V592A), nicht jedoch die MIY-Zellen (Negativkontrolle), eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Färbung mit CD-135-Antikörper, und damit eine Expression des FLT3-Rezeptors zeigen.

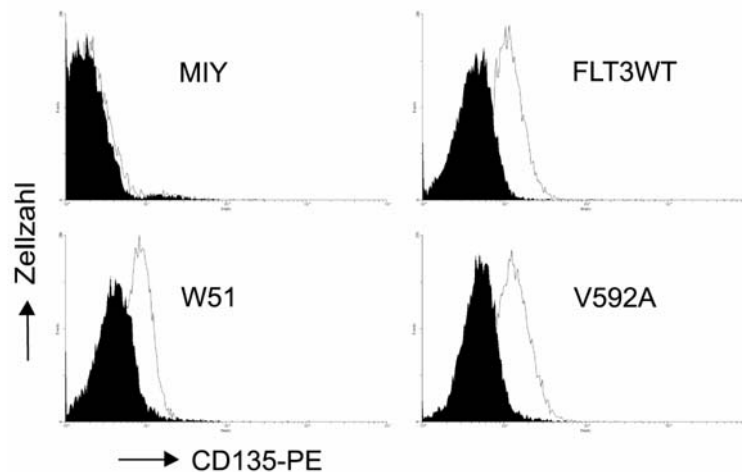


Abb. 4.2 Oberflächenexpression des FLT3-Rezeptors. Abgebildet sind beispielhafte Histogramme für vier der zehn generierten Zelllinien, wobei die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität in Kanal FL2 dargestellt ist. Das schwarze Histogramm repräsentiert die Zellen nach Färbung mit IgG1-PE-Antikörper (Kontrolle), das weiße Histogramm die Zellen nach Färbung mit spezifischem CD135-Antikörper.

4.1.3 FLT3-JM-PM-exprimierende Ba/F3-Zellen zeigen IL-3-unabhängiges Wachstum

Der Erwerb einer ITD- oder TKD-Mutation im *FLT3*-Gen induziert Liganden-unabhängiges Zellwachstum in verschiedenen Zelllinien (Hayakawa, 2000; Spiekermann, 2003b; Yamamoto, 2001). Zur Analyse des transformierenden Potentials der FLT3-JM-PM in Ba/F3-Zellen wurden die FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen in An- bzw. Abwesenheit des Wachstumsfaktors IL-3 kultiviert und die lebenden Zellen nach 72 h mittels Trypan-Blau-Exklusion gezählt. FLT3-ITD- bzw. FLT3-TKD-exprimierende Zellen dienten als Positivkontrolle. Die Überexpression aller vier FLT3-JM-PM-Konstrukte in Ba/F3-Zellen induzierte, im Gegensatz zu FLT3-WT, IL-3-unabhängiges Wachstum. Im Einzelnen betrug die Wachstumsrate der FLT3-V592A 10%, FLT3-V579A 11%, FLT3-F594L 7% und FLT3-F590GY591D 18% der durchschnittlichen Wachstumsrate der drei FLT3-ITD-Zelllinien (Abb. 4.3, S. 50). Auch die FLT3-TKD-exprimierenden Zellen zeigten eine signifikant höhere Wachstumsrate als die FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen. Kein

signifikanter Unterschied hinsichtlich der Proliferationsrate konnte innerhalb der vier verschiedenen FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen festgestellt werden.

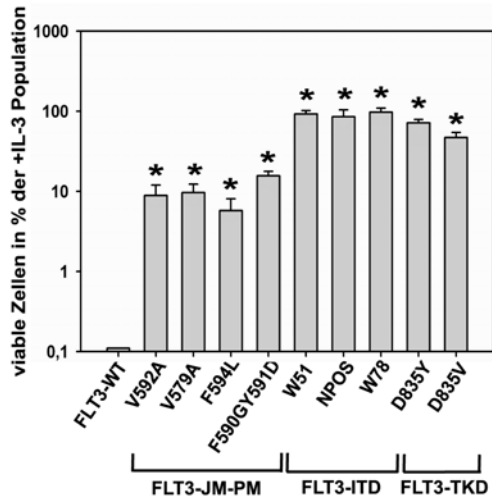


Abb. 4.3 Das IL-3-unabhängige Wachstum der FLT3-JM-PM-exprimierenden Ba/F3-Zellen. Mit FLT3-WT, FLT3-ITD Konstrukten (W51, NPOS, W78), FLT3-TKD Konstrukten (D835Y, D835V) oder einer der vier FLT3-JM-PM-Mutanten (FLT3-V592A, FLT3-V579A, FLT3-F594L oder FLT3-F590GY591D) transduzierte Ba/F3-Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml in Ab- bzw. Anwesenheit von IL-3 ausgesät. Lebende Zellen wurden 72 h später gezählt. Das Wachstum der Zellen in Gegenwart von IL-3 (10 ng/ml) wurde als 100 % definiert (Kontrolle). (T-Test: p-Wert: * = $p < 0,05$)

Zusammengefasst haben Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 transformierendes Potential in Ba/F3-Zellen.

4.1.4 Stimulierung mit FL führt zur Hyperproliferation von FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen

Aktivierung von FLT3 durch FL fördert das *in vitro* Wachstum früher Progenitor-Zellen (Rusten, 1996). Sowohl im Knochenmark als auch in AML-Blasten werden FL und FLT3 koexprimiert (Brasel, 1995; Zheng, 2004). Deshalb sollte getestet werden, ob das autonome Wachstum der FLT3-JM-PM-Zellen durch exogenen FL weiter stimuliert werden kann. Die vier FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen sowie FLT3-WT- und FLT3-ITD-W51-exprimierende Zellen wurden in Gegenwart von 50 ng FL/ml kultiviert und nach 72 h gezählt.

Die Proliferationsrate der FLT3-V592A war 312 %, FLT3-V579A 186 %, FLT3-F594L 97 % und FLT3-F590GY591D 148 % höher als die Proliferationsrate der FLT3-WT-Zellen unter gleichen Bedingungen (Abb. 4.4, S. 51). Das Wachstum der FLT3-W51-Zellen konnte durch die Anwesenheit von FL nicht weiter stimuliert werden (Daten nicht gezeigt).

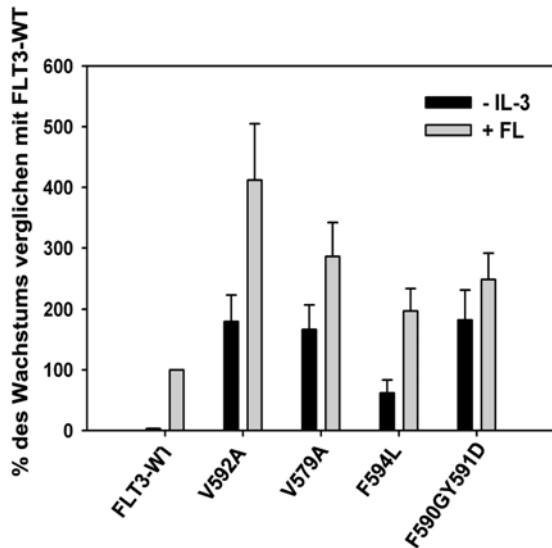


Abb. 4.4 Hyperproliferation der FLT3-JM-PM-Zellen nach FL-Stimulierung. FLT3-WT- und FLT3-JM-PM-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml in Ab- bzw. Anwesenheit von humanem rekombinanten FL (50 ng/ml) kultiviert. Lebende Zellen wurden nach 72 h mittels Trypan-Blau-Exklusion gezählt. Die Zellzahl der FLT3-WT-Zellen nach 72 h wurde als 100 % definiert. Der Standardfehler des Mittelwertes ist angegeben.

Damit zeigen die FLT3-JM-PM-Rezeptoren im Vergleich zu FLT3-WT-Rezeptoren eine signifikante pro-proliferative Aktivität in Gegenwart von FL.

4.1.5 FLT3-JM-PM-exprimierende Ba/F3-Zellen weisen eine Apoptoseresistenz nach IL-3 Entzug auf

Aktivierende Mutationen in RTKs können zur Aktivierung pro-proliferativer und anti-apoptotischer Signalwege führen (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Vogelstein und Kinzler, 2004). Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps der FLT3-JM-PM-exprimierenden Ba/F3-Zellen wurde untersucht, ob der Erwerb einer Punktmutation in der JM-Domäne des FLT3-Rezeptors eine erhöhte Resistenz gegenüber apoptotischem Zelltod zur Folge hat. Zwei experimentelle Ansätze wurden verwendet, um apoptotische Zellen zu identifizieren: Färbung mit Annexin V und 7-AAD 48 h, und Färbung der Zellnuclei mit Propidium-Iodid 24 h nach Entzug des Wachstumsfaktors. FLT3-WT-Zellen unterliegen sehr schnell der Apoptose nach IL-3-Entzug im Gegensatz zu FLT3-ITD- und FLT3-TKD-exprimierenden Zellen, die vor Induktion von Apoptose geschützt sind (Mizuki, 2000; Yamamoto, 2001). Es konnte klar gezeigt werden, dass der Prozentsatz an apoptotischen Zellen in FLT3-V592A-, FLT3-V579A-, FLT3-F594L- und FLT3-F590GY591D-exprimierenden Zellen, die ohne IL-3 kultiviert wurden, nach 24 h bzw. 48 h signifikant geringer war als in den FLT3-WT-exprimierenden Zellen (Abb. 4.5, S. 52). Nach 24 h bzw. 48 h waren 26 % bzw. 80 % der ohne IL-3 kultivierten FLT3-WT-exprimierenden Zellen aber nur 11 – 15 % (24 h) und 25 – 49 % (48 h) der FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen apoptotisch. FLT3-ITD- und FLT3-TKD-exprimierende Zellen waren

vollständig vor Apoptose geschützt. Die Zugabe von IL-3 schützte alle Zelllinien vor Apoptose.

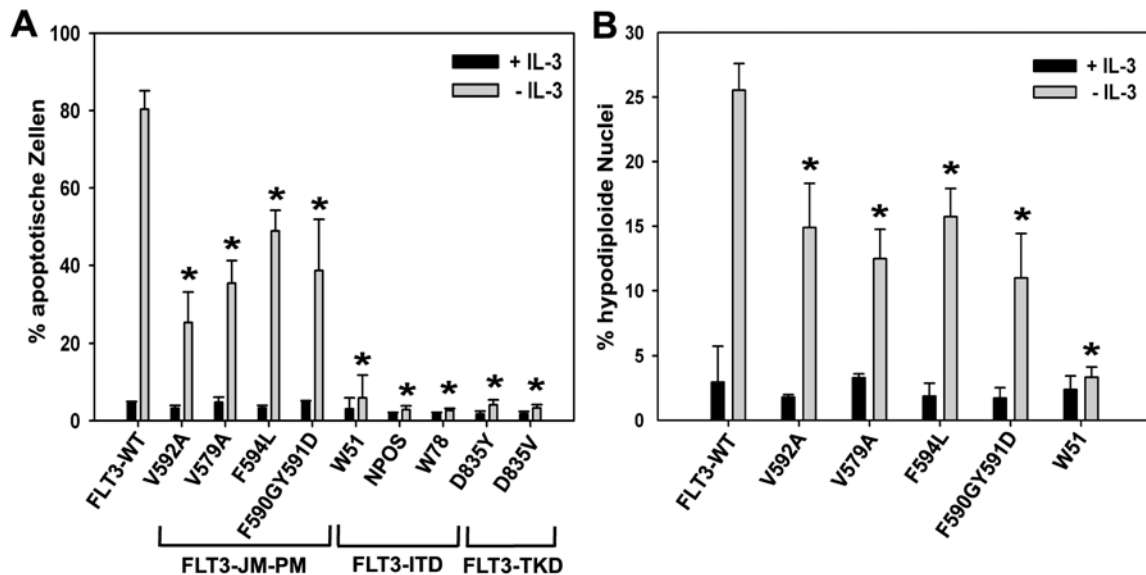


Abb. 4.5 Apoptoseresistenz der FLT3-JM-PM-Ba/F3-Zellen. **A.** Ba/F3-Zellen, stabil transduziert mit FLT3-WT, FLT3-ITD (W51, NPOS, W78), FLT3-TKD (D835Y, D835V) oder FLT3-JM-PM (FLT3-V592A, FLT3-V579A, FLT3-F594L and FLT3-F590GY591D) wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät und für 48 h in Ab- bzw. Anwesenheit von IL-3 (10 ng/ml) kultiviert. Die Zellen wurden dann im FACS Calibur Durchflusszytometer nach Färbung mit Annexin V-PE und 7-AAD gemessen. (p-Wert: * = $p < 0,05$) **B.** Die Zellen wurden 24 h in An- bzw. Abwesenheit von IL-3 (10 ng/ml) kultiviert und nach Färbung der Zellnuclei mit Propidiumiodid im FACS Calibur Durchflusszytometer analysiert. (T-Test: p-Wert: * = $p < 0,05$).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 konstitutiv anti-apoptotische Signalwege des FLT3-Rezeptors aktivieren. Die anti-apoptotische Aktivität der FLT3-JM-PM-Mutanten war jedoch signifikant geringer als die der FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutanten.

4.1.6 FLT3-JM-PM-Rezeptoren sind an Tyrosinresten konstitutiv phosphoryliert und zeigen eine höhere spontane Dimerisierungsrate

Die physiologische Aktivierung des FLT3-Rezeptors wird durch Bindung des FLT3-Liganden induziert. Die Bindung führt zu einer schnellen Konformationsänderung in intrazellulären Domänen und fördert die Dimerisierung der Rezeptoren und deren Trans-Phosphorylierung an spezifischen Tyrosinresten (Turner, 1996). Es wurde bereits gezeigt, dass der Erwerb von FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutationen zur Autoaktivierung des FLT3-

Rezeptors führt (Hayakawa, 2000; Yamamoto, 2001). Daher sollte untersucht werden, ob auch der Erwerb einer Punktmutation in der JM-Domäne von FLT3 die konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors induziert. Zu diesem Zweck wurden Zelllysate unstimulierter und FL-stimulierter FLT3-JM-PM-exprimierender Ba/F3-Zellen als auch FLT3-ITD- und FLT3-TKD-exprimierender Ba/F3-Zellen hergestellt, der FLT3-Rezeptor mit FLT3-Antikörper immunopräzipitiert und mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines phospho-Tyrosin-Antikörpers die Phosphorylierung des Rezeptors bestimmt. Im Gegensatz zum FLT3-WT-Rezeptor waren alle FLT3-JM-PM-Rezeptoren und die FLT3-W51-Rezeptoren, konstitutiv an Tyrosinresten phosphoryliert (Abb. 4.6.A). Die densitometrische Analyse des phospho-Tyrosin-Blots und FLT3-Blots ergab, dass der Anteil der phosphorylierten Rezeptoren an der Gesamtmenge der Rezeptoren für FLT3-V592A- 20 %, für FLT3-V579- 28 %, für FLT3-F594L- 10 % und für FLT3-F590GY591D-exprimierende Zellen 14 % betrug und damit signifikant geringer war, als in FLT3-ITD- (42 – 60 % phosphorylierte Rezeptoren) und FLT3-TKD-exprimierenden (41 – 66 % phosphorylierte) Zellen (Abb. 4.6.B).

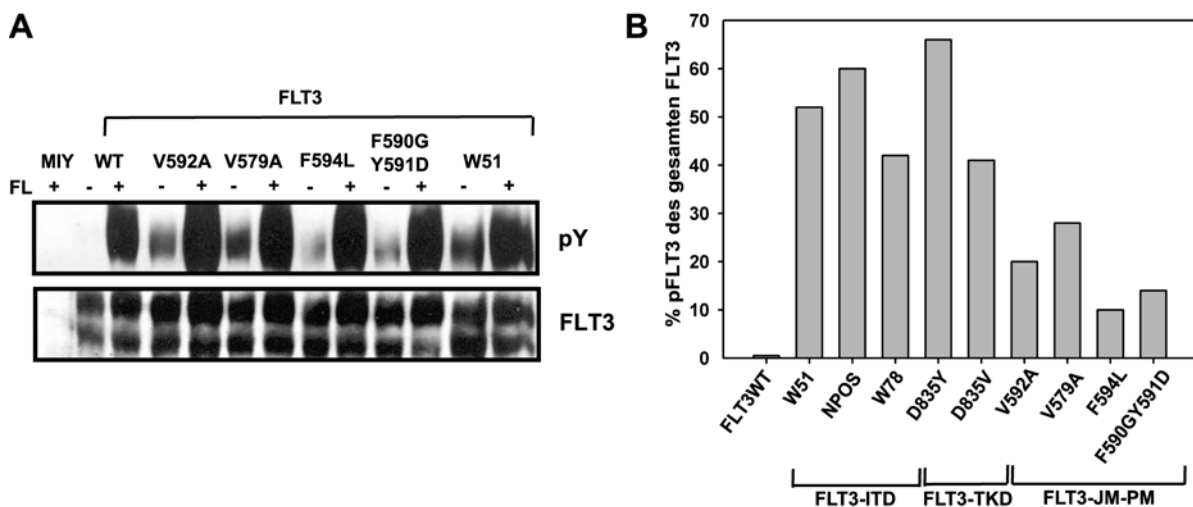


Abb. 4.6 Konstitutive Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors in FLT3-JM-PM-Ba/F3-Zellen.

A. Die FLT3-Rezeptoren von unstimulierten (-) und FL-stimulierten (100 ng FL/ml für 5 min) (+), serum-gehungenen FLT3-WT-, FLT3-JM-PM- (FLT3-V592A, FLT3-V579A, FLT3-F594L, FLT3-F590GY591D) und FLT3-W51-exprimierenden Zellen wurden mit FLT3-Antikörper aus Ganzzelllysaten immunopräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit phospho-Tyrosin-Antikörper immunogelblottet. Die Blots wurden gestrippt und erneut mit FLT3-Antikörper inkubiert. **B.** FLT3-ITD (W51, NPOS, W78)- und FLT3-TKD (D835Y, D835V)-exprimierende Zellen wurden wie in A beschrieben analysiert und die Blots anschließend densitometrisch mit Hilfe der TINA 2.0 Software ausgewertet, um den Prozentsatz an phosphoryliertem FLT3 des gesamten FLT3-Proteins in den analysierten Zelllinien zu quantifizieren.

Ein weiteres Maß für die Aktivierung des Rezeptors ist die Rate der Rezeptor-Dimerisierung. Um die konstitutive Dimerisierung der FLT3-JM-PM-Rezeptoren im Vergleich zu FLT3-WT-Rezeptoren zu untersuchen wurde der Crosslinker BS³ verwendet, der Proteine, die sich in genügender Nähe zueinander befinden, über ihre primären Aminogruppen kovalent vernetzt. Unstimulierte und FL-stimulierte FLT3-JM-PM- und FLT3-WT-Zellen wurden 30 min in BS³-Crosslinking-Puffer inkubiert, anschließend lysiert und die Lysate mittels FLT3-Immunoblotting auf die Anwesenheit von Rezeptor-Dimeren untersucht. In der Abwesenheit von FL zeigten FLT3-JM-PM-Rezeptoren eine höhere konstitutive Dimerisierungsrate im Vergleich zu FLT3-WT-Rezeptoren (Abb. 4.7). FL-Stimulierung führte in allen Zelllinien in gleichem Maße zur Dimerisierung der Rezeptoren.

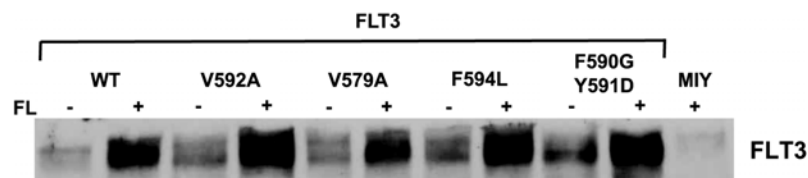


Abb. 4.7 FLT3-JM-PM-Rezeptoren zeigen in Abwesenheit von FL eine erhöhte konstitutive Dimerisierungsrate im Vergleich zu FLT3-WT-Rezeptoren. Mit BS³ inkubierte unstimulierte (-) und FL-stimulierte (100 ng/ml) (+) MIY-, FLT3-WT- und FLT3-JM-PM-Zellen wurden lysiert, die Lysate auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und die FLT3-Dimere (> 300 kDa) durch Immunoblotting mit FLT3-Antikörper detektiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Punktmutation in der JM-Domäne von FLT3 zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führt. FLT3-JM-PM-Rezeptoren zeigen erhöhte Autophosphorylierung und konstitutive Dimerisierung in Abwesenheit von FL. Das Ausmaß der konstitutiven Rezeptor-Aktivierung der FLT3-JM-PM-Mutanten ist jedoch geringer als das der FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Rezeptor-Mutanten.

4.1.7 In FLT3-JM-PM-Zellen ist STAT5 konstitutiv aktiviert und Bcl-x(L) hochreguliert

Die drei wichtigsten nachgeordneten Signalwege von FLT3 sind der STAT5-, MAPK- und PI3K/Akt ('protein kinase B')-Signalweg. Für FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutationen wurde gezeigt, dass diese drei Signalwege konstitutiv aktiviert sind (Hayakawa, 2000; Mizuki, 2000; Spiekermann, 2003a).

STAT5 wird in erster Linie für das transformierende Potential *in vitro* und *in vivo* verantwortlich gemacht. Aktivierung von STAT5 führt zu einer veränderten Expression

zahlreicher Gene, die u.a. Zellzyklus, Apoptose und Proliferation regulieren (Cyclin D1 (Matsumura, 1999), Cyclin D2 (Martino, 2001), c-myc (Lord, 2000), Bcl-x(L) (Lord, 2000; Socolovsky, 1999), CIS ('cytokine Inducible SH2 containing protein') (Matsumoto, 1997) und SOCS ('suppressor of cytokine signalling') (Davey, 1999).

Um die Aktivierung des STAT5 Signalweges zu untersuchen, wurden Lysate serumgehungelter FLT3-WT-, FLT3-JM-PM- (FLT3-V592A, FLT3-V579A, FLT3-F594L, FLT3-F590GY591D) und FLT3-ITD/FLT3-TKD-Zellen im Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen phospho-STAT5 (Y694) analysiert. Es konnte klar gezeigt werden, dass die Expression von FLT3-JM-PM in Ba/F3-Zellen eine signifikant stärkere STAT5-Aktivierung im Vergleich zu FLT3-WT induziert (Abb. 4.8.A). Die densitometrische Analyse ergab, dass das Verhältnis von phosphoryliertem STAT5 zur Gesamtmenge an STAT5-Protein in den vier FLT3-JM-PM-Zelllinien von 20 – 35 % variierte und damit bedeutend geringer war als in den drei FLT3-ITD- (49 – 61 %) und zwei FLT3-TKD- (56 – 66 %) exprimierenden Zelllinien (Abb. 4.8.B).

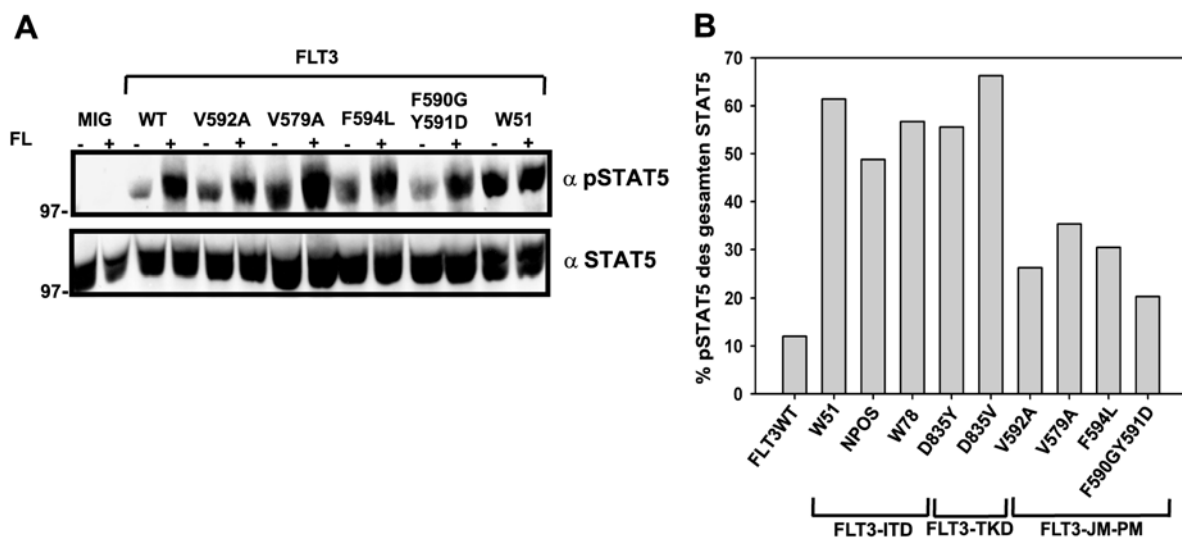


Abb. 4.8 FLT3-JM-PM-exprimierende Ba/F3-Zellen weisen konstitutiv aktiviertes STAT5 auf.
A. FLT3-WT-, FLT3-W51-, FLT3-V592A-, FLT3-V579A-, FLT3-F594L-, FLT3-F590GY591D- oder MIG-transduzierte Zellen wurden für 24 h in 0,3 % FCS-Medium gehungert und unbehandelt (-) oder nach 5minütiger FL-Stimulierung (100 ng FL/ml) (+) lysiert. Ganzzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Blots wurden mit anti-phospho-STAT5-Antikörper inkubiert, gestrippt und mit anti-STAT5-Antikörper geblottet. **B.** FLT3-ITD-(W51, NPOS, W78) und FLT3-TKD-(D835Y, D835V) exprimierende Zellen wurden wie in A beschrieben analysiert und der Prozentsatz an phosphoryliertem STAT5 von Gesamt-STAT5-Protein in den analysierten Zelllinien mit Hilfe der TINA 2.0 Software densitometrisch quantifiziert.

Die FL-unabhängige Aktivierung des MAPK-Signalweges und die Aktivierung der Serin/Threonin Proteinkinase AKT als Marker für die Aktivierung des PI3K-abhängigen Signalweges wurden ebenfalls analysiert. Immunoblotting mit phospho-AKT-Ser473-spezifischem Antikörper zeigte eine geringfügige Erhöhung des basalen Levels an phosphoryliertem AKT in allen FLT3-JM-PM-Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen (Daten nicht gezeigt). Immunoblotting mit phospho-MAPK-Antikörper zeigte die gleiche Menge an phosphorylierter MAPK in allen FLT3-JM-PM-Zellen und in FLT3-WT-Zellen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der lediglich geringfügig stärkeren AKT-Aktivierung und unveränderten MAPK-Aktivierung in FLT3-JM-PM-Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen, scheint das prominente proliferative Signal durch STAT5 vermittelt zu werden.

Aufgrund der erhöhten STAT5-Aktivierung in den FLT3-JM-PM-Zellen und der erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen, wurde vermutet, dass das anti-apoptische Bcl-x(L)-Protein, ein wichtiges STAT5 Zielgen, in den FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen hochreguliert sein könnte.

Ganzelllysate wurden mittels Western-Blot-Technik unter Verwendung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen Bcl-x(L) analysiert. Alle FLT3-JM-PM (FLT3-V592A, FLT3-V579A, FLT3-F594L und FLT3-F590GY591D)-Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Expression von Bcl-x(L) im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen (Abb. 4.9).

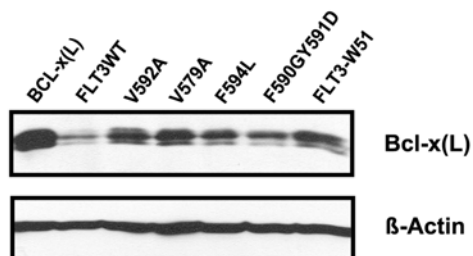


Abb. 4.9 Die Bcl-x(L) Expression ist in FLT3-JM-PM-Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen erhöht. Ganzelllysate wurden mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Bcl-x(L)-Antikörpers untersucht. Als Positivkontrolle diente in Ba/F3-Zellen überexprimiertes Bcl-x(L). Gleiche Proteinbeladung in allen Banden wurde mittels Immunoblotting gegen β -Actin verifiziert. Bcl-x(L): 28 kDa

Demnach ist der wichtigste nachgeordnete Signalweg von FLT3, der STAT5-Signalweg, in FLT3-V592A-, FLT3-V579A-, FLT3-F594L- und FLT3-F590GY591D-exprimierenden Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen verstärkt aktiviert und induziert eine Überexpression des anti-apoptischen Proteins Bcl-x(L) in den FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen.

4.1.8 Der FLT3-PTK-Inhibitor PKC412 induziert Wachstumsstopp und inhibiert die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT5 in FLT3-JM-PM-Zellen

PKC412 (Novartis), ein klein-molekularer selektiver FLT3-PTK-Inhibitor, inhibiert FLT3-WT- und aktivierte FLT3-Rezeptoren in leukämischen Zellen (Weisberg, 2002b). Um die inhibitorische Aktivität von PKC412 gegen FLT3-JM-PM-Rezeptoren zu untersuchen, wurden FLT3-V592A-, FLT3-V579A-, FLT3-F594L- und FLT3-F590GY591D-exprimierende Zellen sowie FLT3-ITD-Zellen (FLT3-W51) und FLT3-TKD-Zellen (FLT3-D835Y) für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen PKC412 (0 bis 50 nM) behandelt. Um eine generelle Toxizität der Zellen gegenüber PKC412 auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich in Anwesenheit von IL-3 (10 ng/ml) und 50 nM PKC412 (maximal verwendete Konzentration) inkubiert.

PKC412 zeigte eine stark inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der FLT3-V592A-, FLT3-V579A-, FLT3-F594L-, FLT3-F590GY591D-exprimierenden Zellen in Abwesenheit jedoch nicht in Anwesenheit von IL-3. Der kalkulierte IC_{50} -Wert, d.h. die Konzentration an Inhibitor bei der 50% der ausgesäten Zellen noch viabel sind, war für PKC412 signifikant niedriger in allen FLT3-JM-PM- (< 1 nM) und den FLT3-D835Y-exprimierenden Zellen (< 1 nM) verglichen mit den FLT3-W51-Zellen (5 nM) (Tab. 4.1). Damit sind FLT3-JM-PM-exprimierende Zellen wesentlich empfindlicher gegenüber PKC412 als FLT3-ITD-exprimierende Zellen.

Klasse der Mutation		IC_{50} PKC412 [nM]
FLT3-ITD	W51	5,0
FLT3-TKD	D835Y	0,8
FLT3-JM-PM	V592A	0,7
	V579A	0,8
	F594L	0,9
	F590GY591D	0,7

Tab. 4.1 FLT3-JM-PM-exprimierende Ba/F3-Zellen sind gegenüber dem selektiven FLT3-PTK-Inhibitor PKC412 empfindlich. FLT3-WT-, FLT3-W51-, FLT3-D835Y- und die FLT3-JM-PM-Mutanten FLT3-V592A-, FLT3-V579A-, FLT3-F594L-, FLT3-F590GY591D-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Konzentration von PKC412 (0 to 50 nM) ausgesät und nach 72 h lebende Zellen mittels Trypan-Blau-Exklusion gezählt. Alle Zellen wurden außerdem in Anwesenheit von IL-3 (10 ng/ml) und 50 nM PKC412 kultiviert, um zu bestätigen, dass PKC412 nicht zytotoxisch ist. Der IC_{50} -Wert wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

PKC412 hemmt die Tyrosin-Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors (Weisberg, 2002b), und somit auch den FLT3 nachgeordneten STAT5-Signalweg in FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Zellen (Grundler, 2003). Um die Wirkung von PKC412 in FLT3-JM-PM-Zellen auf nachgeordnete Signalwege von FLT3 zu untersuchen, wurden serum-gehungerte FLT3-V592A-, FLT3-V579A-, FLT3-F594L-, FLT3-F590GY591D- und FLT3-W51-exprimierende Zellen 1 h mit 50 nM PKC412 behandelt, lysiert und die Lysate anschließend im Western-Blot unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper gegen STAT5, MAPK und AKT auf die Aktivierung der drei Signalwege analysiert.

In den mit PKC412 behandelten FLT3-JM-PM-Zellen (FLT3-V592A, FLT3-V579A, FLT3-F594L, FLT3-590G591D) und den FLT3-W51-Zellen konnte, im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, keine Phosphorylierung von STAT5 (Abb. 4.10), MAPK und AKT (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden.

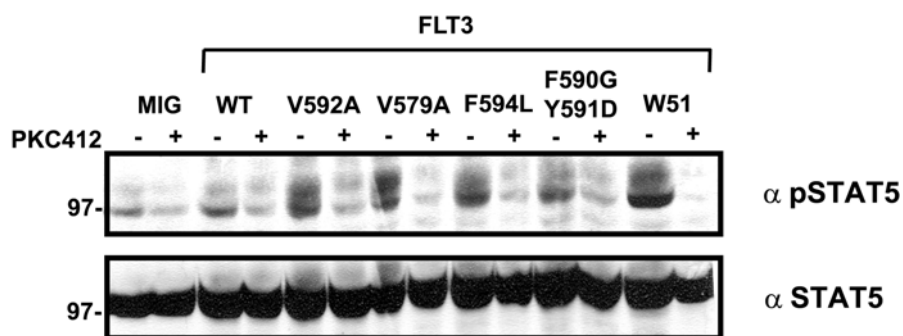


Abb. 4.10 PKC412 inhibiert die Autophosphorylierung von STAT5 in Ba/F3-Zellen, die FLT3-JM-PM-Rezeptoren exprimieren. MIG-Zellen und Zellen, die FLT3-WT, FLT3-W51 und FLT3-V592A, FLT3-V579A, FLT3-F594L, FLT3-F590GY591D exprimieren, wurden für 24 h gehungert und 1 h vor Zellyse mit 50 nM PKC412 (+) oder Medium (-) inkubiert. Es wurde eine Western-Blot-Analyse mit polyklonalem phospho-STAT5-Antikörper durchgeführt. Die Blots wurden gestrippt und anschließend mit polyklonalem STAT5-Antikörper geblottet, um gleiche Proteinmengen an STAT5 in allen Zelllinien zu verifizieren.

Damit wurde bestätigt, dass die Aktivierung von STAT5, MAPK und AKT direkt durch den aktivierten FLT3-Rezeptor erfolgt und das proliferative Signal durch PKC412 blockiert werden kann.

4.2 Charakterisierung des onkogenen Potentials von CBL-Deletionsmutanten in FLT3-exprimierenden Zellen und Analyse der Inzidenz in der AML

Durch die Identifizierung des CBL homologen *Caenorhabditis elegans* Proteins, SLI-1, das die RTK LET-23 negativ reguliert, wurde die Untersuchung der Rolle von CBL in der Maus und im Menschen angeregt (Jongeward, 1995; Yoon, 1995). Für andere Klasse-III-RTKs, wie PDGFR α und KIT, wurde die Beteiligung von CBL an der Liganden-induzierten Signaltransduktion sowie der Negativregulation und Degradierung der aktivierten Rezeptoren beschrieben (Bonita, 1997; Zeng, 2005). Es sollte daher analysiert werden, ob CBL eine Funktion in FLT3-vermittelten Signalwegen zukommt und ob Mutationen im *CBL*-Gen zu einer aberranten Signaltransduktion durch FLT3 führen können. Weiterhin sollte eine mögliche Beteiligung von CBL an der Pathogenese der AML evaluiert werden.

4.2.1 CBL wird in allen AML-Subgruppen, CML- und CLL-Blasten sowie gesunden Knochenmarkproben exprimiert

Die Expression von CBL in AML-Patientenproben sowie gesunden Kontrollproben und CML- bzw. CLL (chronische lymphatische Leukämie)-Patientenproben wurde mittels DNA-Chip-Analyse untersucht. Mit Hilfe der in den 90er Jahren entwickelten DNA-Chip-Technologie ist es möglich, das Expressionsniveau einer sehr hohen Anzahl von Genen simultan zu messen und so, in diesem Fall, die transkriptionelle Aktivität in Blut- oder Knochenmarkproben von AML-Patienten mit der gesunden Probanden zu vergleichen. Die Analyse wurde im Labor für Leukämediagnostik (Dr. Alexander Kohlmann, Prof. Dr. Torsten Haferlach) unter Verwendung des 'Human Genome U133 Set Gene Chip® Arrays' durchgeführt. Dieser Chip enthält fast 45.000 'probe sets' und repräsentiert damit mehr als 39.000 Transkripte, die von annähernd 33.000 bekannten humanen Genen stammen. Aus Patientenmaterial und gesundem Vergleichsmaterial wurden fluoreszenzmarkierte RNA-Proben hergestellt und mit den Oligonukleotiden auf der Oberfläche des Chips hybridisiert. Die Orte und die Intensität der Hybridisierungen wurden nach Abwaschen unspezifisch gebundener Targets über Fluoreszenz-Scanning analysiert. Die Auswertung der vom Labor für Leukämediagnostik erhaltenen Daten ergab eine deutliche Expression von CBL mRNA in allen untersuchten AML-Subgruppen, gesunden Knochenmarkzellen sowie Knochenmarkzellen von Patienten mit CML und CLL (Abb. 4.11, S. 60).

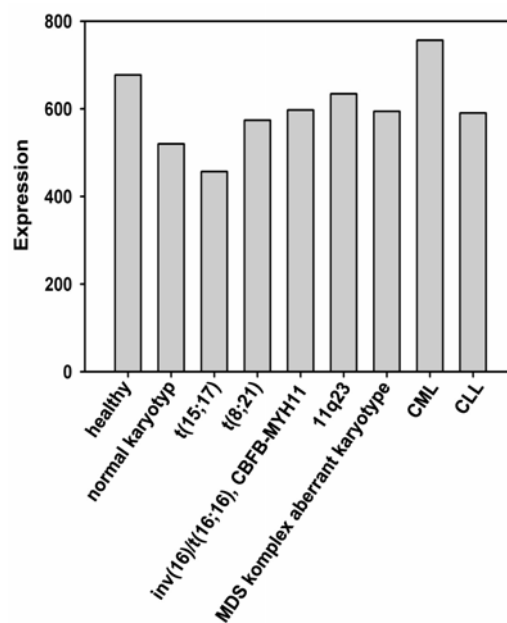


Abb. 4.11 mRNA Expression von CBL im Knochenmark gesunder Kontrollpersonen sowie in verschiedenen Subgruppen von Patienten mit AML, CML und CLL. Mittels Chip-DNA-Analyse (*probesets*: 225231_at, 225231_at, 225234_at, 229010_at, 243475_at) wurde die CBL mRNA-Expression in unterschiedlichen Knochenmarkproben untersucht. Es wurden insgesamt 459 Proben analysiert: 23 gesunde Patientenproben; AML-Patientenproben mit normalem Karyotyp (n=162), t(15;17) (n=35), t(8;21) (n=30), inv16/t(16;16) (n=36), 11q23 (n=41), MDS mit komplex aberrantem Karyotyp (n=51); CML (n=45) und CLL (n=36) Patientenproben.

4.2.2 CBL-WT und potentiell onkogene CBL-Konstrukte wurden stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert

Um das leukämogene Potential des CBL-Proteins funktionell zu analysieren, wurden humane HA (Influenza Hemagglutinin Protein)-getaggte CBL-Konstrukte in den retroviralen Expressionsvektor MIG kloniert (Abb. 4.12, S. 61). CBL-WT und zwei potentiell onkogene Mutanten, CBL-70Z und CBL-655, wurden vom Labor Ivan Dikic, Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt (Dikic, 2003; Soubeyran, 2002). v-CBL wurde durch Einführung eines Stop-Kodons mittels ortsgerichteter Mutagenese selbst hergestellt (v-CBL).

Die CBL-Konstrukte, CBL-WT und die drei Deletionsmutanten CBL70Z, v-CBL und CBL-655, wurden alleine und zusammen mit FLT3-WT stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert. Die FLT3-Expression wurde durch Anfärbung mit CD-135-Antikörper im Durchflusszytometer verifiziert (Detektion der Oberflächenexpression, analog zu 4.1.2; Daten nicht gezeigt). Die Western-Blot-Analyse bestätigte die Expression aller CBL-Konstrukte (Abb. 4.13, S. 61).

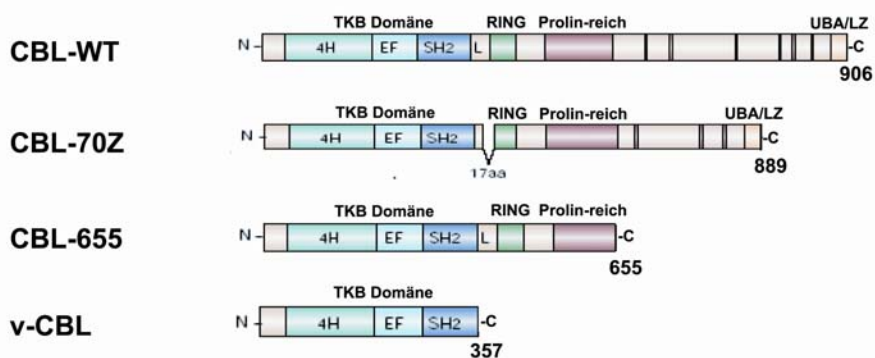


Abb. 4.12 Die in dieser Arbeit verwendeten CBL-Konstrukte. Abgebildet sind die in dieser Arbeit verwendeten humanen CBL-Konstrukte: CBL-WT, CBL-70Z, CBL-655 und v-CBL. CBL-70Z unterscheidet sich im Vergleich zu CBL-WT durch eine 17 AS umfassende interne Deletion in der Linker (L)- und beginnenden RING-Finger-Domäne; CBL-655 und v-CBL sind trunkeerte CBL-Varianten, die jeweils die ersten 655 AS bzw. 357 AS umfassen (CBL-WT 'Genebank Accession Number' NM_005188). Abbildung modifiziert aus (Thien und Langdon, 2001).

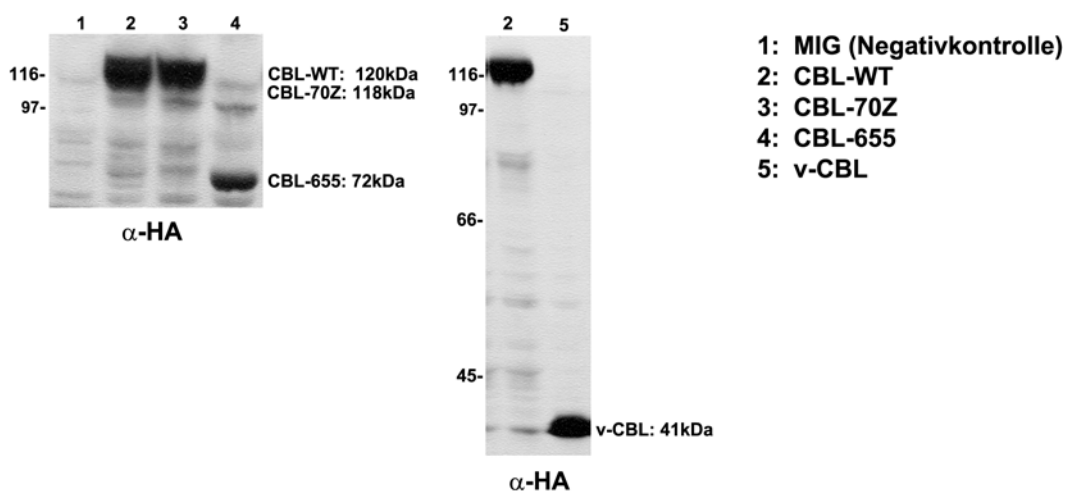


Abb. 4.13 Nachweis der Expression der verwendeten CBL-Konstrukte in Ba/F3-Zellen. Der Nachweis des CBL-Proteins in den transduzierten Ba/F3-Zellen erfolgte mittels Western-Blot-Technik. Die am N-Terminus mit HA getaggten CBL-Konstrukte wurden mit einem monoklonalem HA-Antikörper detektiert: CBL-WT: 120 kDa, CBL-70Z: 118 kDa, CBL-655: 72 kDa, v-CBL: 41 kDa.

4.2.3 Liganden-Stimulierung von FLT3-WT-exprimierenden Ba/F3-Zellen führt zur Phosphorylierung von endogenem CBL

Für andere Klasse-III-RTKs wie KIT und PDGFR α war bereits bekannt, dass CBL nach Liganden-Stimulierung des Rezeptors aktiviert wird (Bonita, 1997; Zeng, 2005). In der Liganden-vermittelten Signaltransduktion von FLT3 gab es bisher nur Hinweise auf eine Beteiligung von CBL u.a. von Tse et. al., der nach Aktivierung eines artifiziellen TEL/FLT3-

Fusionsrezeptors, der die intrazelluläre Domäne von FLT3 enthält, phosphoryliertes CBL nachweisen konnte (Tse, 2000).

Zur Analyse der Aktivierung von CBL nach FLT3-Rezeptoraktivierung wurde endogenes CBL aus Ba/F3-Lysaten unstimulierter und mit FL stimulierter FLT3-WT-Zellen immunpräzipitiert und mit phospho-Tyrosin-Antikörper immunogeblottet. Abbildung 4.14 zeigt, dass die FL-Stimulierung der FLT3-WT-Zellen zu einer starken Tyrosin-Phosphorylierung von endogenem CBL führt, die in nativen Ba/F3-Zellen und unstimulierten FLT3-WT-Zellen nicht nachzuweisen ist.

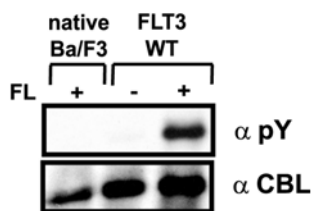


Abb. 4.14 CBL wird nach Liganden-Stimulierung von FLT3-WT-exprimierenden Ba/F3-Zellen phosphoryliert. Native und FLT3-WT-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden 24 h serum-gehungert und unbehandelt (-) oder nach Behandlung mit FL (100 ng/ml) für 5 min (+) lysiert. Endogenes CBL wurde mit polyklonalem CBL-Antikörper immunpräzipitiert und mit phospho-Tyrosin-Antikörper immunogeblottet. Anschließendes Strippen und Blotten mit CBL-Antikörper verifizierte vergleichbare Mengen an CBL.

Damit konnte gezeigt werden, dass CBL durch den Liganden-stimulierten FLT3-Rezeptor phosphoryliert wird.

4.2.4 CBL-70Z- und v-CBL induzieren eine Transformation in FLT3-exprimierenden Zellen

Zur Analyse des transformierenden Potentials der stabil transduzierten CBL- und FLT3/CBL-Zellen wurden Proliferationsexperimente nach Entzug des Wachstumsfaktors IL-3 durchgeführt.

Die Expression der CBL-Konstrukte alleine, d.h. CBL-WT oder eine der drei Deletionsmutanten CBL-70Z, v-CBL und CBL-655, führte nicht zu IL-3 unabhängigem Wachstum in Ba/F3-Zellen (Abb. 4.15.A, S. 63). Die Koexpression von FLT3-WT, das alleine exprimiert nicht transformierend ist, zusammen mit CBL-70Z sowie v-CBL, jedoch nicht mit CBL-WT und CBL-655, induzierte IL-3-unabhängiges Wachstum in Ba/F3-Zellen (Abb. 4.15.B, S. 63). Die Proliferationsrate der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen war nach drei Tagen nicht signifikant unterschiedlich und betrug ca. 30 % der mit IL-3 kultivierten Kontroll-Population. Nach 6 Tagen ist die Proliferationsrate der FLT3-WT/CBL-70Z Zellen um ca. 25 % höher im Vergleich zu den FLT3-WT/v-CBL Zellen. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit 10 ng/ml IL-3 kultiviert. Transduzierte Zellen zeigen in

Anwesenheit von IL-3 ein den nativen Zellen vergleichbares Wachstum (Daten nicht gezeigt).

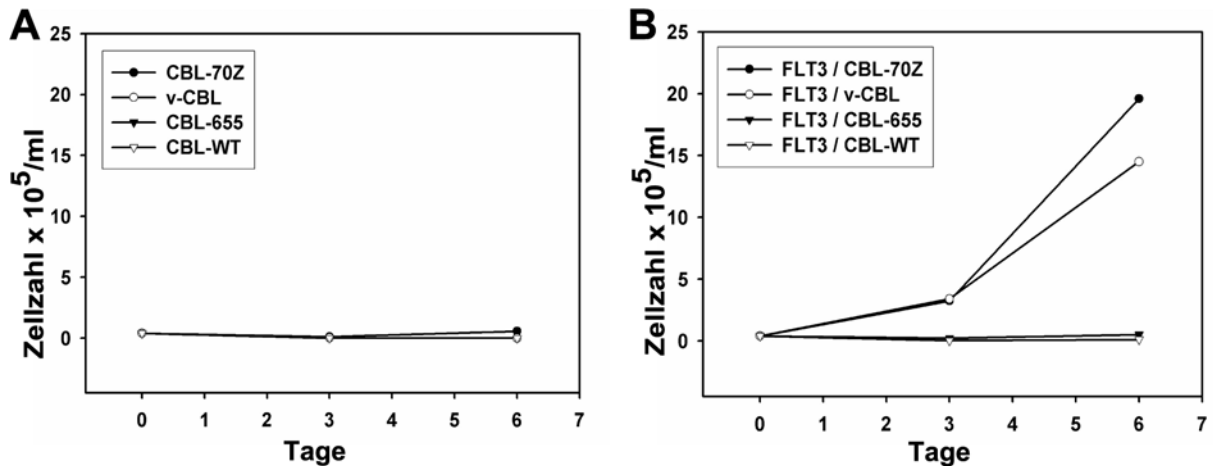


Abb. 4.15 Die Koexpression von FLT3-WT und CBL-70Z führt zu IL-3-unabhängigem Wachstum in Ba/F3 Zellen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml in Abwesenheit von IL-3 ausgesät und an Tag 3 und 6 mittels Trypan-Blau-Exklusion gezählt. **A.** CBL-70Z-, v-CBL-, CBL-655- und CBL-WT-exprimierende Ba/F3 Zellen. **B.** FLT3-WT- und CBL-koexprimierende Ba/F3-Zellen: FLT3-WT/CBL-70Z, FLT3-WT/v-CBL, FLT3-WT/CBL-655 und FLT3-WT/CBL-WT.

Da im Kompartiment der hämatopoetischen Stammzellen und in 70 – 90 % der AML-Blasten der FLT3-Rezeptor und FL koexprimiert werden (Carow, 1996; Rosnet, 1996), wurde die Proliferation der FLT3-WT- und CBL-koexprimierenden Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an FL untersucht. Abb. 4.16 (S. 64) zeigt, dass die potentiell onkogenen Konstrukte v-CBL und CBL-70Z in FLT3-WT-exprimierenden Zellen zu einer Hyperproliferation nach Stimulierung mit FL führen. Durch eine sukzessive Erhöhung der FL-Konzentration bis 100 ng/ml kann die Proliferationsrate konzentrationsabhängig gesteigert werden. Die Proliferationsrate der FLT3-WT- und FLT3-WT/CBL-WT- sowie FLT3-WT/CBL-655-Zellen war nach 72 h in allen Ansätzen nicht signifikant unterschiedlich. Dagegen zeigten die FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen eine bis zu 5-fach erhöhte Proliferationsrate.

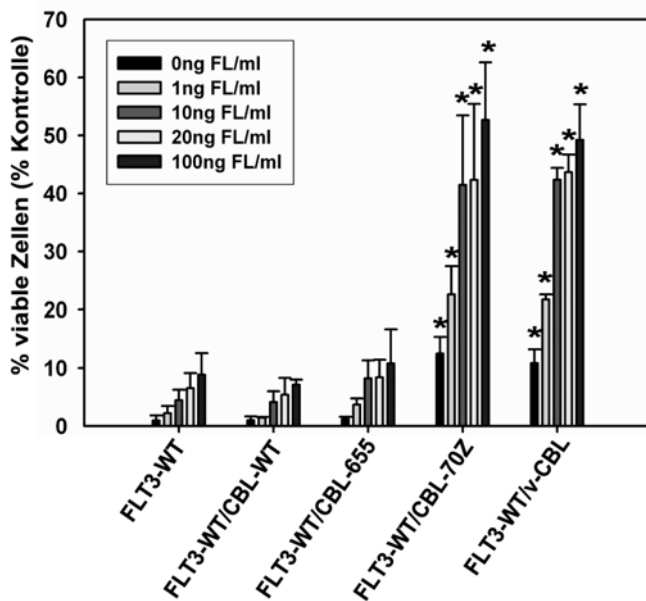


Abb. 4.16 FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen zeigen eine Hyperproliferation in Anwesenheit von FL. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml ausgesät, in Anwesenheit unterschiedlicher FL-Konzentrationen (0 bis 100 ng FL/ml) kultiviert und nach 72 h mittels Trypan-Blau-Exklusion gezählt. Angegeben ist der Prozentsatz viable Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation, die mit IL-3 kultiviert wurde. (T-Test: p-Wert: *= $p < 0,05$)

Zusammengefasst induziert die Koexpression von FLT3-WT mit CBL-70Z oder v-CBL ein transformierendes Potential in Ba/F3-Zellen.

Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Proliferationsexperimenten wurde im Folgenden nur noch mit der CBL-70Z und v-CBL Mutante weitergearbeitet.

4.2.5 Die selektiven FLT3-PTK-Inhibitoren SU5614 und PKC412 heben die Proliferation in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen auf

Um nachzuweisen, dass der pro-proliferative Phänotyp der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen abhängig von der PTK-Aktivität des FLT3-Rezeptors ist, wurden die Zellen in Ab- und Anwesenheit von FL mit zwei strukturell unverwandten selektiven FLT3-PTK-Inhibitoren, SU5614 (ein Indolinon (Spiekermann, 2003b; Yee, 2002)) und PKC412 (ein Benzoylstaurosporin (Weisberg, 2002b)), inkubiert. Die Inhibition von FLT3 durch die FLT3-PTK-Inhibitoren SU5614 und PKC412 führt dosisabhängig zu einer Aufhebung der IL-3-unabhängigen (Daten nicht gezeigt) und FL-induzierten Hyperproliferation (Abb. 4.17 und 4.18, S. 65) der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen. Zellen, die als Kontrolle in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ SU5614 bzw. 100 nM PKC412 und IL-3 kultiviert wurden, zeigten ein unbeeinträchtigtes Wachstum.

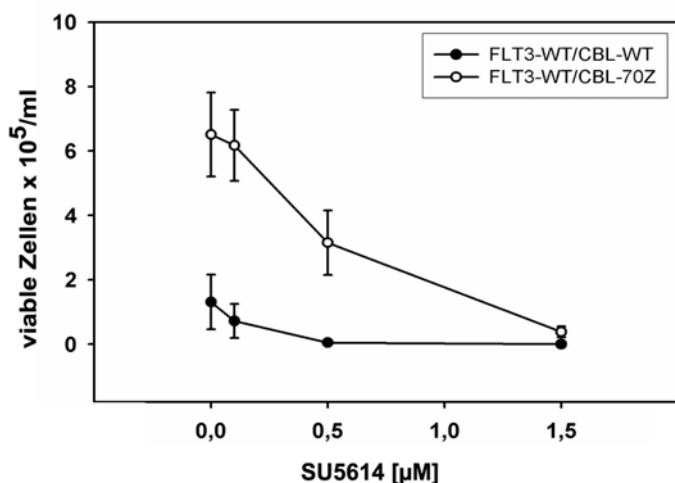


Abb. 4.17 Der selektive FLT3-Inhibitor SU5614 hebt die Hyperproliferation in FLT3-WT/CBL-70Z-exprimierenden Zellen auf. 4×10^4 Zellen wurden in Anwesenheit von 20 ng FL/ml und verschiedenen Konzentrationen von SU5614 (0 bis 5 µM) kultiviert und nach 72 h gezählt. Die Hyperproliferation der FLT3-WT/CBL-70Z-Zellen kann dosisabhängig durch SU5614 inhibiert werden.

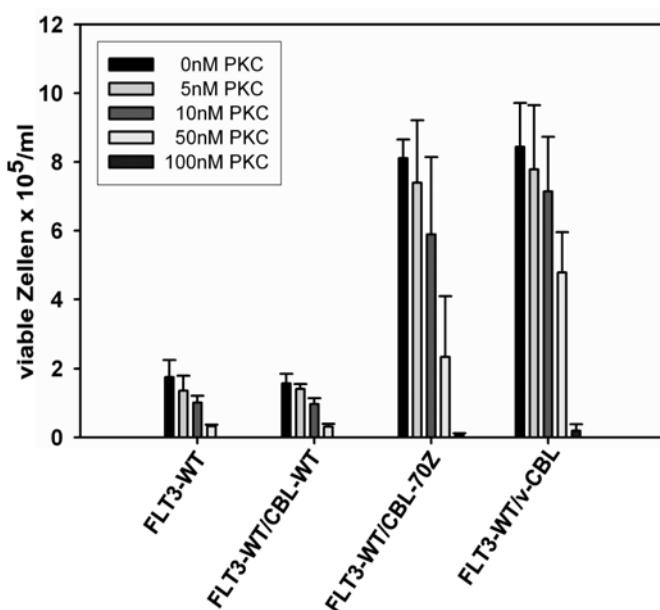


Abb. 4.18 Der selektive FLT3-Inhibitor PKC412 hebt die Hyperproliferation in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-exprimierenden Zellen auf. Die Zellen wurden analog zu den in Abb. 4.17 gezeigten Versuchen analysiert. Es wurden 50 ng FL/ml und 0 bis 100 nM PKC412 verwendet. PKC412 hemmt dosisabhängig das Wachstum der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen.

Tabelle 4.2 (S. 66) zeigt die aus diesen Versuchen ermittelten IC_{50} -Werte für die FLT3/CBL-exprimierenden Zelllinien.

Aus Tabelle 4.2 ist ersichtlich, dass alle untersuchten Zelllinien gegenüber PKC412 und SU5614 in einem Konzentrationsbereich empfindlich sind, der nicht zytotoxisch ist. FLT3-WT/CBL-WT-Zellen erscheinen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen gegenüber FLT3-Inhibitoren etwas weniger empfindlich zu sein, der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Die FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-exprimierenden Zellen sind jedoch signifikant resistenter gegenüber diesen selektiven Inhibitoren als FLT3-WT- und FLT3-WT/CBL-WT-Zellen.

	IC ₅₀ SU5614 [nM]	IC ₅₀ PKC412 [nM]
FLT3-WT	70	13
FLT3-WT/CBL-WT	130	15
FLT3-WT/CBL-70Z	500	25
FLT3-WT/v-CBL	n.d.	> 50
FLT3-ITD	200	5

Tab. 4.2 IC₅₀-Werte der FLT3-Inhibitoren SU5614 und PKC412 für FLT3-WT-, FLT3/CBL- und FLT3-ITD-exprimierende Zelllinien in Gegenwart von FL. Die IC₅₀-Werte für die verschiedenen Zelllinien wurden aus den Versuchen der Abbildungen 4.17 und 4.18 berechnet. Zum Vergleich sind die IC₅₀-Werte der FLT3-ITD-Zellen für SU5614 aus (Bagrintseva, 2004) und für PKC412 aus den Versuchen des Kapitel 4.1.8 angegeben. (n.d.: nicht durchgeführt)

Mit diesen Versuchen konnte belegt werden, dass das Transformationspotential der FLT3-WT- und CBL-70Z- sowie v-CBL-exprimierenden Zellen spezifisch durch FLT3-WT-abhängige Signalwege vermittelt wird. CBL-Mutationen scheinen daher FLT3-regulierte Signalwege derart verändern zu können, dass es zur Transformation kommt.

4.2.6 Spezifische Inhibitoren des PI3K/mTOR-Signalweges hemmen das Wachstum der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen

Um die Signifikanz einzelner Signalwege in den transformierten FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit spezifischen kleinmolekularen Inhibitoren, die einzelne Signaltransduktionsproteine hemmen, inkubiert und die Proliferationsrate mittels WST-Assays bestimmt. Folgende Inhibitoren wurden verwendet: SU6656 inhibiert SRC-Kinasen (Blake, 2000); PD98059 inhibiert MAPK (Alessi, 1995); LY294002 inhibiert PI3K (Vlahos, 1994) und Rapamycin die 'mammalian target of rapamycin' (mTOR)-Kinase (Hidalgo und Rowinsky, 2000; Vezina, 1975).

SU6656 sowie PD98059 bewirkten keine Wachstumshemmung in den FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen (Daten nicht gezeigt), jedoch konnten LY294002 und Rapamycin, spezifische Inhibitoren für den PI3K/mTOR-Signalweg, die Proliferation signifikant, aber nicht vollständig, hemmen (Abb. 4.19, S. 67). Für FLT3-WT/CBL-70Z-Zellen liegt der IC₅₀-Wert bei 3,8 µM für LY294002 und 0,5 nM für Rapamycin sowie für FLT3-WT/v-CBL-Zellen bei 3,0 µM für LY294002 und bei 0,5 nM für Rapamycin. Inkubation der Zellen mit maximaler Konzentration des jeweiligen Inhibitors und IL-3 beeinträchtigte das Wachstum der Zellen nicht (Nachweis der Nicht-Toxizität).

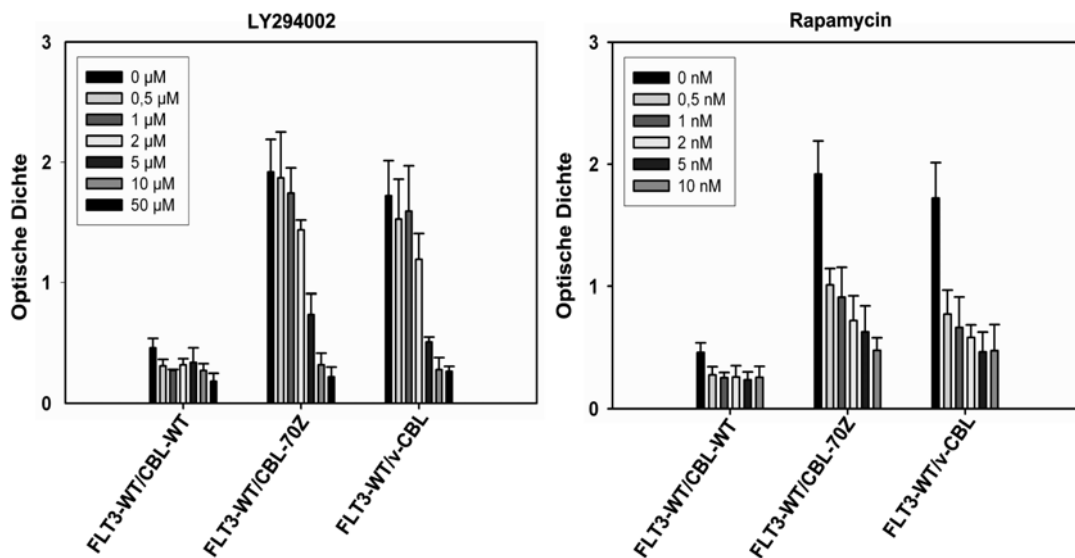


Abb. 4.19 LY294002 (links) und Rapamycin (rechts) hemmen signifikant die Hyperproliferation der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen nach FL-Stimulierung. Die Proliferationsrate der Zellen wurde mit Hilfe des WST-Assays bestimmt. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 50 ng FL/ml und unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren für 72 h inkubiert, der WST-Farbstoff zugegeben und nach 4 h Inkubation im Brutschrank die optische Dichte am ELISA-Reader gemessen.

Somit konnte gezeigt werden, dass SRC-Kinasen und MAPK nicht oder nicht wesentlich, jedoch die Aktivierung der PI3K und mTOR-Kinase entscheidend zum pro-proliferativen Phänotyp der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen beitragen.

4.2.7 Der FLT3-Rezeptor ist in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen konstitutiv aktiviert

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Koexpression von FLT3-WT und CBL-WT bzw. CBL-70Z und v-CBL eine erhöhte Aktivierung von FLT3 zur Folge hat. Die FLT3-Rezeptoren wurden aus Ba/F3-Lysaten immunpräzipitiert und der Phosphorylierungsstatus durch Immunoblotting mit phospho-Tyrosin-Antikörper bestimmt. In unstimulierten Zellen führt die Koexpression von CBL-70Z und v-CBL zu einer starken, die Koexpression von CBL-WT vergleichsweise nur zu einer sehr geringen, konstitutiven Autophosphorylierung des Rezeptors, die mit der Autoaktivierung in FLT3-WT-Zellen vergleichbar ist (Abb. 4.20, S. 68). MG-132, ein Peptid-aldehyd, ist ein reversibler, zell-permeabler 26S-Proteasomeninhibitor, der die Degradierung Ubiquitin-konjugierter Proteine inhibiert (Lee und Goldberg, 1996; Rock, 1994). Die Inkubation der Zellen mit

MG-132 erhöht in allen Zelllinien den Anteil an phosphorylierten Rezeptoren und verdeutlicht, dass das Verhältnis von phosphorylierten Rezeptoren zur Gesamtmenge an Rezeptoren in FLT3/CBL-mutanten Zellen im Vergleich zu FLT3-WT/CBL-WT- und FLT3-WT-Zellen stark erhöht ist. Die Stimulierung mit FL bewirkt in allen Zellen eine starke Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors.

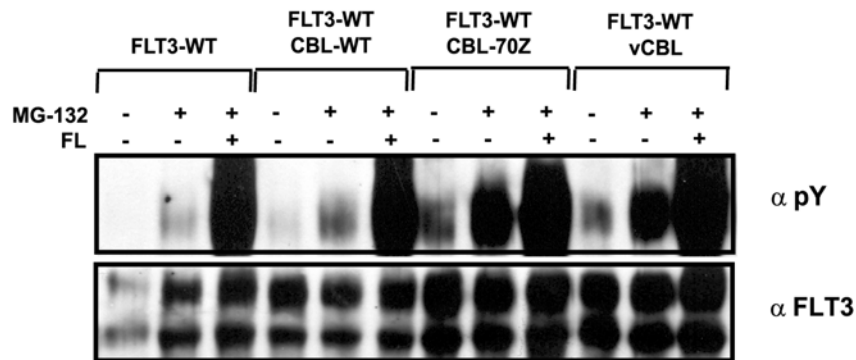


Abb. 4.20 Koexpression von CBL-70Z sowie v-CBL mit FLT3-WT führt zur konstitutiven Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors. Der FLT3-Rezeptor wurde aus Ganzzelllysaten unstimulierter, mit MG-132 (50 μ M für 2 h) behandelter und mit MG-132 und FL (100 ng/ml) behandelter FLT3-WT-, FLT3-WT/CBL-WT-, FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Ba/F3-Zellen immunopräzipitiert und gegen phospho-Tyrosin geblottet. Der Blot wurde gestrippt und mit FLT3-Antikörper inkubiert, um vergleichbare Mengen an FLT3-Protein nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Koexpression von CBL-70Z und v-CBL, nicht aber CBL-WT, zu einer starken Aktivierung des FLT3-Rezeptors führt.

4.2.8 Die FLT3-Signalwege STAT5 und AKT sind in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen hyperaktiv

Aktivierende FLT3-Mutationen führen zur Aktivierung mitogener Signalketten (Hayakawa, 2000; Mizuki, 2000; Spiekermann, 2003a). Als die wichtigsten FLT3 nachgeordneten Komponenten der Signaltransduktion gelten der STAT5-, AKT- und MAPK-Signalweg. Es sollte untersucht werden, welche FLT3-Signalwege für den transformierenden Phänotyp der FLT3/CBL-Mutanten-exprimierenden Zellen verantwortlich sind. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Phosphorylierung der STAT5-, MAPK- und AKT-Proteine in CBL-transduzierten Zellen untersucht. Alleinige Expression der CBL-Konstrukte in Ba/F3-Zellen induziert keine Aktivierung der drei Signalwege (Abb. 4.21 A, S. 69. Daten nur für CBL-70Z-Zellen und phospho-STAT5-Blotting gezeigt). In Abwesenheit von FL konnte eine schwache Aktivierung von STAT5 und AKT in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-

Zellen, jedoch nicht in FLT3-WT (Daten nicht gezeigt für phospho-STAT5) und FLT3-WT/CBL-WT-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.21 A und B). Der Proteasomeninhibitor MG-132 zeigte keine wesentliche Wirkung auf die Phosphorylierung von AKT in den behandelten Zellen. Nach Stimulierung mit FL kommt es zu einer Hyperaktivierung von STAT5 und AKT in den transformierten FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Der MAPK-Signalweg ist in den FLT3-WT/CBL-koexprimierenden Zellen und FLT3-WT-Zellen in gleichem Maße aktiv (Daten nicht gezeigt).

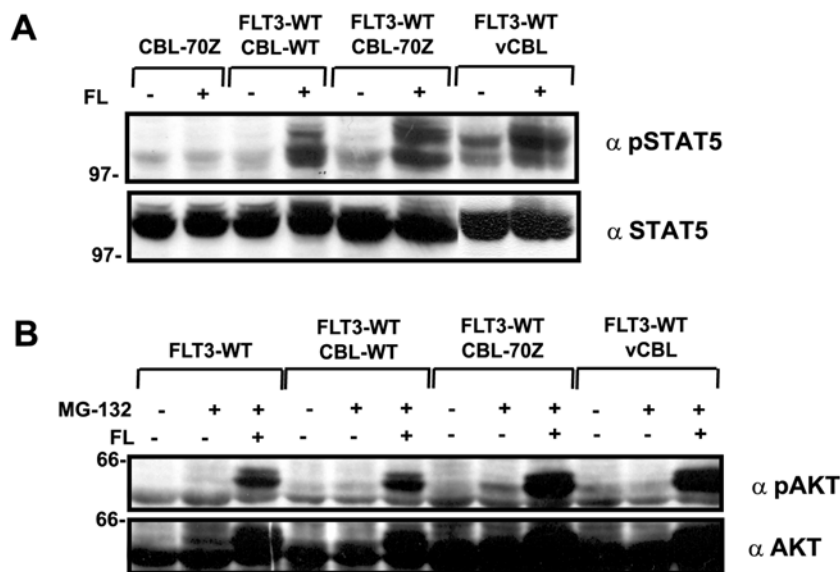


Abb. 4.21 STAT5 und AKT sind konstitutiv aktiv und hyperaktiv nach FL-Stimulierung in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen Ganzzelllysate unbehandelter und mit FL (100 ng FL/ml) behandelter Zellen wurden auf die Phosphorylierung des Signalproteins STAT5 (A) und AKT (B) untersucht. In B wurde zusätzlich der Proteasomeninhibitor MG-132 eingesetzt.

Die Aktivierung der mitogenen Signalwege STAT5 und AKT korreliert mit dem proliferativen Phänotyp der FLT3-WT/CBL-70Z und FLT3-WT/v-CBL Zellen: Die in Abwesenheit des Wachstumsfaktors IL-3 proliferierenden FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen (s. Abb. 4.15) zeigen eine geringe konstitutive STAT5- und AKT-Aktivierung und in Anwesenheit von FL, in Übereinstimmung mit der Hyperproliferation (s. Abb. 4.16) eine starke STAT5- und AKT-Aktivierung.

4.2.9 Die Einführung der Mutation G306E in v-CBL reduziert signifikant das transformierende Potential der FLT3-WT/v-CBL-Zellen

Die negativ-regulatorische Funktion von CBL gegenüber RTKs und PTKs wurde durch Identifizierung des CBL-homologen Proteins in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, SLI-1, das die RTK LET-23 negativ reguliert, entdeckt (Jongeward, 1995; Yoon, 1995). Eine Punktmutation in SLI-1, die Glycin durch Glutaminsäure an Position 315 ersetzt, führte zu einem Verlust der negativ-regulatorischen Funktion (Yoon, 1995). Für den EGFR und PDGFR konnte gezeigt werden, dass die korrespondierende Mutation in v-CBL, G306E, zu einer Aufhebung der Assoziation von v-CBL mit dem Rezeptor und zur Aufhebung der Transformation von Fibroblasten führt (Bonita, 1997; Thien und Langdon, 1997a).

Um die Interaktion zwischen CBL und FLT3-WT zu charakterisieren, haben wir die G306E Mutation in v-CBL eingeführt. G306E in v-CBL reduzierte signifikant die Proliferationsrate der transduzierten Zellen nach IL-3 Entzug und in Anwesenheit von FL (Abb. 4.22).

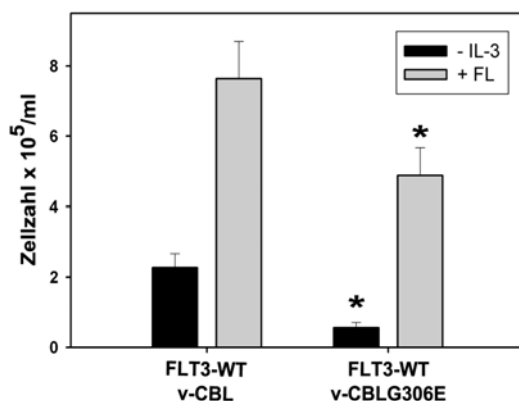


Abb. 4.22 Die Mutation G306E inhibiert den pro-proliferativen Effekt von v-CBL in FLT3-WT/v-CBLG306E Zellen im Vergleich zu FLT3-WT/v-CBL Zellen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml ohne IL-3 und in Anwesenheit von 50 ng FL/ml ausgesät und nach 72 h Inkubation im Brutschrank mittels Trypan-Blau-Exklusion gezählt.

Die Analyse des STAT5- und AKT-Signalweges in FLT3-WT/v-CBLG306E-exprimierenden Ba/F3 Zellen ergab eine geringere Phosphorylierung der beiden Signalproteine nach FL Stimulierung im Vergleich zu FLT3-WT/v-CBL-exprimierenden Zellen und eine nur geringfügig stärkere Phosphorylierung im Vergleich zu FLT3-WT-exprimierenden Zellen (Abb. 4.23, S. 71).

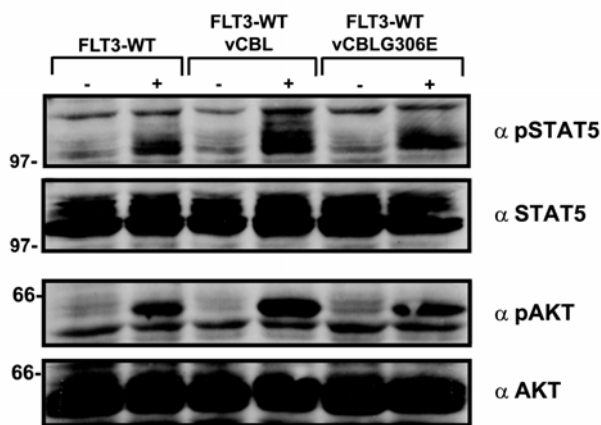


Abb. 4.23 Die Mutation G306E in v-CBL führt zu einer geringeren Aktivierung des STAT5- und AKT-Signalweges in FLT3-WT/v-CBLG306E Zellen im Vergleich zu FLT3-WT/v-CBL-Zellen. Ganzzelllysate unstimulierter (-) und mit 100 ng FL/ml für 5 min stimulierter (+) Zellen beider Zelllinien wurden mittels Western-Blot-Technik und Verwendung spezifischer Antikörper gegen phospho-STAT5 und phospho-AKT analysiert.

Somit korreliert die geringere Proliferationsrate der FLT3-WT/v-CBLG306E-Zellen im Vergleich zu FLT3-WT/v-CBL-Zellen mit einer geringeren Aktivierung der FLT3 nachgeordneten Signalwege, STAT5 und AKT.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die TKB-Domäne von CBL an der Interaktion des FLT3-Rezeptors mit CBL beteiligt ist.

4.2.10 Die Punktmutation der Tyrosine Y589 und Y599 in FLT3 reduziert die Aktivierung von CBL nach FL-Stimulierung

Die Substitution der juxtamembranösen Tyrosine Y568 und Y570 in KIT und Y572 und Y574 in PDGFR α durch Phenylalanin und Expression der mutanten Rezeptoren in Zelllinien führte zu einer starken Reduzierung der SCF- bzw. PDGF α -induzierten CBL-Phosphorylierung und CBL-Degradierung im Vergleich zum WT-Rezeptor (Rosenkranz, 2000; Zeng, 2005).

Um mögliche direkte oder indirekte Bindungsstellen von CBL am FLT3-Rezeptor zu identifizieren, haben wir jeweils Y589 und Y599 durch Phenylalanin substituiert und die mutanten Rezeptoren stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert. Die Stimulierung der mutanten Y589F-FLT3- und Y599F-FLT3-Rezeptoren-exprimierenden Zellen mit FL führte zu einer signifikant geringeren Phosphorylierung des endogenen CBL im Vergleich zu FLT3-WT-exprimierenden Zellen (Abb. 4.24, S. 72). In Y599F-Zellen wurde autoaktiviertes CBL identifiziert, das weder in FLT3-WT-Zellen noch in einer anderen Zelllinie nachzuweisen war. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass Zellen, die eine Kinase-tote Mutante von FLT3, FLT3-KD ('kinase dead', FLT3K644R), exprimieren nicht in der Lage sind CBL zu aktivieren.

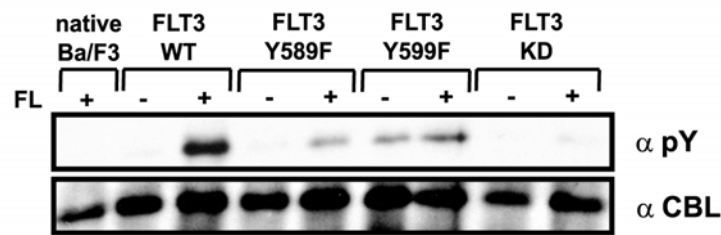


Abb. 4.24 FLT3-Y589F- und FLT3-Y599F-Zellen zeigen eine signifikant reduzierte CBL-Phosphorylierung nach FL-Stimulierung im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen. Endogenes CBL-Protein wurde aus Ganzzelllysaten unstimulierter (-) und mit 100 ng FL/ml für 5 min stimulierter (+) nativer, FLT3-WT-, FLT3-Y589F- und FLT3-Y599F- sowie FLT3-KD-Ba/F3-Zellen immunopräzipitiert und mit phospho-Tyrosin-Antikörper immunoblottet. Anschließendes Strippen und Blotten mit CBL-Antikörper verifizierte vergleichbare Mengen an CBL-Protein.

Damit sind die Tyrosine Y589 und Y599 der juxtamembranösen Domäne an der Interaktion von CBL mit dem FLT3-Rezeptor und der Aktivierung von CBL nach FL-Ligandenstimulierung beteiligt.

4.2.11 Die Internalisierung des FLT3-WT-Rezeptors wird durch Koexpression von CBL-70Z nicht beeinflusst

CBL wird eine entscheidende Rolle in der Liganden-abhängigen Endozytose aktivierter RTKs, z.B. des EGFR, HGFR und PDGFR, zugeschrieben (Petrelli, 2002; Soubeyran, 2002; Szymkiewicz, 2002). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mutationen in CBL die Interaktion zwischen CBL und dem FLT3-Rezeptor stören können und so zu einer verringerten oder verzögerten Internalisierung des Rezeptors und Aufrechterhaltung der Rezeptor-Aktivität führen könnten.

Es wurden Internalisierungsversuche mit FLT3-WT-CBL-koexprimierenden Zellen durchgeführt, wobei FLT3-WT-Zellen als Negativkontrolle und Zellen, die eine Kinase-tote Mutante von FLT3 (FLT3-KD) exprimieren, die nicht internalisiert wird, als Positivkontrolle dienten. Abbildung 4.25 (S. 73) zeigt, dass der FLT3-Rezeptor in FLT3-WT-exprimierenden Zellen fast vollständig innerhalb von 10 - 20 min nach FL-Stimulierung internalisiert wird. Gleichmaßen ist die FLT3-Oberflächen-Expression in FLT3-WT/CBL-70Z-Zellen nach 10 - 20 min nicht mehr nachweisbar, so dass die CBL70Z-Mutante keinen Einfluss auf die Rate und Geschwindigkeit der FLT3-Rezeptorinternalisierung hat und somit andere Mechanismen für die Hyperaktivierung von FLT3 durch CBL70Z verantwortlich sein müssen.

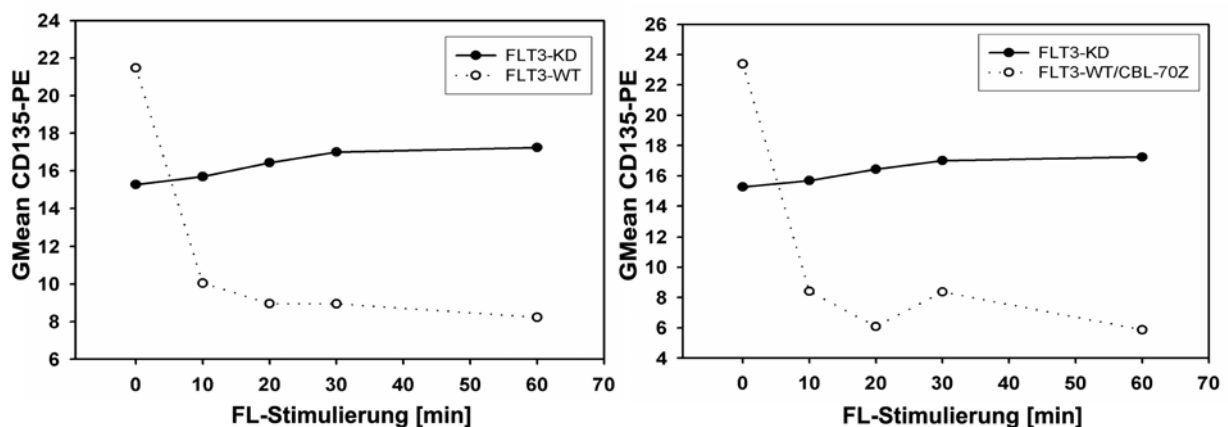


Abb. 4.25 Der FLT3-Rezeptor wird in FLT3-WT- und FLT3-WT/CBL-70Z-Zellen mit gleicher Rate und Geschwindigkeit internalisiert. 3×10^5 Zellen wurden mit 100 ng FL stimuliert, die Reaktion durch Zugabe von Natriumazid-Puffer nach spezifischen Zeitpunkten zwischen 0 und 60 min gestoppt und die Zellen nach Färbung mit FLT3-spezifischem CD135-PE-Oberflächen-Antikörper im FACS Calibur Durchflusszytometer gemessen. Angegeben ist GMean, das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität. Als Positivkontrolle diente die Kinase-tote Mutante von FLT3 (FLT3-KD), die nicht internalisiert wird.

4.2.12 Überexpression von CBL-WT fördert die Dephosphorylierung und Degradierung des FLT3-Rezeptors

Für KIT und PDGFR konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CBL die Phosphorylierung der Rezeptoren verringert und die Degradierung fördert (Bonita, 1997; Rosenkranz, 2000; Zeng, 2005).

Zur Analyse der Regulation des FLT3-Rezeptors durch CBL-WT wurden 293-Zellen mit FLT3-WT oder FLT3-WT/CBL-WT transfiziert und vor der Lyse für 0 bis 120 min mit FL stimuliert. Aus den Lysaten wurde der FLT3-Rezeptor immunopräzipitiert und auf die Phosphorylierung sowie die Proteinmenge des FLT3-Rezeptors untersucht. In FLT3-WT-Zellen ist der Rezeptor nach 30, 60, 90 und 120 min FL-Stimulierung gleichermaßen stark phosphoryliert, im Gegensatz zu CBL-WT-koexprimierenden Zellen, in denen die FLT3-Phosphorylierung nach 60 min im Vergleich zu 30 min Stimulierung bereits signifikant geringer ist (Abb. 4.26, S. 74). Nach 120 min ist der FLT3-Rezeptor in den FLT3-WT/CBL-WT-Zellen im Gegensatz zu den FLT3-WT-Zellen bereits degradiert.

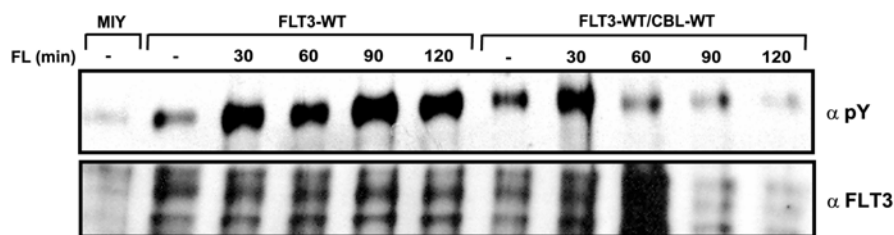


Abb. 4.26 Die Koexpression von CBL-WT und FLT3-WT führt zu einer schnelleren Dephosphorylierung und Degradierung des FLT3-Rezeptors 293-Zellen wurden mit FLT3-WT oder FLT3-WT/CBL-WT transfiziert und nach 48 h für 0, 30, 60, 90 und 120 min mit FL (100 ng FL/ml) stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde das FLT3-Protein immunopräzipitiert und mittels Immunoblotting auf die Tyrosin-Phosphorylierung und FLT3-Proteinmenge untersucht.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass CBL die Dephosphorylierung und Degradierung des FLT3-Rezeptors nach FL-Stimulierung fördert und damit die Aktivität und Proteinmenge des FLT3-Rezeptors in der Zelle negativ reguliert.

4.2.13 Screening von AML-Zelllinien und AML-Patientenproben auf CBL-Deletionsmutanten

4.2.13.1 PCR-Screening-Assay: Die AML-Zelllinien MOLM-13 und MOLM-14 exprimieren ein verkürztes CBL-Transkript

Deletionsmutanten von CBL, wie CBL-70Z und v-CBL, wurden bisher nur in murinen Lymphomen und murinen akuten Leukämien nachgewiesen (Andoniou, 1994; Langdon, 1989a). Kürzlich wurde jedoch über eine humane CBL-Deletionsmutante in der AML-Zelllinie MOLM-13 berichtet, die eine interne CBL-Deletion von 44 AS trägt (Arnoczky, 2005).

In Kooperation mit Dr. Hilmar Quentmeier, DSMZ GmbH, Braunschweig, führten wir ein PCR-Screening auf Deletionen in CBL-Transkripten von 62 AML- und 6 ALL-Zelllinien (Tab. 4.3, S. 75) und 100 AML-Patienten mit normalem Karyotyp durch. Dazu wurde cDNA der Zelllinien bzw. Patientenproben synthetisiert und mit spezifischen Primern die Region Exon 7 bis 9 amplifiziert. Als Positivkontrolle dienten CBL-70Z-exprimierende Ba/F3-Zellen. CBL-70Z ist um die ersten 17 AS in Exon 8 deletiert und weist im cDNA PCR-Screening ein kürzeres PCR-Produkt auf als CBL-WT.

Ein verkürztes CBL-Transkript wurde in der MOLM-13-Zelllinie und in der Schwester-Zelllinie MOLM-14 detektiert, alle anderen untersuchten Zelllinien und die

100 untersuchten AML-Patientenproben exprimierten CBL-Transkripte mit WT-Länge (Abb. 4.27; Daten für MOLM-14 nicht gezeigt).

AML Zelllinien

Zelllinie	FAB	Zelllinie	FAB	Zelllinie	FAB
AML-14	M2	MB-02	M7	OCI-AML5	M4
AML-193	M5	ME-1	M4	OCI-AML6	M4
AS-E2	M6	MEGAL	M7	OCI-M1	M6
CMK	M7	MKPL-1	M7	OCI-M2	M6
CMY	M7	ML-2	M4	OHN-GM	t-AML
CTS	M1	MML1	M1	OMA-AML1	M4
ELF-153	M7	M-MOK	M7	SIG-M5	M5a
EOL-1	HES	MOLM-13	M5a	SKNO-1	M2
F-36 EGM	M6	MOLM-14	M5a	TAHR-87	M1
GDM-1	M4	MOLM-16	M0	TF-1	M6
GF/D8	M1	MONO-MAC6	M5	THP-1	M5
HL-60	M2	MONO-7	M0	TSU-1621-MT	M4
HNT-34	M4	MUTZ-2	M2	U-937	hist. lym.
HT-93-A	M3	MUTZ-3	M4	UCSC/AML1	AML
HU-3	M7	MUTZ-8	M4	UF-1	M3
IMS-M1	M5a	MV4;11	M5	UG-3	M5
K051	M2	MUTZ-11	M4	UKE-1	ET to AML
KG-1	M6	NOMO-1	M5a	UT-7	M7
KP-MO-TS	M5b	OCI-AML1	M4	YK-M2	M2
M-07e	M7	OCI-AML2	M4	YNH-1	M1
MARIMO	M2	OCI-AML4	M4		

ALL Zelllinien

Zelllinie	
KARPAS-231	B-ALL
MHH-CALL-3	pre B-ALL
TANOUE	B-ALL
KARPAS-45	T-ALL
MOLT-14	T-ALL
MOLT-16	T-ALL

Tab. 4.3 Gescreente AML- und ALL-Zelllinien Aufgelistet sind die 62 AML- und 6 ALL-Zelllinien, die mittels des PCR-Screening-Assays auf Deletionen in der Region Exon 7 bis 9 der CBL-Transkripte analysiert wurden.

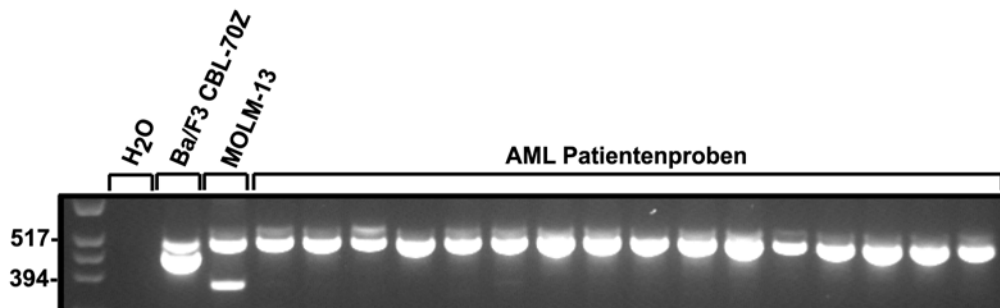


Abb. 4.27 Mittels des PCR-Screening-Assays wurde ein im Vergleich zu CBL-WT deletiertes CBL-Transkript in der MOLM-13-Zelllinie detektiert Der PCR-Screening-Assay für die Region Exon 7 bis 9 der CBL-Transkripte zeigt die PCR-Produkte für die Positivkontrolle (Ba/F3-CBL-70Z-Zellen), die Zelllinie MOLM-13 sowie 16 AML-Patienten mit normalem Karyotyp.

Die aus Blut eines AML-Patienten mit FAB M5a etablierten Schwesterzelllinien MOLM-13 und MOLM-14 exprimieren beide die gleiche CBL-Deletionsmutante. Damit konnten wir zeigen, dass CBL-Mutationen in AML-Patienten vorkommen.

4.2.13.2 Die CBL-Deletionsmutante der MOLM-13-Zellen entsteht durch eine 'splice site'-Mutation

Das im PCR-Screening-Assay aus der cDNA amplifizierte kürzere PCR-Produkt der MOLM-13-Zellen (siehe Abb. 4.27) wurde aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass dieser CBL-Mutante 132 Nukleotide, die für die 44 AS des gesamten Exon 8 kodieren, fehlen. Die Analyse der genomischen DNA der MOLM-13 Zellen ergab eine Deletion von 14 Nukleotiden an der Exon 8 – Intron 8 Grenze, wobei das letzte Nukleotid des Exon 8 und die ersten 13 Nukleotide des Intron 8 fehlen (Abb. 4.28). Diese Deletion führt durch Verlust einer 'splice donor site' zu einer aberranten prä-RNA Prozessierung, die zum Verlust des Exons 8 führt.

```

Exon 7  CTATTTGTTTCCTGATGGACGAAATCAGAATCCTGATCTGACTGGCTTATGTGAACCAACTCCCCAAGACCA
TATCAAAGTGACCCAGgtgagtttggtttcacatgataaccatatacactggacacaagccttagtatattct
Intron 7 ttatagaactgacagcataattgaattcattggaaccattgactagattagtgaatttgtgtgtatgtgggt
ttcactttaaacctggagcttaaaataggaccagactagatgctttctggttaataaaaaataaaccac
tgttgtgacatttttatataagcaaaatttgtataggaacaagtcttcactttttctgttaacattataa
ttgcagttattttattcaactaatagtcttttaatttttttaatacaagGAACAATATGAATTACTGTGA
Exon 8  GATGGGCTCCACATTCCAACATATGTAATAATATGTGCTGAAAATGATAAGGATGTAAGATTGAGCCCTGTGG
ACACCTCATGTGCACATCCTGTCTTACATCCTGGCAGgtacggatctaaacagcgcactttttcagctatgt
Intron 8 aataaccttggaaaattcgggtattatatagcctttactgatacaaggggtggcctggcttttggggtaggt
ttaaacttttactttttttgatctctaggaatgtattttctagttagattaatattttaagtattttcaga
tgcactgttactatcttttgccttcttctgcagGAATCAGAAGGTCAGGGCTGTCCTTTCTGCCGATGTGAA
Exon 9  ATTAAAGGTACTGAACCCATCGTGGTAGATCCGTTTGATCCTAGAGGGAGTGGCAGCCTGTTGAGGCAAGGA
GCAGAGGGAGCTCCCTCCCCAAATTATGATGATGATGATGATGAACGAGCTGATGATACTCTCTTCATGATG
AAGGAATTGGCTGGTGCCAAG
  
```

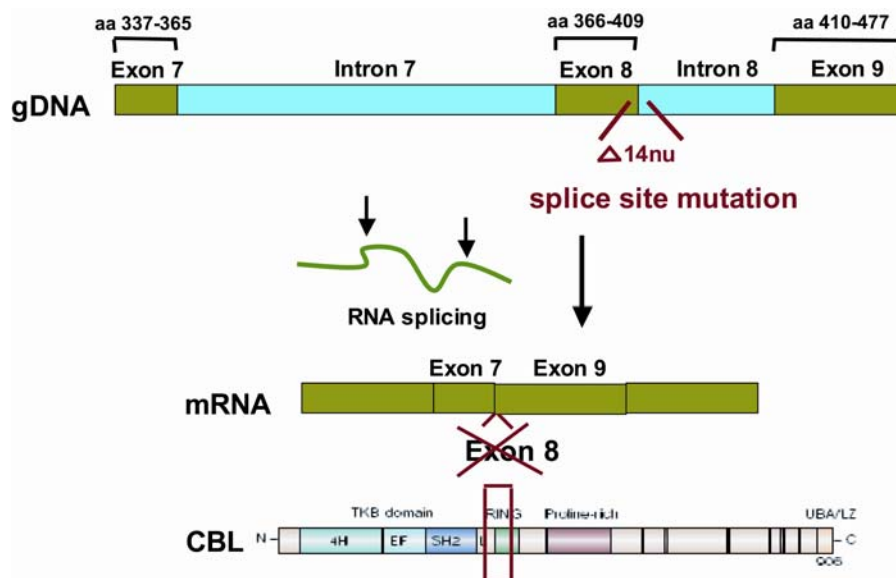


Abb. 4.28 Entstehung der CBL Deletionsmutante in der MOLM-13-Zelllinie Aus MOLM-13-Zellen wurde genomische DNA extrahiert, mit spezifischen Primern die Region Intron 7 – Exon 9 amplifiziert und das PCR-Produkt sequenziert. Die in der genomischen DNA der MOLM-13-Zellen

deletierten 14 Nukleotide sind in rot hervorgehoben und umfassen das letzte Nukleotid des Exons 8 und die ersten 13 Nukleotide des Introns 8 (Genomische Sequenz, Ensembl Gene ENSG00000110395). Diese Mutation resultiert in einem aberranten RNA-Splicing und führt zum Verlust von Exon 8, das für Teile der Linker- und RING Finger-Domäne kodiert. Abbildung der Proteindomänen modifiziert aus (Thien und Langdon, 2001).

Die internen Deletionen des CBL-Proteins in MOLM-13-Zellen und CBL-70Z betreffen beide Exon 8, wobei die Deletion in den MOLM-13-Zellen die gesamten 44 AS des Exon 8 (Δ 366 – 409) umfasst, die CBL-70Z-Deletion lediglich die ersten 17 AS des Exon 8 (Δ 366 – 382). Beide Mutationen führen zu Verlusten in den strukturell wichtigen Domänen der Linker- und RING-Finger-Domäne des Proteins.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 (FLT3-JM-PM)

5.1.1 FLT3-JM-PM-Mutationen definieren eine neue Klasse aktivierender FLT3-Mutationen

Die RTK FLT3 spielt eine wichtige Rolle in der normalen Hämatopoese und ist eines der am häufigsten mutierten Gene in der AML (Yamamoto, 2001; Yokota, 1997). Zwei Klassen aktivierender Mutationen waren vor der Durchführung dieser Studie bereits bekannt: FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutationen. Trotz einer detaillierten Erforschung des *FLT3*-Gens seit der ersten Beschreibung aktivierender Mutationen im Jahre 1996 (Nakao, 1996) konnte unsere Arbeitsgruppe und die Arbeitsgruppe von Stirewalt et al. kürzlich in AML-Zelllinien und Patientenproben bisher unbekannte Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3, FLT3-JM-PM, identifizieren (Spiekermann, 2003b; Stirewalt, 2004). Im Gegensatz zu FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutationen, die in 20 – 25 % bzw. 7 – 10 % der AML-Patienten vorkommen, findet man die FLT3-JM-PM-Mutationen nur in 2 % aller AML-Patienten. Allerdings sind noch weitere Studien, die die gesamte JM-Domäne erfassen, mit einer größeren Patientenzahl notwendig, um die Häufigkeit der FLT3-JM-PM-Mutationen in AML-Patienten zu verifizieren.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand darin, vier der in AML-Patienten gefundenen Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 funktionell zu charakterisieren. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass bestimmte Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 zu wachstumsfaktor-unabhängigem Wachstum von Ba/F3-Zellen, zur Hyperproliferation in Gegenwart von FL und zu anti-apoptotischer Aktivität in Ba/F3-Zellen führen. Die FLT3-JM-PM-Rezeptoren waren konstitutiv autophosphoryliert und unterlagen im Vergleich zu FLT3-WT-Rezeptoren einer höheren spontanen Dimerisierungsrate. Der FLT3 nachgeordnete STAT5-Signalweg war in FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen konstitutiv aktiviert und die Bcl-x(L)-Expression im Vergleich zu FLT3-WT erhöht. Ein selektiver FLT3-PTK-Inhibitor, PKC412, konnte das wachstumsfaktor-unabhängige Wachstum der FLT3-JM-PM-Zellen hemmen und die Phosphorylierung von STAT5 vollständig unterbinden. Um den Phänotyp der FLT3-JM-PM-Mutationen direkt mit den bekannten FLT3-Mutationen vergleichen zu können, wurden alle Experimente, wenn nicht anders beschrieben, parallel mit drei FLT3-ITD-Konstrukten und zwei FLT3-TKD-

Konstrukten in Ba/F3-Zellen durchgeführt. Die FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen zeigten im Vergleich zu FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Zellen einen schwächeren Phänotyp bezüglich Proliferationsrate, anti-apoptotischer Aktivität, FLT3-Rezeptor-Aktivierung und Aktivierung von STAT5.

FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutationen induzieren einen transformierenden Phänotyp, insbesondere konstitutive FLT3-Kinaseaktivität, faktor-unabhängiges Wachstum *in vitro* und ein myeloproliferatives Syndrom *in vivo* (Ihle, 1995; Kelly, 2002a). Die in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsexperimente ergaben, dass die FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen eine schwächere Proliferationsrate aufweisen als die FLT3-ITD- und FLT3-TKD-exprimierenden Zellen. Die häufigste FLT3-TKD-Punktmutation betrifft die hoch konservierte Asparaginsäure D835, der eine Rolle in der Stabilisierung der geschlossenen Konformation der Aktivierungsschleife zugeschrieben wird und deren Mutation zu Tyrosin, Valin oder Histidin ein spontanes Öffnen der katalytischen Tasche und damit eine liganden-unabhängige Aktivierung der Kinase ermöglicht (Griffith, 2004; Yamamoto, 2001). Ähnliche Mutationen in anderen RTKs der Klasse III wurden beschrieben, die auch zur malignen Transformation führen: KIT-D816V (Longley, 1999) und PDGFR α -D842V (Corless, 2005). FLT3-ITD-Mutationen, die zumeist in der JM-Z-Domäne lokalisiert sind, entstehen durch Duplikation einer Aminosäuresequenz von 4 bis 68 Aminosäuren. Es ist nicht bekannt, wie diese duplizierten Sequenzen die Konformation der FLT3-Proteinstruktur verändern. Es wurde vermutet, dass die Verlängerung der JM-Z-Region die Position der JM-S-Region derart verändert, dass JM-S nicht mehr optimal orientiert ist, um JM-B in der Bindungsstelle zu positionieren (Griffith, 2004). Damit könnte eine Verlängerung von JM-Z dazu führen, dass die Formation des autoinhibitorischen Zustandes vollständig verhindert wird. Die in unseren Untersuchungen gefundenen Punktmutationen in der JM-Domäne, FLT3-JM-PM, treten in der JM-S und beginnenden JM-Z-Region, nicht jedoch in der JM-B-Region auf, die die eigentliche inhibitorische Region, die starke intramolekulare Kontakte mit allen anderen Strukturen des Proteins eingeht, darstellt. Damit befinden sich die betroffenen Aminosäuren nicht, wie die FLT3-TKD-Mutationen, in einer Schlüsselstruktur des Proteins und verändern, im Gegensatz zu FLT3-ITD-Mutationen, die Proteinkonformation nur in sehr geringem Ausmaß. Obwohl FLT3-ITD-Mutationen die gleichen Aminosäuren wie FLT3-JM-PM betreffen können, verändern sie vermutlich die Proteinkonformation in anderer Weise. Verglichen mit FLT3-ITD-Mutationen, induzieren die FLT3-JM-PM-Mutationen nur eine kleine Veränderung in der strukturellen Chemie dieser Region und könnten trotzdem noch die Formation des autoinhibitorischen Zustandes erlauben. Eine vollständige (FLT3-ITD) versus einer

partiellen Interferenz (FLT3-JM-PM) mit dem autoinhibitorischen Zustand würde die höhere Proliferationsrate der FLT3-ITD- im Vergleich zu den FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen erklären. In Gegenwart von FL proliferieren alle FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen mit einer 2 - 4fach erhöhten Proliferationsrate im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen. Der durch die Punktmutation erzielte Proliferationsvorteil ist somit in Anwesenheit von FL stärker ausgeprägt. Die Stimulierung mit FL führt zu einer Konformationsänderung des FLT3-Proteins, dessen resultierende Struktur nicht bekannt ist. Unsere Daten lassen vermuten, dass die Punktmutationen in der JM-Domäne diese Konformationsänderung beeinflussen und die Aktivierung von FLT3 durch FL verstärken, eventuell durch einen erleichterten Zugang zu den Phosphorylierungsstellen Y589 und Y591. FL wird in primären AML-Blasten sehr häufig koexprimiert (Drexler, 1996; Meierhoff, 1995; Zheng, 2004), so dass der verstärkte pro-proliferative Effekt der Punktmutanten in Anwesenheit von FL die *in vivo* Situation eher widerspiegeln könnte. Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine einzige Punktmutation in der JM-Domäne ausreicht, um den Rezeptor konstitutiv zu phosphorylieren und die spontane Dimerisierungsrate zu erhöhen.

Des Weiteren haben wir FLT3 nachgeordnete Signalwege untersucht. Die Analyse des STAT5-Signalweges ergab, dass die FLT3-JM-PM-Rezeptoren in Abwesenheit von FL STAT5 in stärkerem Maße aktivieren als FLT3-WT-Rezeptoren. STAT5 wird als wichtigster nachgeordneter Signalweg von FLT3 betrachtet und wird eng mit Tumorentwicklung und Tumorprogression in Zusammenhang gebracht (Bowman, 2000). STAT5 reguliert direkt die Transkription von Proteinen wie Cyclin-D1/D2, die den Zellzyklus regulieren, und induziert die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-x(L) (Calo, 2003). Die Untersuchung wichtiger STAT5-Zielgene ergab, dass Bcl-x(L) in den FLT3-JM-PM-Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen stärker exprimiert wird. Bcl-x(L) gehört zur Familie der Bcl-2-Proteine und spielt eine wichtige Rolle in der Resistenz gegenüber apoptotischem Zelltod durch Regulation des Membranpotentials der Mitochondrien (Vander Heiden, 1997). Bcl-x(L) ist in einem hohen Prozentsatz der AML-Patienten überexprimiert, was mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden ist (Schaich, 2001). Die erhöhte Expression des Bcl-x(L)-Proteins erklärt den in FLT3-JM-PM-Zellen beobachteten anti-apoptotischen Phänotyp dieser Zellen. Es wurden außer STAT5 der MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg hinsichtlich deren Aktivierung untersucht, jedoch wurde nur eine geringfügig stärkere Aktivierung von AKT und eine gleiche Aktivierung von MAPK in FLT3-JM-PM-Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen gefunden, so dass angenommen wird, dass STAT5 das entscheidende Signal für die Transformation der Zellen vermittelt. Im

Vergleich zu FLT3-TKD- und FLT3-ITD-exprimierenden Zellen ist sowohl die Aktivierung des FLT3-Rezeptors als auch die Aktivierung von STAT5 in FLT3-JM-PM-exprimierenden Zellen geringer. Diese Unterschiede scheinen für den schwächeren Phänotyp der FLT3-JM-PM-Zellen verglichen mit den FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Zellen verantwortlich zu sein. Der außergewöhnliche Erfolg des klein-molekularen Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Gleevec (STI571), Novartis) in der Behandlung der CML hat die Entwicklung anderer molekularer Krebstherapeutika angeregt. FLT3 ist ein durch Überexpression und aktivierende Mutationen vielversprechendes Ziel einer AML-Therapie. Es konnten verschiedene FLT3-PTK-Inhibitoren identifiziert werden, die in der Lage sind, in Zelllinien, die aktivierte FLT3-Mutanten exprimieren, Apoptose zu induzieren und das Überleben von Mäusen, die FLT3-Mutanten im Knochenmark exprimieren, zu verlängern (Kelly, 2002c; Levis, 2002; Weisberg, 2002a; Yee, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die inhibitorische Aktivität von PKC412 auf FLT3-JM-PM- sowie FLT3-ITD- und FLT3-TKD-exprimierende Ba/F3-Zellen untersucht. Die dargestellten Daten belegen, dass das von den FLT3-JM-PM induzierte IL-3-unabhängige Zellwachstum durch PKC412 vollständig gehemmt werden kann. Darüberhinaus inhibiert PKC412 vollständig die Aktivierung von STAT5, womit gezeigt werden konnte, dass FLT3 ein direktes Target für PKC412 ist und die mitogenen Signalwege des Rezeptors abzuschalten vermag. FLT3-JM-PM- und FLT3-TKD-exprimierende Zellen waren wesentlich empfindlicher gegenüber der Behandlung mit PKC412 als FLT3-ITD-exprimierende Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen damit Erkenntnisse aus früheren Studien, dass die Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren für die verschiedenen Mutanten des gleichen Proteins variieren kann. Für KIT-JM- und KIT-TKD-Mutanten wurde eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber STI571 beobachtet (Frost, 2002). Grundler et al konnten bereits zeigen, dass das Wachstum von FLT3-TKD- im Gegensatz zu FLT3-ITD-exprimierenden Zellen mit wesentlich geringeren PKC412 Konzentrationen gehemmt wird (Grundler, 2003). Die hohe Sensitivität der FLT3-JM-PM-Zellen gegenüber PKC412 könnte aufgrund des geringeren Transformationspotentials entstehen, aber dennoch lässt dies vermuten, dass Patienten mit Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3 auf die Behandlung bereits geringer Dosen von FLT3-PTK-Inhibitoren ansprechen könnten. Damit sollte dem Einsatz von FLT3-PTK-Inhibitoren in der Therapie von AML-Patienten immer eine genaue Analyse der vorliegenden Mutation vorangehen.

Die Lokalisation und funktionelle Analyse der FLT3-JM-PM-Mutationen erlaubt die Definition einer neuen, der dritten Klasse aktivierender Mutationen in FLT3. Tabelle 5.1 (S. 82) fasst die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zusammen.

	FLT3-WT	FLT3-ITD	FLT3-TKD	FLT3-JM-PM
IL-3-unabhängige Proliferation ¹	-	+++	++	+
Anti-apoptotische Aktivität ²	-	+++	+++	+
Rezeptor-Autoaktivierung ³	-	++	++	+
STAT5-Autoaktivierung ⁴	-	+++	+++	+

Tab. 5.1 Vergleich der Phänotypen der FLT3-JM-PM- und FLT3-ITD- sowie FLT3-TKD-exprimierenden Ba/F3-Zellen. Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse bezüglich IL-3-unabhängigem Wachstum, anti-apoptotischer Aktivität, Rezeptor-Autoaktivierung und STAT5-Autoaktivierung sind zusammengefasst.

¹: “+++” = 80 – 100 %; “++” = 50 – 79 %; “+” = 5 - 49%; “-“ < 5 % viable Zellen in Prozent des +IL-3 Wachstums nach 72 h (Abb. 4.3)

²: “+++” = < 10 %; “++” = 10 – 24 %; “+” 25 – 50 %; “-“ > 50 % apoptotische Zellen nach 48 h (Abb. 4.5)

³: “+++” > 70 %; “++” = 40 - 70 %; “+” = 10 - 39 %; “-“ < 10 % phosphoFLT3 des Gesamt-FLT3-Proteins (Abb. 4.6)

⁴: “+++” ≥ 50 %; “++” = 36 – 49 %; “+” = 16 – 35 %; “-“ ≤ 15 % phosphoSTAT5 des Gesamt-STAT5-Proteins (Abb. 4.8)

5.1.2 Einfluss von FLT3-JM-PM-Mutationen auf die Konformation der autoinhibitorischen JM-Domäne von FLT3

In FLT3-JM-PM-Zellen reicht die Substitution einer einzelnen Aminosäure des FLT3-Proteins aus, um ein transformierendes Potential in hämatopoetischen Zellen zu induzieren. Aus diesem Grund haben wir den Effekt der Punktmutationen auf die FLT3-Kristallstruktur analysiert. In Zusammenarbeit mit Prof. Karl-Peter Hopfner (Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München) haben wir die FLT3-JM-PM-Mutationen auf die Struktur des FLT3-Proteins kartiert (Abb. 5.1, S. 83). Ausgehend von der Kristallstruktur ist es offensichtlich, dass diese Punktmutationen an einer Kern-Interaktionsstelle der JM-Domäne mit dem Rest des Moleküls lokalisiert sind. Es scheint daher wahrscheinlich, dass diese Mutationen die Stabilität der JM-Domäne in der autoinhibitorischen Konformation reduzieren (für eine detaillierte Analyse der einzelnen Substitutionen siehe: (Reindl, 2006)).

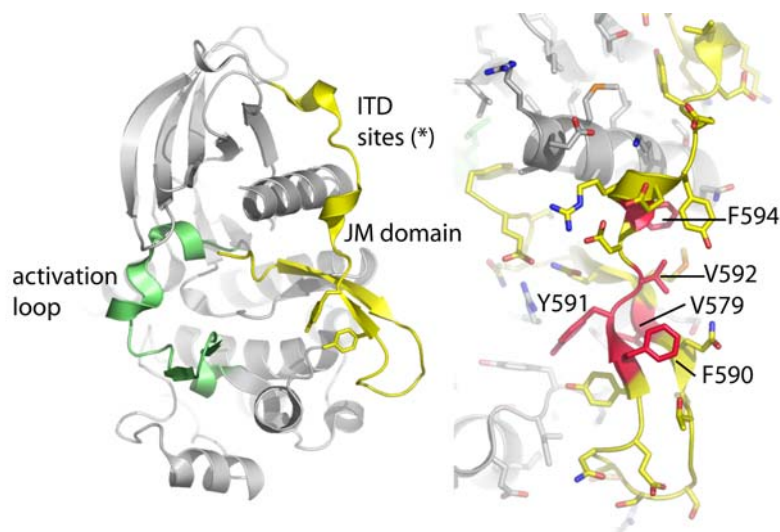


Abb. 5.1 Kartierung der FLT3-JM-PM-Mutationen auf die Kristallstruktur des FLT3-Proteins.
Abbildung aus (Reindl, 2006)

Die Wirkung der FLT3-JM-PM unterstützt ein Modell, in dem sich die JM-Domäne im Falle einer Aktivierung der Kinase neu orientiert. Diese Umstrukturierung könnte normalerweise durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste Y589 und Y591 gefördert werden, im Falle der aktivierenden Mutationen jedoch gleichermaßen durch eine Destabilisierung der autoinhibitorischen Konformation der JM-Domäne. Nach dieser Theorie könnten die Mutationen die Tyrosin-Phosphorylierung in der JM-Domäne und damit die gesamte Trans-Phosphorylierung und Aktivierung der Kinase begünstigen.

5.1.3 Die JM-Domäne ist innerhalb der Klasse-III-RTKs hoch konserviert – Ein Vergleich mit Mutationsanalysen anderer RTKs dieser Familie

Die JM-Domäne ist innerhalb der Mitglieder der Klasse-III-Rezeptor-Familie stark konserviert. Vor der Auflösung der FLT3-Kristallstruktur wurden verschiedene biochemische und Mutationsstudien durchgeführt, um die Funktion der JM-Domäne zu entschlüsseln. Eine Studie von Irusta und DiMaio untersuchte 1998 das erste Mal eine Punktmutation in der JM-Domäne einer Klasse-III-RTK (Irusta und DiMaio, 1998). Diese Gruppe konnte zeigen, dass die Substitution einer einzelnen Aminosäure, V536A, im murinen PDGFR β zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führt. Da diese Region innerhalb der Klasse-III-RTKs stark konserviert ist, analysierte Irusta et al. auch Alanin-Substitutionen in anderen RTKs der Klasse III an homologen Positionen zu V536. In

gleicher Weise aktivierten die folgenden Substitutionen die RTKs: V568A in humanem PDGFR β , V561A in humanem PDGFR α , I552A in humanem FMS und V559A in humanem KIT. Sequenzhomologie-Analysen der JM-Domäne des murinen PDGFR β , des humanen FMS und des humanen KIT ließen ein gemeinsames Motiv mit starker Ähnlichkeit zu WW-Domänen erkennen, das auch in anderen Signaltransduktionsproteinen vorhanden ist. WW-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen in dem sie an Prolin-reiche Motive in der Form PPXY binden (Macias, 2002). Eine Studie aus dem Jahr 2002 brachte weiteren Einblick in die Rolle der JM Domäne in der Rezeptoraktivierung. Irusta et al. führten eine systematische Mutationsanalyse der JM-Domäne des murinen PDGFR β durch, indem jede einzelne Aminosäure von Position R529 bis W561, eine Sequenz die fast die gesamte JM-Domäne des PDGFR β umfasst, zu Alanin mutiert wurde (Irusta, 2002). Die mutanten Rezeptoren wurden in IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen exprimiert und die konstitutive Tyrosin-Phosphorylierung untersucht. Alanin-Substitutionen an ~ 25 % der Positionen der JM-Region führten zu IL-3-unabhängigem Wachstum in Ba/F3-Zellen und erhöhten signifikant die Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung. Ein hypothetisches Modell der JM-Domäne aus einer kurzen α -helix, gefolgt von drei anti-parallelen β -Strängen (sehr ähnlich der bekannten WW-Domäne), zeigte eine auffällige Korrelation: Aktivierende Mutationen traten alle in zentralen Positionen des ersten und zweiten β -Strangs und entlang einer Seite des β -Faltblattes auf und nicht-aktivierende Mutationen befanden sich in den die Sekundärstrukturen verbindenden Polypeptidketten. Dieser Befund stützte die Hypothese, dass Mutationen aktivierend sind, die die Struktur der JM-Domäne stören. Weitere Bestätigung für die autoinhibitorische Funktion und Konformation der JM-Domäne in Klasse-III-RTKs wurden von Ma et al. erbracht (Ma, 1999). Diese Gruppe führte, ähnlich Irusta et al., ein Mutations-Screening in der JM-Domäne von KIT durch, indem elf aufeinander folgende Aminosäuren, beginnend bei M552 bis Ile-563, zu Alanin mutiert wurden. Alle Aminosäuren, die entlang der hydrophoben Seite einer möglichen amphipathischen α -Helix lokalisiert waren (Y553, W557, V559, V560), welche vermutlich engen Kontakt mit der Kinase-Domäne hat, waren kritische Stellen für eine autonome Rezeptoraktivierung. Dies wurde in einer Studie von Chan et al. bestätigt (Chan, 2003). Ein synthetisches Peptid, das die JM-Region umspannt, konnte sich als autonome Domäne falten und direkt an die N-terminale Kinase-Region binden. Die Einführung einer V559/V560-Doppel-Deletion in das Peptid führte zu einer signifikant reduzierten Affinität der JM-Domäne zum 'N lobe' der Kinase-Domäne und zeigte in kinetischen Studien eine signifikant schnellere Aktivierungszeit im Vergleich zur wt-KIT-Kinase.

Die in dieser Arbeit gezeigte Autophosphorylierung der Punktmutanten in der JM-Domäne von FLT3 (Abb. 4.6) ist übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den oben beschriebenen Mutationsstudien von Irusta und Ma et al., die homologe Positionen in KIT und PDGFR β untersuchten. Sowohl die V560A-Mutation in KIT als auch die V550A-Mutation in PDGFR β , die jeweils homolog zu V579A und V592A in FLT3 sind, resultierten in einer Autophosphorylierung des Rezeptors (Irusta, 2002; Ma, 1999). Die Mutationen von I537A und D551A in PDGFR β , korrespondierend zu den FLT3-Positionen V579 und F594, zeigten, entsprechend den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, eine starke bzw. schwache Autophosphorylierung (Irusta, 2002).

Zusammenfassend weisen alle bisherigen Studien und die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Studie darauf hin, dass Mutationen in der JM-Domäne der Klasse-III-RTKs zu einer gestörten Sekundärstruktur und damit einer verminderten Bindungsaffinität an den 'N lobe' der Kinase-Domäne führen und so in einer erhöhten Autophosphorylierung und Kinaseaktivität des Rezeptors resultieren.

5.1.4 Punktmutationen in der JM-Domäne von Klasse-III-RTKs treten auch in anderen malignen Erkrankungen auf

Eine Vielzahl maligner Erkrankungen mit aktivierenden Mutationen in der JM-Domäne des KIT-Rezeptors wurden beschrieben (Hirota, 1998; Kanakura, 1994; Kitayama, 1995; Longley, 2001; Nakahara, 1998; Nishida, 1998; Tsujimura, 1996). U.a. findet man in mehr als der Hälfte aller GIST verschiedene genetische Alterationen in KIT, einschließlich Deletionen, Insertionen und Substitutionen einzelner Aminosäuren, die in *in vitro* Modellen zur Transformation führen. Es wurden zwei mögliche 'Hot Spot'-Regionen, Kodons 550 – 560 und 567 – 576, vorgeschlagen (Corless, 2004; Lasota, 1999). Eine häufig betroffene Position ist KIT-V560. Diese Aminosäure ist homolog zu V579 in FLT3, die in einem AML-Patienten mutiert gefunden und in dieser Arbeit funktionell charakterisiert wurde (FLT3-V579A). Darüber hinaus ist die zweite Region, AS 567 – 576 in KIT, teilweise homolog zu FLT3 und beinhaltet alle anderen in AML-Patienten berichteten Punktmutationen (FLT3-V592A, FLT3-F590GY591D, FLT3-F594L). In manchen Fällen von GIST, die negativ für KIT-Genmutationen waren, wurden aktivierende Mutationen im PDGFR α beschrieben, die in homologen Regionen der PDGFR α -JM-Domäne lokalisiert sind (Corless, 2004). Die Anhäufung dieser Mutationen in der JM-Domäne von sowohl KIT, PDGFR α als auch FLT3 unterstreicht deren spezifische biologische Signifikanz. Für die GIST-Mutationen wurde vermutet, dass diese wahrscheinlich früh in der Pathogenese der GIST erworben werden

und sie mit einem aggressiveren klinischen Fortschritt der Erkrankung verbunden sind (Singer, 2002; Taniguchi, 1999). Weitere Studien in der Zukunft müssen die prognostische Bedeutung der FLT3-JM-PM-Mutationen in der AML noch aufklären.

Die Beispiele GIST und AML zeigen damit eindrücklich, dass Mutationen in der autoinhibitorischen JM-Domäne der Klasse-III-RTKs an der Pathogenese maligner Erkrankungen beteiligt sind.

5.2 Analyse des Phänotyps von onkogenen CBL-Deletionsmutanten in FLT3-exprimierenden Zellen und das Vorkommen in der AML

Die Entdeckung des zellulären CBL-Protoonkogens erfolgte 1989 durch die Identifikation des v-CBL-Onkogens in dem murinen transformierenden Cas NS-1-Retrovirus, der pre-B- und pro-B-Lymphome sowie gelegentlich akute Leukämien in Mäusen verursacht (Langdon, 1989a). Cas NS-1 entwickelte sich durch sequenzielle Rekombination mit endogenen retroviralen Sequenzen und dem zellulären CBL-Protoonkogen aus dem ecotropen Cas-Br-M-Virus, der ursprünglich aus einer kalifornischen Wildmaus isoliert wurde. Das entstandene 100-kDa gag-CBL-Fusionsprotein wurde als verantwortlich für die Transformation identifiziert und enthält die v-CBL-Sequenz (Langdon, 1989a). Bereits 1989 wurde nachgewiesen, dass in verschiedenen murinen und humanen hämatopoetischen Tumor-Zelllinien neben der CBL-WT mRNA verschiedene kleinere Transkripte existieren (Langdon, 1989a), was darauf hinweist, dass Mutationen im *CBL*-Gen in humanen Tumoren häufiger vorkommen könnten, als bisher angenommen. Neben v-CBL wurden bisher noch drei andere natürlich vorkommende CBL-Mutanten beschrieben: CBL-70Z (Andoniou, 1994; Blake, 1991), p95CBL (Bisson, 2002) und HUT-CBL (Blake und Langdon, 1992). CBL-70Z wurde aus einer murinen pre-B-Lymphoma-Zelllinie isoliert und als verantwortlich für die Tumorinduktion beschrieben (Andoniou, 1994; Blake, 1991; Lovering, 1993). Eine Mutation in der genomischen DNA der 70Z/3-Zellen an einer 'splice acceptor site' verursacht ein aberrantes Splicing am nächsten AAG Kodon, der ersten 'AG'-Sequenz des Exons 8 (Andoniou, 1994). Dies führt zum Verlust von 51 Nukleotiden, jedoch nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens. Eine weitere Deletionsmutante, p95CBL, wurde aus der murinen Retikulum Sarkoma-Zelllinie, J-774 isoliert (Bisson, 2002). Das onkogene p95CBL trägt eine interne Deletion von 111 AS (Δ 366 – 477), die an der gleichen AS wie CBL-70Z beginnt und zur Deletion von Exon 8 und 9 führt. Sowohl die 70Z/3-B-Zell-Lymphoma- als auch die J-774-Retikulum-Sarkoma-

Zelllinie wurden aus Mäusen etabliert, die einer Tumorinduktion durch Behandlung mit Karzinogenen unterzogen wurden (Bisson, 2002; Paige, 1978). Es ist möglich, dass p95 CBL wie CBL-70Z das Ergebnis eines aberranten Splicings ist und diese *'splice acceptor site'* ein Hotspot für Mutationen in der murinen CBL-Sequenz darstellt. Alternativ könnte p95CBL das Produkt einer genomischen Deletion sein, was für die Präsenz einer Mutations-sensitiven Region innerhalb des *cbl*-Lokus spricht. In der humanen T-Lymphom-Zelllinie HUT78 wurde ein trunkiertes CBL-Protein identifiziert, das durch eine genetische Relokalisation des *cbl*-Lokus verursacht wird und nicht-transformierend ist (Blake und Langdon, 1992). HUT-CBL kodiert für die ersten 655 AS des CBL-WT, somit fehlt der größte Teil des C-Terminus inklusive Leuzin-Zipper-Domäne und Teile der Prolin-reichen Region.

5.2.1 CBL-70Z und v-CBL transformieren FLT3-exprimierende Ba/F3-Zellen

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, zu klären, ob CBL in die FLT3-nachgeordnete Signaltransduktion involviert ist und Mutationen in CBL zu einer Verminderung oder einem Verlust der Negativ-Regulation der FLT3-Rezeptoraktivität und damit zur Transformation FLT3-exprimierender Zellen führen können.

Die FL-Stimulierung von FLT3-WT-exprimierenden Ba/F3-Zellen führte zu einer starken Phosphorylierung des endogenen CBL-Proteins. Die Koexpression der CBL-Deletionsmutanten CBL-70Z oder v-CBL mit FLT3 führte zu IL-3-unabhängigem Wachstum in Ba/F3-Zellen und zu einer Hyperproliferation nach FL-Stimulierung im Vergleich zu FLT3-WT und FLT3-WT/CBL-WT-Zellen. Die Behandlung der FLT3-WT/CBL-mutanten Zellen mit den selektiven FLT3-PTK-Inhibitoren SU5614 und PKC412 konnte die Proliferation vollständig aufheben. Durch spezifische Inhibitoren der PI3K und mTOR-Kinase, jedoch nicht der SRC-Kinasen und MAPK, wurde die FL-induzierte Hyperproliferation der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen signifikant, jedoch nicht vollständig gehemmt. Die FLT3-Rezeptoren und der FLT3-nachgeordnete STAT5-Signalweg waren in FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen konstitutiv aktiv und FL-Stimulierung führte zu einer Hyperaktivierung des STAT5- und AKT-Signalwegs im Vergleich zu FLT3-WT und FLT3-WT/CBL-WT-Zellen. Die Einführung der *'loss-of-function'*-Mutation G306E in v-CBL reduzierte signifikant sowohl die IL-3-unabhängige und FL-abhängige Proliferation als auch die Aktivierung von STAT5 und AKT in FLT3-WT/v-CBL-Zellen. Die Expression der Tyrosin-mutierten Rezeptoren FLT3-Y589F und FLT3-

Y599F in Ba/F3-Zellen führte zu einer starken Verminderung der Aktivierung des endogenen CBL nach FL-Stimulierung im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen.

Genetische Studien in *C. elegans* mit dem CBL-homologen Protein SLI-1 und der EGFR homologen RTK LET-23 lieferten erste Hinweise, dass CBL-Proteine Negativ-Regulatoren von PTK-Signalwegen in Zellen sind (Jongeward, 1995; Yoon, 1995). Studien in *Drosophila*, bei denen D-CBL den EGFR-Signalweg negativ reguliert und damit die Entwicklung der R7-Photorezeptor-Zellen beeinflusst, bestätigten diese Beobachtung (Meisner, 1997). Die Funktion der CBL-Protein-Familie ist in Säugetierzellen konserviert (Keane, 1999). So wurde 1995 von Galisteo et. al. gezeigt, dass CBL direkt an den Tyrosin-phosphorylierten EGFR bindet und nach EGF-Stimulierung phosphoryliert wird (Galisteo, 1995). CBL ist ein frühes und prominentes Substrat der Tyrosin-Phosphorylierung in der Signalübertragung nach Aktivierung zahlreicher Zelloberflächen-Rezeptoren, u.a. 'T-cell receptor' (TCR), 'B-cell receptor' (BCR) (Cory, 1995; Donovan, 1994), 'granulocyte-macrophage colony-stimulating factor' (GM-CSFR), 'erythropoietin receptor' (EpoR) und IL-3-Rezeptor (Barber, 1997; Odai, 1995), EGFR (Bowtell und Langdon, 1995; Galisteo, 1995) und die Klasse-III-RTKs PDGFR, FMS und KIT (Rohde, 2004; Tanaka, 1995; Wang, 1996; Zeng, 2005) (Review in: (Lupher, 1998)). Für eine Funktion von CBL in der FLT3-nachgeordneten Signaltransduktion gab es bisher nur wenige Hinweise. Lavagna-Sevenier et al untersuchte verschiedene humane hämatopoetische Zelllinien, die endogenes FLT3 exprimieren, auf die Tyrosin-Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine nach FL-Behandlung und konnte in myeloischen Zellen eine CBL-Phosphorylierung detektieren (Lavagna-Sevenier, 1998). Tse et. al. detektierte phosphoryliertes CBL nach Aktivierung eines artifiziellen TEL/FLT3-Fusionsrezeptors, der die intrazelluläre Domäne von FLT3 enthält (Tse, 2000). In dieser Arbeit konnte eindeutig belegt werden, dass in FLT3-WT-infizierten Ba/F3-Zellen im Gegensatz zu nativen Zellen, die kein endogenes FLT3 exprimieren, nach FL-Stimulierung eine starke Aktivierung von CBL erfolgt. CBL scheint daher in der Signaltransduktion von FLT3 eine bedeutende Rolle zu spielen.

Andoniou et. al. untersuchten den Phänotyp der CBL-70Z- und v-CBL-Mutanten in NIH3T3-Fibroblasten und konnten zeigen, dass beide Deletionsmutanten im Gegensatz zu überexprimiertem CBL-WT zur morphologischen Transformation, Koloniebildung in Soft-Agar-Assays und Tumorinduktion in Nacktmäusen führen (Andoniou, 1994). Das onkogene Potential von CBL-70Z war im Vergleich zu v-CBL größer (Andoniou, 1994). Diese Ergebnisse wurden mehrfach bestätigt, u.a. von Ojaniemi et. al. der einen Verlust

der Kontaktinhibition, jedoch Wachstumsfaktor-abhängiges Wachstum für CBL-70Z transfizierte NIH3T3-Zellen beschrieb (Ojaniemi, 1998).

Die Koexpression von CBL-70Z und v-CBL mit FLT3, jedoch nicht die Koexpression von CBL-WT und CBL-655 mit FLT3, sowie die Expression eines CBL-Konstrukts alleine führte zu IL-3-unabhängigem Wachstum und Hyperproliferation nach FL-Stimulierung. Damit waren FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-, jedoch nicht FLT3-WT/CBL-655- - exprimierende Ba/F3-Zellen transformiert, wobei CBL-70Z-Zellen eine etwas höhere Proliferationsrate aufwiesen als v-CBL-Zellen. In Übereinstimmung mit den Experimenten von Andoniou et. al. und Blake et. al. kommt es durch Überexpression von CBL-WT und CBL-655, das dem aus der HUT78-Zelllinie isolierten HUT-CBL entspricht, zu keiner Transformation (Andoniou, 1994; Blake und Langdon, 1992). Zur Aktivierung des onkogenen Potentials von CBL durch Mutationen ist nach einer Studie von Thien et al, der eine Reihe artifizierlicher CBL-Mutanten untersuchte, das entscheidende Ereignis die Entfernung von zusätzlichen AS in der Linker-Region N-terminal zum RING-Finger, was bei CBL-70Z und v-CBL, jedoch nicht bei CBL-655, der Fall ist (Thien, 2001).

Die Behandlung der Zellen mit den selektiven FLT3-Inhibitoren SU5614 und PKC412 konnte die IL-3-unabhängige (Daten nicht gezeigt) und die FL-abhängige Proliferation der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen vollständig unterbinden. Damit wurde eindeutig belegt, dass die Transformation durch den FLT3-Rezeptor vermittelt wird. Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Proliferationsexperimenten, in denen die Überexpression von CBL-70Z und v-CBL alleine nicht ausreicht, um eine Transformation zu induzieren.

Zur Evaluierung, welche Signalproteine an der von FLT3-vermittelten Transformation in den FLT3-WT/CBL-mutanten Zellen beteiligt sind, haben wir Proliferationsexperimente in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren durchgeführt. Eine signifikante Hemmung der FL-abhängigen Proliferation der FLT3-WT/CBL-mutanten Zellen wurde mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen des PI3K-Inhibitor LY294002 und des mTOR-Inhibitors Rapamycin erzielt. Damit scheint die Aktivierung des PI3K-Signalweges wesentlich an der FL-induzierten Hyperproliferation der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen beteiligt zu sein. PI3K und die nachgeordneten Kinasen AKT und mTOR regulieren wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellproliferation, -wachstum und Apoptose in Säugetieren. Mutationen der Komponenten dieses Signalweges sind in zahlreichen malignen Erkrankungen gefunden worden (Vivanco und Sawyers, 2002). Der PI3K/AKT-Signalweg ist ein wichtiger Signaltransduktionsweg downstream von FLT3 (Stirewalt und Radich, 2003). Eine direkte Bindung der p85-Untereinheit der PI3K an FLT3 wurde bisher noch

nicht nachgewiesen, jedoch bildet FLT3 Komplexe unter Beteiligung mehrerer Proteine wie GRB2, GAB2, SHIP, SHP2 und CBL, die p85 aktivieren (Zhang und Broxmeyer, 2000). Die Assoziation von CBL mit der p85-Untereinheit der PI3K konnte mehrfach gezeigt werden, u.a. in BCR/ABL-transformierten Zellen, in denen sich ein multimerer Komplex mit Signalproteinen aus CBL, PI3K, c-CRK und CRKL formt (Miura, 2003; Ren, 2005; Sattler, 1996; Standaert, 2004). Es ist daher ein Mechanismus denkbar, dass die Überexpression von CBL-70Z und v-CBL zu einer verstärkten Aktivierung der PI3K führt und im Zusammenspiel mit FLT3 der AKT-Signalweg übermäßig aktiviert wird.

Interessanterweise haben der MAPK-Inhibitor PD980559 und der SRC-Kinasen-Inhibitor SU6656 keine anti-proliferative Wirkung auf die FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen. Die beiden Kinasen sind damit nicht substantiell am transformierenden Phänotyp beteiligt, obwohl sie in FLT3-nachgeordnete Signalwege involviert sind (Hayakawa, 2000; Robinson, 2005; Spiekermann, 2003a). SRC-Kinasen sind bekannte Interaktionspartner von CBL (Hunter, 1999; Kim, 2004) und für den EGFR wurde beschrieben, dass die Inhibition der SRC-Kinasen mit PP1 die Phosphorylierung von CBL blockiert (Kassenbrock, 2002). Eine Kooperation zwischen SRC und CBL bei der PDGFR-Downregulierung nach PDGF-Stimulierung, deren Störung zu einer verstärkten Proliferation führt, wurde beschrieben (Rosenkranz, 2000). Obwohl vor kurzem SRC-Kinasen als direkte Interaktionspartner des FLT3-Rezeptors beschrieben wurden (Heiss, 2006), sind SRC-Kinasen entsprechend unseren Erkenntnissen nicht an der FL-induzierten Proliferation des FLT3-Rezeptors beteiligt. Die Behandlung mit SU6656 hatte keinen Einfluss auf die FL-induzierte Proliferation der FLT3-WT-Zellen (Daten nicht gezeigt) ebenso wie die Proliferation der FLT3-WT/CBL-mutanten Zellen.

In Einklang mit der Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen konnten wir in beiden Zelllinien im Gegensatz zu den Kontrollzellen eine konstitutive Tyrosinphosphorylierung der FLT3-Rezeptoren nachweisen. Durch Einsatz von MG-132, das den proteasomalen Proteinabbau inhibiert, konnte noch deutlicher gezeigt werden, dass die Rate phosphorylierter FLT3-Rezeptoren zur Gesamtmenge an vorhandenen FLT3-Rezeptoren in FLT3-WT/CBL-mutanten Zellen höher ist als in Kontrollzellen. Der Effekt des proteasomalen Inhibitors auf die Stabilisierung der phosphorylierten Form des Rezeptors ist aus Studien mit dem EGFR bekannt und ist kein Nachweis, dass der Abbau des FLT3-Rezeptors im Proteasom erfolgt. Vielmehr ist im Falle des EGFR und auch anderer Rezeptoren die lysosomale Degradierung von der proteasomalen Aktivität abhängig (Carpenter und Cohen, 1976; King, 1980; Longva, 2002)

Der FLT3-nachgeordnete Signalweg STAT5, der als wichtigster pro-proliferativer Signalweg gilt, war in FLT3-WT/CBL-mutanten Zellen konstitutiv aktiv. Nach FL-Stimulierung wurde eine Hyperaktivierung des STAT5- und PI3K/AKT-Signalweges beobachtet und dies korreliert mit der Hyperproliferation der FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen. Die Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs können die Proliferation der FLT3-WT/CBL-mutanten-Zellen daher signifikant, jedoch nicht vollständig hemmen.

Um mögliche Interaktionsstellen von CBL und FLT3 zu untersuchen, haben wir in beiden Molekülen Aminosäuren mutiert, die eine Interaktion vermitteln könnten. CBL kann über die TKB-Domäne oder über Adaptorproteine wie GRB2, die eine Bindung über die Prolinreiche-Region vermitteln, an phosphorylierte Tyrosinreste der Rezeptoren binden. Die Einführung der SLI-1-homologen 'loss-of-function' Mutation in CBL, G306E, zielt auf eine Schlüsselstruktur in der TKB Domäne, die variante SH2-Region, von CBL ab, die eine phosphorylierungs-abhängige Bindung an RTKs und PTKs vermittelt (Jongeward, 1995; Meng, 1999; Yoon, 1995). Für den EGFR und PDGFR konnte eine vollständige Aufhebung der Bindung von v-CBLG306E an den Rezeptor nachgewiesen werden (Bonita, 1997; Thien und Langdon, 1997a). Der Proliferationsversuch mit FLT3-WT/v-CBL- und FLT3-WT/v-CBLG306E-Zellen zeigt deutlich, dass das transformierende Potential der FLT3-WT/v-CBL-Zellen sensitiv gegenüber der G306E-Mutation ist, da diese Punktmutation die Proliferationsrate nach IL-3-Entzug und in Abhängigkeit von FL signifikant verringert sowie die Aktivierung von STAT5 und AKT reduziert. Die Wirkung der G306E-Mutation in CBL-70Z bezüglich der Proliferationsrate der FLT3-WT/CBL-70Z-Zellen muss noch evaluiert werden.

Die Tyrosine der JM-Domäne der RTKs der Klasse III vermitteln wichtige Protein-Protein-Interaktionen für die Signaltransduktion dieser Rezeptoren. Vor kurzem wurden SRC-Kinasen und SHP2 als direkte Interaktionspartner mit den Tyrosinen Y589 und Y599 des FLT3-Rezeptors identifiziert (Heiss, 2006). Die Mutation dieser *in vivo* Autophosphorylierungsstellen in der JM-Domäne des FLT3-Rezeptors zu Phenylalanin, Y589F und Y599F, und Expression der mutanten Rezeptoren in Ba/F3-Zellen führte in unseren Experimenten zu einer drastischen Reduktion der CBL-Phosphorylierung nach FL-Stimulierung im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen. Damit wird belegt, dass CBL entweder direkt oder indirekt über Adaptorproteine wie z.B. GRB2 mit dem FLT3-Rezeptor interagiert. Ein ähnlicher Effekt wurde durch Mutation der Tyrosine Y568 und Y570 in KIT und Y572 und Y574 in PDGFR α erzielt (Rosenkranz, 2000; Zeng, 2005) und lässt den Schluss zu, dass die Interaktion von CBL mit den phosphorylierten Tyrosinen der JM-

Domäne innerhalb der RTKs der Klasse III konserviert ist. Die Mutation einzelner Tyrosine der JM-Domäne führte im Falle von KIT und PDGFR α , sowie auch in dieser Studie, nicht zur vollständigen Aufhebung der CBL-Phosphorylierung. Für den FMS wurde eine Interaktion über ein Tyrosin der JM-Domäne, Y599 (Rohde, 2004), sowie eine Bindung an ein C-terminales Tyrosin, Y973, beschrieben (Wilhelmsen, 2002). Auch für KIT wurde vor kurzem eine zusätzliche Interaktionsstelle im C-Terminus, Y936, identifiziert (Masson, 2006). Daher scheint es wahrscheinlich, dass CBL an mehrere Regionen des FLT3-Rezeptors binden kann und möglicherweise Tyrosine in der C-terminalen Region beteiligt sind.

Der Phänotyp der FLT3-Y589F und FLT3-Y599F-Zellen muss noch untersucht werden, jedoch ist die Aufhebung der CBL-Bindung durch onkogene Mutationen in anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren als kritisches Ereignis für eine Transformation beschrieben worden. HGFR wird von CBL ubiquitiniert und negativ reguliert (Peschard, 2001). Dem onkogenen durch eine chromosomale Translokation entstandenen TPR-HGFR fehlt die CBL-Bindungsstelle. Der Rezeptor ist konstitutiv aktiv, wird nicht mehr ubiquitiniert und induziert so eine Transformation von Zellen (Peschard, 2001). Die Mutation der CBL-Bindungsstelle des HGFR-Rezeptors reicht aus, um eine Liganden-unabhängige, onkogene Aktivierung des HGFR zu verursachen (Peschard, 2001). FMS wird auch von CBL ubiquitiniert (Mancini, 2002) und die onkogene Form, v-Fms, ist um ein C-terminales Tyrosin (Y977) deletiert, das die Bindungsstelle für CBL ist (Mancini, 2002). Interessanterweise wurden auch Punktmutationen der CBL-Bindungsstelle in FMS in Patienten mit Myelodysplasie und AML gefunden (Baker, 1995; Ridge, 1990), so dass die Aufhebung der CBL-vermittelten Negativregulation ein häufiger Mechanismus der Transformation zu sein scheint (Peschard und Park, 2003).

Die Rezeptor-Downregulierung der RTKs beinhaltet die Liganden-induzierte Endozytose der aktivierten RTKs und die anschließende Degradierung der Proteine über den lysosomalen oder proteasomalen Abbauweg. Die Interaktion von CBL mit dem Adaptorprotein CIN85, das wiederum mit Endophilin komplexiert ist, fördert die RTK-Endozytose (Soubeyran, 2002). Für EGFR und HGFR wurde die Notwendigkeit der Bildung des CBL/CIN85/Endophilin-Komplexes für die Beschleunigung der Endozytose und damit die Abschwächung des Rezeptorsignals gezeigt (Dikic, 2003; Petrelli, 2002; Soubeyran, 2002). Eine CIN85-trunkierte Mutante konnte nicht mit CBL assoziieren und verringerte die Rate der EGFR-Internalisierung, so dass die CBL-Adaptorfunktion zwischen EGFR und CIN85 als essentiell angesehen wird (Soubeyran, 2002). Die gleichen Ergebnisse wurden für den HGFR beschrieben (Petrelli, 2002). In CBL null-Makrophagen

wurde der FMS langsamer internalisiert (Lee, 1999). Die Überexpression von CBL führte zu einer verstärkten Endozytose des EGFR in CHO-Zellen (Levkowitz, 1999) und beschleunigte die Liganden-induzierte Internalisierung des PDGFR in NIH3T3-Zellen (Miyake, 1998). In den von uns durchgeführten Internalisierungsversuchen wurde der FLT3-Rezeptor in FLT3-WT und FLT3-WT/CBL-WT-koexprimierenden Zellen mit gleicher Internalisierungsrate und –geschwindigkeit internalisiert (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind dafür die hohen endogenen CBL-Proteinmengen in Ba/F3-Zellen verantwortlich, so dass eine Überexpression keinen weiteren Effekt zeigt. Auch die Überexpression der CBL-70Z-Mutante veränderte die Internalisierungsrate und –geschwindigkeit nicht. Dies stimmt überein mit der Beobachtung, dass CBL-70Z ebenso wie CBL-WT den EGFR und CIN85 rekrutieren kann (Soubeyran, 2002). Allerdings wurde im Widerspruch zu den hier gezeigten Ergebnissen eine reduzierte, jedoch nicht vollständig aufgehobene EGFR-Endozytose in Anwesenheit von CBL-70Z im Vergleich zu CBL-WT in CHO-Zellen beschrieben (de Melker, 2004). Mittels Immunohistochemie konnte in einer Studie von Jiang et. al. die genaue Lokalisation des EGFR nach Rezeptoraktivierung in CBL-WT- und CBL-mutanten-exprimierenden Zellen untersucht werden. CBL-70Z inhibierte nicht die Rekrutierung des EGFR in die ummantelten Einstülpungen der Membran. Jedoch verblieben die Rezeptoren in CBL-70Z-Zellen im Gegensatz zu den CBL-WT-Zellen in den Einstülpungen, also verhinderten sie die späten Schritte der Vesikel-Bildung. Da in unserem Assay nur ein Verschwinden der FLT3-Rezeptoren von der Zelloberfläche detektiert werden konnte, könnte dies die beobachteten Unterschiede erklären (Jiang und Sorkin, 2003).

Als die entscheidende Funktion von CBL in der Negativ-Regulation der Rezeptoren wird jedoch die E3-Ligase-Aktivität und die damit verbundene Ubiquitinierung der Rezeptoren durch CBL angesehen. Die EGFR-Ubiquitinierung findet an der Zelloberfläche statt, ist jedoch nicht essentiell für die Rezeptor-Endozytose (de Melker, 2001; Longva, 2002), sondern für den Transfer des EGFR in frühe Endosomen und für die CBL-induzierte Degradierung der Rezeptoren (Duan, 2003; Longva, 2002). Mittels CBL -/- Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Liganden-induzierte Ubiquitinierung des EGFR durch CBL notwendig für eine wirksame Degradierung des EGFR ist (Duan, 2003). Die CBL-Überexpression verstärkte die Rezeptor-Downregulierung, d.h. eine beschleunigte Dephosphorylierung und eine Reduktion der Rezeptor-Proteinmenge, unterschiedlicher Rezeptoren: EGFR (Levkowitz 1998), PDGFR (Miyake, 1998), FMS (Lee, 1999) und KIT (Zeng, 2005).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CBL-WT die Dephosphorylierung und Degradierung des FLT3-Rezeptors in FLT3-WT-exprimierenden Zellen beschleunigt. Die Funktion von CBL scheint daher innerhalb der Rezeptoren-Familie und insbesondere innerhalb der RTKs der Klasse III stark konserviert. In weiterführenden Versuchen muss noch untersucht werden, ob der FLT3-Rezeptor von CBL ubiquitiniert wird.

Die Koexpression von CBL-70Z oder v-CBL verstärkt, im Gegensatz zu CBL-WT, nicht die Rezeptor-Downregulierung des ErbB1-Rezeptors und dessen Ubiquitinierung (Levkowitz, 1998). Da im Falle des ErbB1-Rezeptors die Internalisierungsrate durch die Koexpression von CBL-WT nicht beeinflusst wurde, wurde postuliert, dass CBL an den späten Schritten der Endozytose und weniger an der Initiierung beteiligt ist. In v-CBL-exprimierenden Zellen wurden die internalisierten Rezeptoren im Vergleich zu CBL-WT-Zellen vermehrt recycelt (Levkowitz, 1999; Levkowitz, 1998). In einer Studie von Thien et. al. wurde gezeigt, dass CBL-70Z den EGFR nicht ubiquitinieren kann und damit die Rezeptor-Downregulierung verhindert, der Rezeptor jedoch nach Liganden-Stimulierung in intrazelluläre Vesikel internalisiert wird. Die Rate der initialen Internalisierung korrelierte nicht mit der Fähigkeit überexprimierter CBL-Mutanten, die Downregulierung des EGFR zu inhibieren (Thien, 2001). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass CBL eine Rolle in der Ubiquitinierung der Rezeptoren in den späten Schritten der Endozytose einnimmt und daher die initiale Internalisierung nicht beeinflusst. Dies ist konsistent mit unseren Ergebnissen, in denen CBL-70Z keinen Einfluss auf die Endozytose der FLT3-Rezeptoren hat. In nachfolgenden Experimenten muss analysiert werden, ob die Expression von CBL-70Z und v-CBL möglicherweise die Ubiquitinierung der FLT3-Rezeptoren in den FLT3-WT/CBL-70Z- und FLT3-WT/v-CBL-Zellen blockiert und so eine Degradierung von FLT3 verhindert.

Mittels artifizieller Mutanten von CBL wurde demonstriert, dass die Transformation durch CBL nicht durch eine Störung der Ubiquitinierungs-Fähigkeit zustande kommt. Die Deletion von Y368 in CBL weist bei Koexpression mit EGFR onkogenes Potential auf, jedoch kann CBL Δ 368 den EGFR noch ubiquitinieren (Joazeiro, 1999). Die Substitution von Y371 durch Phenylalanin ist nicht transformierend (Andoniou, 1994), obwohl die Mutante nicht in der Lage ist, die EGFR-Ubiquitinierung und Degradierung zu fördern (Levkowitz, 1999). Die Kristallstruktur der TKB-Domäne von CBL im Komplex mit dem E2-Enzym UbCH7 konnte zeigen, dass die Linker-Domäne in engem Kontakt mit sowohl der TKB-Domäne als auch dem rekrutierten UbCH7-Molekül steht (Zheng, 2000). Damit scheint die Linker-Domäne eine Schlüsselstruktur in der Konformation des Proteins zu

sein und ihre Zerstörung das entscheidende zur Transformation führende Ereignis (Thien, 2001).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass CBL-70Z und v-CBL als dominant-negative Moleküle agieren indem sie mit CBL-WT um Bindungsstellen an aktivierten RTKs konkurrieren. Damit wird die negativ-regulatorische Funktion des CBL-WT blockiert und dies führt zur Transformation. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass die v-CBL induzierte Transformation abhängig ist von einer hohen Expression des Proteins (Thien und Langdon, 1997b). Darüberhinaus ist v-CBLG306E, das nicht an aktivierte PTKs und RTKs binden kann, nicht transformierend (Bonita, 1997; Thien und Langdon, 1997a). Dagegen scheint die Transformation von CBL-70Z auch einen positiven Mechanismus durch Interaktion mit anderen CBL-Partnern zu beinhalten. Das Protein zeigt einen signifikant erhöhten Level an Tyrosin-Phosphorylierung unter Konditionen mit minimaler Wachstumsfaktor-Stimulierung und ist fähig, Fibroblasten mit Proteinmengen zu transformieren, bei denen v-CBL-Transformation noch nicht auftritt (Andoniou, 1994; Bowtell und Langdon, 1995). Die Transformation von NIH3T3-Fibroblasten mit CBL-70Z führte zu einer signifikanten Erhöhung der Tyrosin-phosphorylierten endogenen zellulären Substrate und einer konstitutiven Rekrutierung von nachgeordneten Signalproteinen zum hyperphosphorylierten PDGFR (Bonita, 1997).

Zusammenfassend haben wir einen neuen Mechanismus der Transformation beschrieben, der durch die RTK FLT3 vermittelt wird. Die Koexpression von CBL-70Z und v-CBL führte zu einem transformierenden Phänotyp in Ba/F3-Zellen, der durch eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität des FLT3-Rezeptors und die Hyperaktivierung nachgeordneter Signalwege entsteht. Der Mechanismus der Transformation der CBL-mutanten FLT3-exprimierenden Zellen ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch konnten wir zeigen, dass die Endozytose der aktivierten FLT3-Rezeptoren durch CBL-70Z nicht verändert wird. Es bleibt jedoch zu untersuchen, ob die FLT3-Degradation, die durch CBL-WT beschleunigt wird, durch CBL-70Z und v-CBL verzögert oder verhindert wird und es zu einer aberranten Aufrechterhaltung der RTK-Aktivität kommt.

5.2.2 CBL-Deletionsmutanten könnten an der Pathogenese der AML beteiligt sein

Alle bisher gefundenen CBL-Mutationen wurden durch eine Tumorinduktion in Mäusen generiert. Vor kurzem wurde über ein verkürztes CBL-Transkript in der humanen AML-Zelllinie MOLM-13 berichtet (Arnoczky, 2005).

Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass die AML-Zelllinien MOLM-13 und MOLM-14 ein um 132 Nukleotide deletiertes CBL-Transkript exprimieren, das durch eine Deletion von 14 Nukleotiden an der Exon 8 – Intron 8-Grenze der genomischen DNA entsteht. Es resultiert ein aberrantes RNA-Splicing, das zum Verlust von Exon 8 führt.

Dies stellt die erste gefundene, nicht artifiziell induzierte humane CBL-Deletionsmutante dar. Es ist anzunehmen, dass diese CBL-Deletionsmutante transformierend ist, da wie in CBL-70Z Exon 8 deletiert ist, das für Teile der Linker- und RING-Finger-Domäne kodiert. Allerdings muss dies in weiteren Experimenten belegt werden.

Damit wird zum ersten Mal beschrieben, dass CBL-Mutanten in Patienten mit AML vorkommen können. Das von uns durchgeführte Screening von AML-Patientenproben mit normalem Karyotyp auf Deletionsmutanten in der Region Exon 7 bis 9, die die Linker- und RING-Finger-Domäne umfasst, konnte keinen Patienten mit einer derartigen Mutation detektieren. Doch sind weitere Screenings anderer Subgruppen der AML oder anderer maligner hämatologischer Erkrankungen wie z.B. Lymphome notwendig, um die Signifikanz der CBL-Mutationen in Neoplasien zu evaluieren. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Alterationen in CBL zur Progression verschiedener maligner Erkrankungen beitragen können.

6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Klasse aktivierender Mutationen, Punktmutationen in der JM-Domäne von FLT3, FLT3-JM-PM, identifiziert und funktionell charakterisiert. Eine Therapie mit FLT3-PTK-Inhibitoren, die in klinischen Studien der Phase II mit FLT3-ITD- und FLT3-TKD-positiven Patienten erste Erfolge zeigten, könnte ebenso für diese neue Subgruppe von Patienten ein vielversprechender Therapieansatz sein. Die Aufnahme eines Screenings auf FLT3-JM-PM in die Routine der Leukämiediagnostik erscheint sinnvoll, auch um in zukünftigen Studien die prognostische Bedeutung dieser Mutationen zu evaluieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit haben wir einen ersten Hinweis für eine aberrante CBL-Funktion in akuten Leukämien erbracht. Um zu evaluieren, ob CBL eine Rolle in der Pathogenese der AML oder anderer maligner hämatopoetischer Erkrankungen spielt, ist geplant ein großes Patientenkollektiv auf Mutationen in der kritischen Linker- und RING-Finger-Domäne durch Sequenzierung zu analysieren. Darüberhinaus werden wir, um den Mechanismus der durch CBL-70Z und v-CBL induzierten Transformation in FLT3-exprimierenden Zellen zu klären, analysieren, ob die Überexpression von CBL-70Z und v-CBL einen Einfluss auf die FLT3-Dephosphorylierung und Degradierung hat. Weiterhin werden wir untersuchen, ob CBL, eventuell durch eine direkte Bindung an FLT3, die für die Ubiquitinierung verantwortliche E3-Ligase des FLT3-Rezeptors ist. In diesem Falle wäre anzunehmen, dass die Ubiquitinierungs-unfähigen Deletionsmutanten den Rezeptor nicht für die Degradierung markieren könnten und so eine aberrante Aufrechterhaltung der Rezeptoraktivität resultiert.

Die Identifikation und Charakterisierung dieser Mutationen hat unmittelbare therapeutische Konsequenzen. Da die Transformation durch CBL-Deletionsmutanten FLT3-abhängig ist, könnten Patienten mit CBL-Mutationen von einer Therapie mit PTK-Inhibitoren profitieren.

7 Zusammenfassung

In der akuten myeloischen Leukämie (AML) sind zwei Cluster aktivierender Mutationen im 'FMS-like tyrosine kinase-3' (*FLT3*)-Gen bekannt: *FLT3*-'internal tandem duplications' (*FLT3*-ITD) in der juxtamembranösen (JM)-Domäne in 20 - 25 % der Patienten und *FLT3*-Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne (*FLT3*-TKD) in 7 – 10 % der Patienten. In dieser Studie haben wir eine neue Klasse aktivierender Punktmutationen (PM) charakterisiert, die in einem 16-Aminosäuren-Abschnitt der JM-Domäne von *FLT3* (*FLT3*-JM-PM) lokalisiert sind. Die Expression von vier *FLT3*-JM-PM in IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen führte zu wachstumsfaktor-unabhängigem Wachstum, Hyperproliferation in Gegenwart von FL und Resistenz gegenüber apoptotischem Zelltod. *FLT3*-JM-PM-Rezeptoren waren autophosphoryliert und zeigten verglichen mit *FLT3*-WT-Rezeptoren eine höhere konstitutive Dimerisierungsrate. Als einen molekularen Mechanismus konnten wir die Aktivierung von STAT5 und eine erhöhte Expression von Bcl-x(L) in allen *FLT3*-JM-PM-exprimierenden Zellen im Vergleich zu *FLT3*-WT-Zellen zeigen. Der *FLT3*-Inhibitor PKC412 inhibierte das wachstumsfaktor-unabhängige Wachstum der *FLT3*-JM-PM-Zellen. Verglichen mit *FLT3*-ITD- und *FLT3*-TKD-Zellen, zeigten die *FLT3*-JM-PM-Zellen ein schwächeres Transformationspotential, verbunden mit geringerer Autophosphorylierung des Rezeptors und dessen nachgeordneten Ziel-Protein STAT5.

Die Kartierung der *FLT3*-JM-PM auf die Kristallstruktur des *FLT3*-Proteins zeigte, dass diese Punktmutationen wahrscheinlich die Stabilität der autoinhibitorischen JM-Domäne reduzieren. Dies liefert eine strukturelle Erklärung für das transformierende Potential dieser neuen Klasse aktivierender Mutationen von *FLT3*.

Die defekte Negativ-Regulation aktivierter Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) ist ein bekannter Mechanismus der Onkogenese. Die RTK *FLT3* wird in frühen myeloischen und lymphoiden Progenitorzellen exprimiert und ist an der Pathogenese der AML beteiligt. Das 'Casitas B-lineage lymphoma' (CBL)-Protein ist in der Evolution stark konserviert und übernimmt wichtige Funktionen in der Negativ-Regulation der Signalübertragung verschiedener Zelloberflächenrezeptoren. Zwei CBL-Deletionsmutanten, die *in vitro* Fibroblasten transformieren, wurden aus murinen Retroviren isoliert, die Vorläufer-B-Zelllymphome induzieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CBL nach FL-Stimulierung von *FLT3*-WT-exprimierenden Ba/F3-Zellen phosphoryliert wird und damit in die *FLT3*-nachgeordnete Signaltransduktion involviert ist. Die Koexpression der CBL-Deletionsmutanten CBL-70Z

oder v-CBL mit FLT3 führt zur Transformation von Ba/F3-Zellen. Das transformierende Potential wird durch den FLT3-Rezeptor vermittelt, da die selektiven FLT3-PTK-Inhibitoren SU5614 und PKC412 die Proliferation der FLT3-WT/CBL-mutanten-Zellen vollständig aufheben. Die Aktivierung des PI3K/mTOR/AKT-Signalweges, jedoch nicht der SRC-Kinasen und MAPK, trägt wesentlich zum hyperproliferierenden Phänotyp der FLT3-WT/CBL-mutanten Zellen nach Ligandenstimulierung bei. Die Koexpression von CBL-70Z oder v-CBL mit FLT3 führt zur konstitutiven Aktivierung der FLT3-Rezeptoren sowie STAT5 und AKT. Nach FL-Stimulierung konnten wir eine Hyperaktivierung von STAT5 und AKT in FLT3-WT/CBL-70Z und FLT3-WT/v-CBL-Zellen beobachten. An der Interaktion von CBL und FLT3 sind die TKB-Domäne des CBL-Proteins und die JM-Tyrosine Y589 und Y599 des FLT3-Rezeptors beteiligt. Die Internalisierung der FLT3-Rezeptoren wird durch die Koexpression von CBL-70Z nicht verändert. Allerdings ist CBL an der Ubiquitinierung und Degradierung von Rezeptoren beteiligt und wir konnten zeigen, dass CBL-WT die Dephosphorylierung und Degradierung des FLT3-Rezeptors fördert. Es wurde vorgeschlagen, dass die CBL-Deletionsmutanten in dominant-negativer Weise agieren und die negativ-regulatorische Funktion von CBL-WT blockieren.

Wir haben eine CBL-Deletionsmutante in den AML Zelllinie MOLM-13 und MOLM-14 identifiziert. Dieser CBL-Mutante fehlt Exon 8, das für Teile der Linker- und RING-Finger-Domäne kodiert, und erinnert an CBL-70Z. Die Entdeckung einer möglicherweise transformierenden CBL-Mutante in AML-Zellen unterstützt die Hypothese, dass CBL zum malignen Phänotyp der AML beiträgt.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass die strukturelle oder funktionelle Inaktivierung negativ-regulatorischer Mechanismen das transformierende Potential von FLT3 aktivieren kann: 1. Der Verlust der Autoinhibition durch Punktmutationen, die die geordnete Konformation der autoinhibitorischen JM-Domäne stören. 2. Die funktionelle Inaktivierung eines negativ-regulatorischen Proteins durch 'loss-of-function'-Mutationen. Diese Daten unterstreichen die zentrale Rolle von FLT3 in der Leukämogenese und als ein Zielprotein für therapeutische Ansätze.

8 Abstract

In acute myeloid leukemia (AML), two clusters of activating mutations are known in the FMS-like tyrosine kinase-3 (*FLT3*) gene: FLT3-internal tandem duplications (FLT3-ITD) in the juxtamembrane (JM) domain in 20-25% and FLT3-point mutations in the tyrosine-kinase domain (FLT3-TKD) in 7-10% of patients, respectively. Here, we have characterized a new class of activating point mutations (PM) that cluster in the JM-S and JM-Z region of the juxtamembrane (JM) domain of FLT3 (FLT3-JM-PM). Expression of four FLT3-JM-PM in IL-3 dependent Ba/F3 cells led to factor-independent growth, hyperresponsiveness to FLT3-ligand and resistance to apoptotic cell death. FLT3-JM-PM receptors were autophosphorylated and showed a higher constitutive dimerization rate compared to the FLT3-WT receptor. As a molecular mechanism, we could show activation of STAT5 and upregulation of Bcl-x(L) by all FLT3-JM-PM. The FLT3-inhibitor PKC412 abrogated the factor-independent growth of FLT3-JM-PM. Compared to FLT3-ITD and FLT3-TKD mutants, the FLT3-JM-PM showed a weaker transforming potential related to lower autophosphorylation of the receptor and its downstream target STAT5.

Mapping of the FLT3-JM-PM on the crystal structure of FLT3 showed that these mutations probably reduce the stability of the autoinhibitory JM domain, and provides a structural basis for the transforming capacity of this new class of gain-of-function mutations of FLT3.

The defective downregulation of activated receptor tyrosine kinases (RTKs) is a known mechanism of oncogenesis. The RTK FLT3 is expressed in early myeloid and lymphoid progenitor cells and plays an important role in the pathogenesis of AML. The Casitas B-lineage lymphoma (CBL) protein is highly conserved in the evolution and functions as a negativ-regulator of cell surface receptor signaling. CBL deletion mutants, that transform fibroblasts *in vitro*, have been isolated from murine retroviruses inducing pre-B and pro-B lymphomas.

We could show that CBL is phosphorylated after FLT3 ligand (FL)-stimulation in FLT3-expressing Ba/F3 cells and is therefore involved in FLT3 downstream signaling. Coexpression of CBL deletion mutants CBL-70Z and v-CBL with FLT3 conferred a transforming potential to Ba/F3 cells. The tranforming potential is mediated by FLT3, as the selective FLT3 inhibitors SU5614 and PKC412 are able to abrogate the proliferation of FLT3-WT/CBL-mutant-expressing cells. Activation of the PI3K/mTOR/AKT-signaling pathway, but not activation of SRC and MAPK is essential for the hyperproliferative phenotype of FLT3-WT/CBL-mutant cells. Coexpression of CBL-70Z and v-CBL with FLT3

leads to constitutive activation of FLT3 receptors, STAT5 and AKT. After stimulation with FL, STAT5 and AKT were hyperactivated in FLT3-WT/CBL-70Z- and FLT3-WT/v-CBL-cells. The interaction of CBL and FLT3 is mediated by the TKB domain of CBL and the JM tyrosines Y589 and Y599 of FLT3. Internalization of the FLT3 receptors is not altered by coexpression of CBL-70Z. However, CBL contributes to the ubiquitination and degradation of different receptors and we could show that CBL-WT promotes the dephosphorylation and degradation of FLT3. The CBL deletion mutants are proposed to act in a dominant negative manner and prevent CBL-WT from exerting its negative-regulatory function.

We found a CBL deletion mutant lacking exon 8 in the AML cell lines MOLM-13 and MOLM-14. This mutant lacks parts of the linker and RING finger domain of CBL and is reminiscent of CBL-70Z. The finding of a potentially transforming CBL mutant in AML cells supports the hypothesis that CBL contributes to the malignant phenotype in AML.

In summary, we have shown that structural or functional inactivation of negative-regulatory mechanisms can activate the transforming potential of FLT3: 1. Loss of autoinhibition by point mutations that disturb the proper conformation of the autoinhibitory JM domain. 2. Functional inactivation of a negative-regulatory protein by loss-of-function mutations. These data underline the central role of FLT3 in leukemogenesis and as a target for therapeutic strategies.

9 Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Wilson, G. A., Care, R. S., Peake, I. R., Reilly, J. T. 2001: Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol** 113: 983-8
- Ahn, S., Kim, J., Lucaveche, C. L., Reedy, M. C., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., Daaka, Y. 2002: Src-dependent tyrosine phosphorylation regulates dynamin self-assembly and ligand-induced endocytosis of the epidermal growth factor receptor. **J Biol Chem** 277: 26642-51
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., Saltiel, A. R. 1995: PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. **J Biol Chem** 270: 27489-94
- Andoniou, C. E., Thien, C. B., Langdon, W. Y. 1994: Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene. **Embo J** 13: 4515-23
- Appelbaum, F. R., Rowe, J. M., Radich, J., Dick, J. E. 2001: Acute myeloid leukemia. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)** 62-86
- Arnoczky, K. J., Marburger, T. B., Vukosavljevic, T., Caligiuri, M. A., Whitman, S. P. 2005: Aberrant Pre-mRNA Processing Due to Novel Splicing Mutations in the CBL Proto-Oncogene in Acute Myeloid Leukemia. **ASH Annual Meeting Abstracts** 106: 4400-
- Bagrintseva, K., Schwab, R., Kohl, T. M., Schnittger, S., Eichenlaub, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2004: Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitors in FLT3-ITD-transformed hematopoietic cells. **Blood** 103: 2266-75
- Baker, A., Cachia, P., Ridge, S., McGlynn, H., Clarke, R., Whittaker, J., Jacobs, A., Padua, R. A. 1995: FMS mutations in patients following cytotoxic therapy for lymphoma. **Leuk Res** 19: 309-18
- Barber, D. L., Mason, J. M., Fukazawa, T., Reedquist, K. A., Druker, B. J., Band, H., D'Andrea, A. D. 1997: Erythropoietin and interleukin-3 activate tyrosine phosphorylation of CBL and association with CRK adaptor proteins. **Blood** 89: 3166-74
- Bartkiewicz, M., Houghton, A., Baron, R. 1999: Leucine zipper-mediated homodimerization of the adaptor protein c-Cbl. A role in c-Cbl's tyrosine phosphorylation and its association with epidermal growth factor receptor. **J Biol Chem** 274: 30887-95
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., Sultan, C. 1976: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol** 33: 451-8
- Birnboim, H. C. 1983: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. **Methods Enzymol** 100: 243-55
- Bisson, S. A., Ujack, E. E., Robbins, S. M. 2002: Isolation and characterization of a novel, transforming allele of the c-Cbl proto-oncogene from a murine macrophage cell line. **Oncogene** 21: 3677-87
- Blake, R. A., Broome, M. A., Liu, X., Wu, J., Gishizky, M., Sun, L., Courtneidge, S. A. 2000: SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. **Mol Cell Biol** 20: 9018-27

- Blake, T. J., Langdon, W. Y. 1992: A rearrangement of the c-cbl proto-oncogene in HUT78 T-lymphoma cells results in a truncated protein. **Oncogene** 7: 757-62
- Blake, T. J., Shapiro, M., Morse, H. C., 3rd, Langdon, W. Y. 1991: The sequences of the human and mouse c-cbl proto-oncogenes show v-cbl was generated by a large truncation encompassing a proline-rich domain and a leucine zipper-like motif. **Oncogene** 6: 653-7
- Blume-Jensen, P., Hunter, T. 2001: Oncogenic kinase signalling. **Nature** 411: 355-65
- Bohmer, F. D., Karagyozov, L., Uecker, A., Serve, H., Botzki, A., Mahboobi, S., Dove, S. 2003: A single amino acid exchange inverts susceptibility of related receptor tyrosine kinases for the ATP site inhibitor STI-571. **J Biol Chem** 278: 5148-55
- Bonita, D. P., Miyake, S., Lupher, M. L., Jr., Langdon, W. Y., Band, H. 1997: Phosphotyrosine binding domain-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor receptor alpha signaling cascade by transforming mutants of Cbl: implications for Cbl's function and oncogenicity. **Mol Cell Biol** 17: 4597-610
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R. 2000: STATs in oncogenesis. **Oncogene** 19: 2474-88
- Bowtell, D. D., Langdon, W. Y. 1995: The protein product of the c-cbl oncogene rapidly complexes with the EGF receptor and is tyrosine phosphorylated following EGF stimulation. **Oncogene** 11: 1561-7
- Bradford, M. M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-54
- Brasel, K., Escobar, S., Anderberg, R., de Vries, P., Gruss, H. J., Lyman, S. D. 1995: Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. **Leukemia** 9: 1212-8
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B. J., Lydon, N. B. 1996: Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. **Cancer Res** 56: 100-4
- Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., Russo, A. 2003: STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. **J Cell Physiol** 197: 157-68
- Carow, C. E., Levenstein, M., Kaufmann, S. H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Borowitz, M. J., Civin, C. I., Small, D. 1996: Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/FIk2) in human leukemias. **Blood** 87: 1089-96
- Carpenter, G., Cohen, S. 1976: ¹²⁵I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. **J Cell Biol** 71: 159-71
- Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N. B., Gilliland, D. G., Druker, B. J. 1997: CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. **Blood** 90: 4947-52
- Chan, P. M., Ilangumaran, S., La Rose, J., Chakrabarty, A., Rottapel, R. 2003: Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. **Mol Cell Biol** 23: 3067-78
- Chernock, R. D., Cherla, R. P., Ganju, R. K. 2001: SHP2 and cbl participate in alpha-chemokine receptor CXCR4-mediated signaling pathways. **Blood** 97: 608-15

- Corless, C. L., Fletcher, J. A., Heinrich, M. C. 2004: Biology of gastrointestinal stromal tumors. **J Clin Oncol** 22: 3813-25
- Corless, C. L., Schroeder, A., Griffith, D., Town, A., McGreevey, L., Harrell, P., Shiraga, S., Bainbridge, T., Morich, J., Heinrich, M. C. 2005: PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. **J Clin Oncol** 23: 5357-64
- Cory, G. O., Lovering, R. C., Hinshelwood, S., MacCarthy-Morrogh, L., Levinsky, R. J., Kinnon, C. 1995: The protein product of the c-cbl protooncogene is phosphorylated after B cell receptor stimulation and binds the SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase. **J Exp Med** 182: 611-5
- Dash, A., Gilliland, D. G. 2001: Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol** 14: 49-64
- Davey, H. W., McLachlan, M. J., Wilkins, R. J., Hilton, D. J., Adams, T. E. 1999: STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. **Mol Cell Endocrinol** 158: 111-6
- de Melker, A. A., van der Horst, G., Borst, J. 2004: Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the epidermal growth factor receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment. **J Biol Chem** 279: 55465-73
- de Melker, A. A., van der Horst, G., Calafat, J., Jansen, H., Borst, J. 2001: c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. **J Cell Sci** 114: 2167-78
- Dikic, I., Szymkiewicz, I., Soubeyran, P. 2003: Cbl signaling networks in the regulation of cell function. **Cell Mol Life Sci** 60: 1805-27
- Donovan, J. A., Wange, R. L., Langdon, W. Y., Samelson, L. E. 1994: The protein product of the c-cbl protooncogene is the 120-kDa tyrosine-phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. **J Biol Chem** 269: 22921-4
- Drexler, H. G. 1996: Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. **Leukemia** 10: 588-99
- Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., Talpaz, M. 2001a: Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. **N Engl J Med** 344: 1038-42
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C. L. 2001b: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med** 344: 1031-7
- Duan, L., Miura, Y., Dimri, M., Majumder, B., Dodge, I. L., Reddi, A. L., Ghosh, A., Fernandes, N., Zhou, P., Mullane-Robinson, K., Rao, N., Donoghue, S., Rogers, R. A., Bowtell, D., Naramura, M., Gu, H., Band, V., Band, H. 2003: Cbl-mediated ubiquitinylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. **J Biol Chem** 278: 28950-60
- Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., Collins, V. P. 1992: Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89: 4309-13

- Elly, C., Witte, S., Zhang, Z., Rosnet, O., Lipkowitz, S., Altman, A., Liu, Y. C. 1999: Tyrosine phosphorylation and complex formation of Cbl-b upon T cell receptor stimulation. **Oncogene** 18: 1147-56
- Fang, D., Wang, H. Y., Fang, N., Altman, Y., Elly, C., Liu, Y. C. 2001: Cbl-b, a RING-type E3 ubiquitin ligase, targets phosphatidylinositol 3-kinase for ubiquitination in T cells. **J Biol Chem** 276: 4872-8
- Feshchenko, E. A., Langdon, W. Y., Tsygankov, A. Y. 1998: Fyn, Yes, and Syk phosphorylation sites in c-Cbl map to the same tyrosine residues that become phosphorylated in activated T cells. **J Biol Chem** 273: 8323-31
- Frost, M. J., Ferrao, P. T., Hughes, T. P., Ashman, L. K. 2002: Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. **Mol Cancer Ther** 1: 1115-24
- Fu, J. F., Hsu, J. J., Tang, T. C., Shih, L. Y. 2003: Identification of CBL, a proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia. **Genes Chromosomes Cancer** 37: 214-9
- Galisteo, M. L., Dikic, I., Batzer, A. G., Langdon, W. Y., Schlessinger, J. 1995: Tyrosine phosphorylation of the c-cbl proto-oncogene protein product and association with epidermal growth factor (EGF) receptor upon EGF stimulation. **J Biol Chem** 270: 20242-5
- Gilliland, D. G., Griffin, J. D. 2002: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood** 100: 1532-42
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. 1977: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol** 36: 59-74
- Graham, F. L., van der Eb, A. J. 1973: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology** 52: 456-67
- Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., Saxena, K. 2004: The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. **Mol Cell** 13: 169-78
- Grisolano, J. L., Wesselschmidt, R. L., Pelicci, P. G., Ley, T. J. 1997: Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. **Blood** 89: 376-87
- Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C., Duyster, J. 2005: FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. **Blood** 105: 4792-9
- Grundler, R., Thiede, C., Miething, C., Steudel, C., Peschel, C., Duyster, J. 2003: Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3 receptor. **Blood** 102: 646-51
- Haglund, K., Shimokawa, N., Szymkiewicz, I., Dikic, I. 2002: Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99: 12191-6
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., Hunter, T. 1988: The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science** 241: 42-52

- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., Bloomfield, C. D. 1999: The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. **Ann Oncol** 10: 1419-32
- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., Naoe, T. 2000: Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. **Oncogene** 19: 624-31
- He, L. Z., Tribioli, C., Rivi, R., Peruzzi, D., Pelicci, P. G., Soares, V., Cattoretti, G., Pandolfi, P. P. 1997: Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94: 5302-7
- Heiss, E., Masson, K., Sundberg, C., Pedersen, M., Sun, J., Bengtsson, S., Ronnstrand, L. 2006: Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of Src family kinases and the protein tyrosine phosphatase SHP2. **Blood**
- Hidalgo, M., Rowinsky, E. K. 2000: The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. **Oncogene** 19: 6680-6
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., Kitamura, Y. 1998: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. **Science** 279: 577-80
- Hunter, S., Burton, E. A., Wu, S. C., Anderson, S. M. 1999: Fyn associates with Cbl and phosphorylates tyrosine 731 in Cbl, a binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem** 274: 2097-106
- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Silvennoinen, O. 1995: Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. **Annu Rev Immunol** 13: 369-98
- Irusta, P. M., DiMaio, D. 1998: A single amino acid substitution in a WW-like domain of diverse members of the PDGF receptor subfamily of tyrosine kinases causes constitutive receptor activation. **Embo J** 17: 6912-23
- Irusta, P. M., Luo, Y., Bakht, O., Lai, C. C., Smith, S. O., DiMaio, D. 2002: Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor. **J Biol Chem** 277: 38627-34
- Jiang, X., Sorkin, A. 2003: Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation. **Traffic** 4: 529-43
- Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T., Liu, Y. C. 1999: The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. **Science** 286: 309-12
- Jongeward, G. D., Clandinin, T. R., Sternberg, P. W. 1995: sli-1, a negative regulator of let-23-mediated signaling in *C. elegans*. **Genetics** 139: 1553-66
- Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Butterfield, J. H., Ashman, L. K., Ikeda, H., Kitayama, H., Kanayama, Y., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y. 1994: Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line. **Leukemia** 8 Suppl 1: S18-22

- Kassenbrock, C. K., Hunter, S., Garl, P., Johnson, G. L., Anderson, S. M. 2002: Inhibition of Src family kinases blocks epidermal growth factor (EGF)-induced activation of Akt, phosphorylation of c-Cbl, and ubiquitination of the EGF receptor. **J Biol Chem** 277: 24967-75
- Keane, M. M., Ettenberg, S. A., Nau, M. M., Banerjee, P., Cuello, M., Penninger, J., Lipkowitz, S. 1999: cbl-3: a new mammalian cbl family protein. **Oncogene** 18: 3365-75
- Kelly, L. M., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., Amaral, S. M., Curley, D. P., Ley, T. J., 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: 8283-8
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., 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: 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., Giese, N. A. 2002c: CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). **Cancer Cell** 1: 421-32
- Kim, M., Tezuka, T., Tanaka, K., Yamamoto, T. 2004: Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation. **Oncogene** 23: 1645-55
- King, A. C., Hernaez-Davis, L., Cuatrecasas, P. 1980: Lysomotropic amines cause intracellular accumulation of receptors for epidermal growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 77: 3283-7
- Kirsch, K. H., Georgescu, M. M., Shishido, T., Langdon, W. Y., Birge, R. B., Hanafusa, H. 2001: The adapter type protein CMS/CD2AP binds to the proto-oncogenic protein c-Cbl through a tyrosine phosphorylation-regulated Src homology 3 domain interaction. **J Biol Chem** 276: 4957-63
- Kitayama, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Oritani, K., Ikeda, H., Sugahara, H., Mitsui, H., Kanayama, Y., Kitamura, Y., et al. 1995: Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. **Blood** 85: 790-8
- 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., Ueda, R. 1999: Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood** 93: 3074-80
- Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H., Naoe, T. 1998: Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. **Leukemia** 12: 1333-7
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Sowadski, J. M. 1991: Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. **Science** 253: 407-14
- 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., 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: 1752-9

- Kyhse-Andersen, J. 1984: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. **J Biochem Biophys Methods** 10: 203-9
- Laemmli, U. K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-5
- Langdon, W. Y., Hartley, J. W., Holmes, K. L., Fredrickson, T. N., Morse, H. C., 3rd 1984: Identification of a transforming virus from a lymphoma of a mouse infected with a wild mouse retrovirus. **Curr Top Microbiol Immunol** 113: 241-9
- Langdon, W. Y., Hartley, J. W., Klinken, S. P., Ruscetti, S. K., Morse, H. C., 3rd 1989a: v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas. **Proc Natl Acad Sci U S A** 86: 1168-72
- Langdon, W. Y., Hyland, C. D., Grumont, R. J., Morse, H. C., 3rd 1989b: The c-cbl proto-oncogene is preferentially expressed in thymus and testis tissue and encodes a nuclear protein. **J Virol** 63: 5420-4
- Lasota, J., Jasinski, M., Sarlomo-Rikala, M., Miettinen, M. 1999: Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. **Am J Pathol** 154: 53-60
- Lavagna-Sevenier, C., Marchetto, S., Birnbaum, D., Rosnet, O. 1998: FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates. **Leukemia** 12: 301-10
- Lee, B. H., Williams, I. R., Anastasiadou, E., Boulton, C. L., Joseph, S. W., Amaral, S. M., Curley, D. P., Duclos, N., Huntly, B. J., Fabbro, D., Griffin, J. D., Gilliland, D. G. 2005: FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. **Oncogene** 24: 7882-92
- Lee, D. H., Goldberg, A. L. 1996: Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 271: 27280-4
- Lee, P. S., Wang, Y., Dominguez, M. G., Yeung, Y. G., Murphy, M. A., Bowtell, D. D., Stanley, E. R. 1999: The Cbl protooncogene stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. **Embo J** 18: 3616-28
- Levis, M., Allebach, J., Tse, K. F., Zheng, R., Baldwin, B. R., Smith, B. D., Jones-Bolin, S., Ruggeri, B., Dionne, C., Small, D. 2002: A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. **Blood** 99: 3885-91
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., Yarden, Y. 1999: Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. **Mol Cell** 4: 1029-40
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., Yarden, Y. 1998: c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. **Genes Dev** 12: 3663-74
- Longley, B. J., Jr., Metcalfe, D. D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S. Z., Heitjan, D., Ma, Y. 1999: Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96: 1609-14

- Longley, B. J., Reguera, M. J., Ma, Y. 2001: Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. **Leuk Res** 25: 571-6
- Longva, K. E., Blystad, F. D., Stang, E., Larsen, A. M., Johannessen, L. E., Madhus, I. H. 2002: Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. **J Cell Biol** 156: 843-54
- Lord, J. D., McIntosh, B. C., Greenberg, P. D., Nelson, B. H. 2000: The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. **J Immunol** 164: 2533-41
- Lovering, R., Hanson, I. M., Borden, K. L., Martin, S., O'Reilly, N. J., Evan, G. I., Rahman, D., Pappin, D. J., Trowsdale, J., Freemont, P. S. 1993: Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90: 2112-6
- Lupher, M. L., Jr., Andoniou, C. E., Bonita, D., Miyake, S., Band, H. 1998: The c-Cbl oncoprotein. **Int J Biochem Cell Biol** 30: 439-44
- Ma, Y., Cunningham, M. E., Wang, X., Ghosh, I., Regan, L., Longley, B. J. 1999: Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. **J Biol Chem** 274: 13399-402
- Macias, M. J., Wiesner, S., Sudol, M. 2002: WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. **FEBS Lett** 513: 30-7
- Mancini, A., Koch, A., Wilms, R., Tamura, T. 2002: c-Cbl associates directly with the C-terminal tail of the receptor for the macrophage colony-stimulating factor, c-Fms, and down-modulates this receptor but not the viral oncogene v-Fms. **J Biol Chem** 277: 14635-40
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., Green, D. R. 1995: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med** 182: 1545-56
- Martino, A., Holmes, J. H. t., Lord, J. D., Moon, J. J., Nelson, B. H. 2001: Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. **J Immunol** 166: 1723-9
- Masson, K., Heiss, E., Band, H., Ronnstrand, L. 2006: Direct binding of Cbl to Y568 and Y936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. **Biochem J**
- Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyajima, A., Yoshimura, A. 1997: CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. **Blood** 89: 3148-54
- Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R. G., Kanakura, Y. 1999: Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. **Embo J** 18: 1367-77
- Matsuo, Y., MacLeod, R. A., Uphoff, C. C., Drexler, H. G., Nishizaki, C., Katayama, Y., Kimura, G., Fujii, N., Omoto, E., Harada, M., Orita, K. 1997: Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). **Leukemia** 11: 1469-77

- Matthews, W., Jordan, C. T., Gavin, M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lemischka, I. R. 1991: A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88: 9026-30
- Meierhoff, G., Dehmel, U., Gruss, H. J., Rosnet, O., Birnbaum, D., Quentmeier, H., Dirks, W., Drexler, H. G. 1995: Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. **Leukemia** 9: 1368-72
- Meisner, H., Daga, A., Buxton, J., Fernandez, B., Chawla, A., Banerjee, U., Czech, M. P. 1997: Interactions of Drosophila Cbl with epidermal growth factor receptors and role of Cbl in R7 photoreceptor cell development. **Mol Cell Biol** 17: 2217-25
- Meng, W., Sawasdikosol, S., Burakoff, S. J., Eck, M. J. 1999: Structure of the amino-terminal domain of Cbl complexed to its binding site on ZAP-70 kinase. **Nature** 398: 84-90
- Miura, A., Sajan, M. P., Standaert, M. L., Bandyopadhyay, G., Franklin, D. M., Lea-Currie, R., Farese, R. V. 2003: Cbl PYXXM motifs activate the P85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, Crk, atypical protein kinase C, and glucose transport during thiazolidinedione action in 3T3/L1 and human adipocytes. **Biochemistry** 42: 14335-41
- Miyake, S., Lupher, M. L., Jr., Druker, B., Band, H. 1998: The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95: 7927-32
- 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., Serve, H. 2000: Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. **Blood** 96: 3907-14
- Mol, C. D., Lim, K. B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E. Y., Sang, B. C., Nowakowski, J., Kassel, D. B., Cronin, C. N., McRee, D. E. 2003: Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. **J Biol Chem** 278: 31461-4
- Mrozek, K., Heinonen, K., de la Chapelle, A., Bloomfield, C. D. 1997: Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Semin Oncol** 24: 17-31
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., 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
- Nakahara, M., Isozaki, K., Hirota, S., Miyagawa, J., Hase-Sawada, N., Taniguchi, M., Nishida, T., Kanayama, S., Kitamura, Y., Shinomura, Y., Matsuzawa, Y. 1998: A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. **Gastroenterology** 115: 1090-5
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T., Misawa, S. 1996: Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. **Leukemia** 10: 1911-8
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., Riccardi, C. 1991: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods** 139: 271-9
- Nishida, T., Hirota, S., Taniguchi, M., Hashimoto, K., Isozaki, K., Nakamura, H., Kanakura, Y., Tanaka, T., Takabayashi, A., Matsuda, H., Kitamura, Y. 1998: Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. **Nat Genet** 19: 323-4

- Odai, H., Sasaki, K., Iwamatsu, A., Hanazono, Y., Tanaka, T., Mitani, K., Yazaki, Y., Hirai, H. 1995: The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domain of Grb2/Ash in human hematopoietic cells. **J Biol Chem** 270: 10800-5
- O'Farrell, A. M., Abrams, T. J., Yuen, H. A., Ngai, T. J., Louie, S. G., Yee, K. W., Wong, L. M., Hong, W., Lee, L. B., Town, A., Smolich, B. D., Manning, W. C., Murray, L. J., Heinrich, M. C., Cherrington, J. M. 2003: SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. **Blood** 101: 3597-605
- Ojaniemi, M., Langdon, W. Y., Vuori, K. 1998: Oncogenic forms of Cbl abrogate the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation. **Oncogene** 16: 3159-67
- Oved, S., Yarden, Y. 2002: Signal transduction: molecular ticket to enter cells. **Nature** 416: 133-6
- Paige, C. J., Kincade, P. W., Ralph, P. 1978: Murine B cell leukemia line with inducible surface immunoglobulin expression. **J Immunol** 121: 641-7
- Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M., McKearn, J. P. 1984: Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. **Nature** 309: 126-31
- Peschard, P., Fournier, T. M., Lamorte, L., Naujokas, M. A., Band, H., Langdon, W. Y., Park, M. 2001: Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. **Mol Cell** 8: 995-1004
- Peschard, P., Park, M. 2003: Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. **Cancer Cell** 3: 519-23
- Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., Giordano, S. 2002: The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. **Nature** 416: 187-90
- Polo, S., Pece, S., Di Fiore, P. P. 2004: Endocytosis and cancer. **Curr Opin Cell Biol** 16: 156-61
- Reilly, J. T. 2003: Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. **Blood Rev** 17: 241-8
- Reindl, C., Bagrintseva, K., Vempati, S., Schnittger, S., Ellwart, J. W., Wenig, K., Hopfner, K. P., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2006: Point mutations found in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. **Blood**
- Reindl, C., Spiekermann, K. 2006: From kinases to cancer: leakiness, loss of autoinhibition and leukemia. **Cell Cycle** 5: 599-602
- Ren, S. Y., Bolton, E., Mohi, M. G., Morrione, A., Neel, B. G., Skorski, T. 2005: Phosphatidylinositol 3-kinase p85{alpha} subunit-dependent interaction with BCR/ABL-related fusion tyrosine kinases: molecular mechanisms and biological consequences. **Mol Cell Biol** 25: 8001-8
- Ridge, S. A., Worwood, M., Oscier, D., Jacobs, A., Padua, R. A. 1990: FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87: 1377-80
- Robinson, L. J., Xue, J., Corey, S. J. 2005: Src family tyrosine kinases are activated by Flt3 and are involved in the proliferative effects of leukemia-associated Flt3 mutations. **Exp Hematol** 33: 469-79

- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A. L. 1994: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell** 78: 761-71
- Rohde, C. M., Schrum, J., Lee, A. W. 2004: A juxtamembrane tyrosine in the colony stimulating factor-1 receptor regulates ligand-induced Src association, receptor kinase function, and down-regulation. **J Biol Chem** 279: 43448-61
- Rosenkranz, S., Ikuno, Y., Leong, F. L., Klinghoffer, R. A., Miyake, S., Band, H., Kazlauskas, A. 2000: Src family kinases negatively regulate platelet-derived growth factor alpha receptor-dependent signaling and disease progression. **J Biol Chem** 275: 9620-7
- Rosnet, O., Buhning, H. J., Marchetto, S., Rappold, I., Lavagna, C., Sainty, D., Arnoulet, C., Chabannon, C., Kanz, L., Hannum, C., Birnbaum, D. 1996: Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. **Leukemia** 10: 238-48
- Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O., Birnbaum, D. 1991: Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. **Oncogene** 6: 1641-50
- Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tonnelle, C., Toiron, Y., Birg, F., Birnbaum, D. 1993: Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. **Blood** 82: 1110-9
- Rusten, L. S., Lyman, S. D., Veiby, O. P., Jacobsen, S. E. 1996: The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. **Blood** 87: 1317-25
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989: Molecular Cloning: A laboratory manual.
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M. A., Pisick, E., Xu, G., Li, J. L., Prasad, K. V., Griffin, J. D. 1996: The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. **Oncogene** 12: 839-46
- Savage, D. G., Antman, K. H. 2002: Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. **N Engl J Med** 346: 683-93
- Savage, P. D., Shapiro, M., Langdon, W. Y., Geurts van Kessel, A. D., Seunanz, H. N., Akao, Y., Croce, C., Morse, H. C., 3rd, Kersey, J. H. 1991: Relationship of the human protooncogene CBL2 on 11q23 to the t(4;11), t(11;22), and t(11;14) breakpoints. **Cytogenet Cell Genet** 56: 112-5
- Sawasdikosol, S., Chang, J. H., Pratt, J. C., Wolf, G., Shoelson, S. E., Burakoff, S. J. 1996: Tyrosine-phosphorylated Cbl binds to Crk after T cell activation. **J Immunol** 157: 110-6
- Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H., Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R. A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette, R. L., Druker, B. J. 2002: Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. **Blood** 99: 3530-9
- Schaich, M., Illmer, T., Seitz, G., Mohr, B., Schakel, U., Beck, J. F., Ehninger, G. 2001: The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. **Haematologica** 86: 470-7

- Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T. M., Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M., Buske, C. 2005: The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. **J Clin Invest** 115: 2159-68
- Schmidt, M. H., Dikic, I. 2005: The Cbl interactome and its functions. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6: 907-19
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Loffler, H., Sauerland, C. M., Serve, H., Buchner, T., Haferlach, T., Hiddemann, W. 2002: Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. **Blood** 100: 59-66
- Schoch, C., Haferlach, T. 2002: Cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Curr Oncol Rep** 4: 390-7
- Schoch, C., Kern, W., Krawitz, P., Dugas, M., Schnittger, S., Haferlach, T., Hiddemann, W. 2001: Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. **Blood** 98: 3500
- Shewchuk, L. M., Hassell, A. M., Ellis, B., Holmes, W. D., Davis, R., Horne, E. L., Kadwell, S. H., McKee, D. D., Moore, J. T. 2000: Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail. **Structure** 8: 1105-13
- Singer, S., Rubin, B. P., Lux, M. L., Chen, C. J., Demetri, G. D., Fletcher, C. D., Fletcher, J. A. 2002: Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. **J Clin Oncol** 20: 3898-905
- Smith, B. D., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K. M., Dausers, T., Allebach, J., 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: 3669-76
- Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C., Lodish, H. F. 1999: Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. **Cell** 98: 181-91
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., Dikic, I. 2002: Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. **Nature** 416: 183-7
- Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schoch, C., Haferlach, T., Hiddemann, W., Schnittger, S. 2002: A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. **Blood** 100: 3423-5
- Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K., Hiddemann, W. 2003a: Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. **Clin Cancer Res** 9: 2140-50
- Spiekermann, K., Dirschinger, R. J., Schwab, R., Bagrintseva, K., Faber, F., Buske, C., Schnittger, S., Kelly, L. M., Gilliland, D. G., 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: 1494-504
- Standaert, M. L., Sajan, M. P., Miura, A., Bandyopadhyay, G., Farese, R. V. 2004: Requirements for pYXXM motifs in Cbl for binding to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and Crk,

- and activation of atypical protein kinase C and glucose transport during insulin action in 3T3/L1 adipocytes. **Biochemistry** 43: 15494-502
- Stang, E., Johannessen, L. E., Knardal, S. L., Madshus, I. H. 2000: Polyubiquitination of the epidermal growth factor receptor occurs at the plasma membrane upon ligand-induced activation. **J Biol Chem** 275: 13940-7
- Staros, J. V. 1982: N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers. **Biochemistry** 21: 3950-5
- Stirewalt, D. L., Meshinchi, S., Kussick, S. J., Sheets, K. M., Pogossova-Agadjanyan, E., Willman, C. L., Radich, J. P. 2004: Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol** 124: 481-4
- Stirewalt, D. L., Radich, J. P. 2003: The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. **Nat Rev Cancer** 3: 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., 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: 54-60
- Szymkiewicz, I., Kowanetz, K., Soubeyran, P., Dinarina, A., Lipkowitz, S., Dikic, I. 2002: CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases. **J Biol Chem** 277: 39666-72
- Take, H., Watanabe, S., Takeda, K., Yu, Z. X., Iwata, N., Kajigaya, S. 2000: Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. **Biochem Biophys Res Commun** 268: 321-8
- Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., Arai, N. 1988: SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. **Mol Cell Biol** 8: 466-72
- Tanaka, S., Neff, L., Baron, R., Levy, J. B. 1995: Tyrosine phosphorylation and translocation of the c-cbl protein after activation of tyrosine kinase signaling pathways. **J Biol Chem** 270: 14347-51
- Taniguchi, M., Nishida, T., Hirota, S., Isozaki, K., Ito, T., Nomura, T., Matsuda, H., Kitamura, Y. 1999: Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res** 59: 4297-300
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schakel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhauser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G., Illmer, T. 2002: Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood** 99: 4326-35
- Thien, C. B., Langdon, W. Y. 1997a: EGF receptor binding and transformation by v-cbl is ablated by the introduction of a loss-of-function mutation from the *Caenorhabditis elegans* sli-1 gene. **Oncogene** 14: 2239-49
- Thien, C. B., Langdon, W. Y. 1997b: Tyrosine kinase activity of the EGF receptor is enhanced by the expression of oncogenic 70Z-Cbl. **Oncogene** 15: 2909-19

- Thien, C. B., Langdon, W. Y. 2001: Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2: 294-307
- Thien, C. B., Walker, F., Langdon, W. Y. 2001: RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. **Mol Cell** 7: 355-65
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76: 4350-4
- Tse, K. F., Mukherjee, G., Small, D. 2000: Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. **Leukemia** 14: 1766-76
- Tsujimura, T. 1996: Role of c-kit receptor tyrosine kinase in the development, survival and neoplastic transformation of mast cells. **Pathol Int** 46: 933-8
- Turner, A. M., Lin, N. L., Issarachai, S., Lyman, S. D., Broudy, V. C. 1996: FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. **Blood** 88: 3383-90
- van Oosterom, A. T., Judson, I., Verweij, J., Stroobants, S., Donato di Paola, E., Dimitrijevic, S., Martens, M., Webb, A., Sciot, R., Van Glabbeke, M., Silberman, S., Nielsen, O. S. 2001: Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. **Lancet** 358: 1421-3
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., Thompson, C. B. 1997: Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell** 91: 627-37
- Vezina, C., Kudelski, A., Sehgal, S. N. 1975: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **J Antibiot (Tokyo)** 28: 721-6
- Vivanco, I., Sawyers, C. L. 2002: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer** 2: 489-501
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., Brown, R. F. 1994: A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). **J Biol Chem** 269: 5241-8
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W. 2004: Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med** 10: 789-99
- Wai, D. H., Knezevich, S. R., Lucas, T., Jansen, B., Kay, R. J., Sorensen, P. H. 2000: The ETV6-NTRK3 gene fusion encodes a chimeric protein tyrosine kinase that transforms NIH3T3 cells. **Oncogene** 19: 906-15
- Wang, Y., Yeung, Y. G., Langdon, W. Y., Stanley, E. R. 1996: c-Cbl is transiently tyrosine-phosphorylated, ubiquitinated, and membrane-targeted following CSF-1 stimulation of macrophages. **J Biol Chem** 271: 17-20
- Warner, N. L., Moore, M. A., Metcalf, D. 1969: A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. **J Natl Cancer Inst** 43: 963-82
- Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Yarden, Y. 1999: The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. **J Biol Chem** 274: 22151-4

- Weisberg 2002a: Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. **Cancer Cell** 5: 433-43
- Weisberg, E., Boulton, C., Kelly, L. M., Manley, P., Fabbro, D., Meyer, T., Gilliland, D. G., Griffin, J. D. 2002b: Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. **Cancer Cell** 1: 433-43
- Wilde, A., Beattie, E. C., Lem, L., Riethof, D. A., Liu, S. H., Mobley, W. C., Soriano, P., Brodsky, F. M. 1999: EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. **Cell** 96: 677-87
- Wilhelmsen, K., Burkhalter, S., van der Geer, P. 2002: C-Cbl binds the CSF-1 receptor at tyrosine 973, a novel phosphorylation site in the receptor's carboxy-terminus. **Oncogene** 21: 1079-89
- Wyllie, A. H. 1980: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature** 284: 555-6
- 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., Naoe, T. 2001: Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood** 97: 2434-9
- Yee, K. W., O'Farrell, A. M., Smolich, B. D., Cherrington, J. M., McMahon, G., Wait, C. L., McGreevey, L. S., Griffith, D. J., Heinrich, M. C. 2002: SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. **Blood** 100: 2941-9
- Yokota, S., Kiyoi, H., Nakao, M., Iwai, T., Misawa, S., Okuda, T., Sonoda, Y., Abe, T., Kahsima, K., Matsuo, Y., Naoe, T. 1997: Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. **Leukemia** 11: 1605-9
- Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Horne, W. C., Zhang, H., Yoshimura, A., Baron, R. 1999: Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbCH7. **J Biol Chem** 274: 31707-12
- Yoon, C. H., Lee, J., Jongeward, G. D., Sternberg, P. W. 1995: Similarity of sli-1, a regulator of vulval development in *C. elegans*, to the mammalian proto-oncogene c-cbl. **Science** 269: 1102-5
- Yunis, J. J., Brunning, R. D. 1986: Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukaemias and myelodysplastic syndromes. **Clin Haematol** 15: 597-620
- Zeng, S., Xu, Z., Lipkowitz, S., Longley, J. B. 2005: Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). **Blood** 105: 226-32
- Zhang, S., Broxmeyer, H. E. 2000: Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. **Biochem Biophys Res Commun** 277: 195-9
- Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. P. 2000: Structure of a c-Cbl-Ubch7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. **Cell** 102: 533-9
- 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., Small, D. 2004: FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. **Blood** 103: 267-74

10 Curriculum vitae

NAME Carola Barbara Reindl
GEBURTSDATUM 19. November 1974
GEBURTSORT Fürstenfeldbruck
FAMILIENSTAND ledig
NATIONALITÄT deutsch

SCHULBILDUNG

07/94 Allgemeine Hochschulreife, Graf-Rasso-Gymnasium Fürstenfeldbruck

STUDIUM

10/94 – 09/95 Studium der Rechtswissenschaften, Ludwig-Maximilians-Universität München

10/95 – 02/02 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien und Studium der
Diplom-Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

08/01 – 12/01 Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien

01/02 - 02/02 Diplomprüfung in Biologie

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

07/02 – 11/03 Clinical Research Associate, Abt. Medical Affairs Arthritis/Pain & CNS, Pharmacia
GmbH, Erlangen

PROMOTION

11/03 – 01/07 Promotion zum Dr. rer. biol. hum. in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Karsten
Spiekermann, Klinische Kooperationsgruppe 'Leukämie', Medizinische Klinik III,
Klinikum Großhadern und GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) –
Hämatologikum (Leitung: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann)
Thema: Aberrante Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase FLT3 in der akuten
myeloischen Leukämie

FÖRDERUNG / AUSZEICHNUNG

04/06 – 10/06 Förderung durch die José Carreras Leukämie Stiftung, München

Travel Award 11th Annual Congress of the European Hematology Association (EHA),
15.6.-18.06.06, Amsterdam, Niederlande

PUBLIKATIONEN

Reindl C. and Spiekermann K.

„From kinases to cancer: Leakiness, loss of autoinhibition and leukemia”, *Cell Cycle* 2006, 5 (6), 599 – 602

Reindl C., Bagrintseva K., Vempati S., Schnittger S., Ellwart J.W., Wenig K., Hopfner K.P., Hiddemann W., Spiekermann K.

“Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML”, *Blood*. 2006, 107 (9), 3700-07

Bagrintseva K., Geisenhof S., Kern R., Eichenlaub S., **Reindl C.**, Ellwart J.W., Hiddemann W.
“FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L)”, *Blood* 105: 3679-85, 2005

VORTRAG

Reindl C., Hiddemann W., Spiekermann K.

“Oncogenic CBL mutants confer a transforming potential to hematopoietic cells expressing the FLT3 tyrosine kinase”, 11th Annual Congress of the European Hematology Association (EHA), 15.6.-18.06.2006, Amsterdam, Niederlande

POSTERPRÄSENTATIONEN

Reindl C., Vempati S., Quentmeier H., Mellert G., Hiddemann W., Spiekermann K.

“Oncogenic CBL mutants have transforming potential in cells expressing the FLT3 tyrosine kinase”, 48th Annual Congress of the American Society of Hematology (ASH), 9.12.-12.12.2006, Orlando, FL, USA

Reindl C., Hiddemann W., Spiekermann K.

“Oncogenic CBL mutants confer a transforming potential to hematopoietic cells expressing the FLT3 tyrosine kinase”, Annual Congress of the German Association of Hematology and Oncology, 4.11.-8.11. 2006, Leipzig

Reindl C., Bagrintseva K., Vempati S., Schnittger S., Ellwart J.W., Wenig K., Hopfner K.P., Hiddemann W., Spiekermann K.

“Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 are rarely found in patients with AML and define the third class of activating mutations”, 11th Annual Congress of the European Hematology Association (EHA), 15.6.-18.06.2006, Amsterdam, Niederlande

Reindl C., Bagrintseva K., Vempati S., Schnittger S., Ellwart J.W., Wenig K., Hopfner K.P., Hiddemann W., Spiekermann K.

“Point mutations found in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML”, *Acute Leukemias XI*, International Symposium, 18.02.-22.02.2006, München

Reindl C., Bagrintseva K., Vempati S., Schnittger S., Ellwart J.W., Wenig K., Hopfner K.P., Hiddemann W., Spiekermann K.

“Point mutations found in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML”, Annual Congress of the German Association of Hematology and Oncology, 2.10.-4.10. 2005, Hannover