

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

**Induktion von Wachstumsarrest und Apoptose in
leukämischen Zelllinien durch selektive Inhibition der mutierten
Rezeptortyrosinkinase FLT3**

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

vorgelegt von
Ralf Josef Dirschinger
aus
München
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Hiddemann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Nerlich
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. vet. F. Krombach Prof. Dr. med. J.-U. Walther
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. K. Spiekermann
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	05.07.2007

Inhalt

1	<u>Einleitung</u>	6
1.1	Akute myeloische Leukämie	6
1.2	Die Rezeptortyrosinkinase FLT3	7
1.3	FLT3 und akute myeloische Leukämie	8
1.3.1	<i>FLT3-Längenmutationen</i>	8
1.3.2	<i>FLT3-TKD-Mutationen</i>	9
1.3.3	<i>Klinische Relevanz</i>	10
1.4	Fragestellung / Zielsetzung	10
2	<u>Material und Methoden</u>	12
2.1	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	12
2.1.1	<i>Material für die Zellkultur</i>	12
2.1.2	<i>Puffer, Lösungen und Gele</i>	12
2.1.3	<i>Inhibitoren und Reagenzien</i>	14
2.1.4	<i>Zytokine</i>	14
2.1.5	<i>Antikörper für Western-Blot</i>	14
2.2	Zellkultur	15
2.2.1	<i>Zelllinien</i>	15
2.2.2	<i>Kultivierung von Zellen</i>	15
2.2.3	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	16
2.2.4	<i>Herstellung von WEHI-Überständen als IL-3-Quelle</i>	16
2.3	Zellproliferationsassays	16
2.3.1	<i>Experimente mit Ba/F3 Zellen</i>	16
2.3.2	<i>Experimente mit leukämischen Zelllinien</i>	17
2.3.3	<i>MTT-Assays</i>	17
2.4	Durchflusszytometrie	18
2.4.1	<i>Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Kernfärbung</i>	18
2.4.2	<i>Apoptosemessung mittels Annexin-V-/7-AAD-Messung</i>	18
2.4.3	<i>Analyse der Expression von FLT3 (CD135)</i>	18
2.5	Proteinanalyse	19
2.5.1	<i>Proteinisolation</i>	19

		3
2.5.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	19
2.5.3	<i>Immunpräzipitation (IP)</i>	19
2.5.4	<i>SDS-PAGE</i>	20
2.5.5	<i>Western-Blot</i>	20
2.5.6	<i>Stripping der Nitrozellulosemembran</i>	21
2.6	Genanalyse, Mutagenese, Gentransfer	21
2.6.1	<i>RNA-Präparation</i>	21
2.6.2	<i>RNA-Quantifizierung</i>	22
2.6.3	<i>cDNA-Synthese</i>	22
2.6.4	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	22
2.6.5	<i>Nukleotid-Sequenzierung</i>	23
2.6.6	<i>DNA-Konstrukte und Vektoren</i>	23
2.6.7	<i>In vitro-Mutagenese</i>	24
2.6.8	<i>Transiente Transfektion von BOSC23-Zellen</i>	24
2.6.9	<i>Transduktion von Ba/F3-Zellen</i>	24
2.7	Elektronische Datenverarbeitung	24
2.7.1	<i>Statistik</i>	24
2.7.2	<i>Densitometrie</i>	24
3	<u>Ergebnisse</u>	25
3.1	FLT3ITD und FLT3D835Y transformieren Ba/F3-Zellen	25
3.1.1	<i>FLT3ITD und FLT3D835Y verleihen Ba/F3-Zellen IL-3-Unabhängigkeit</i>	25
3.1.2	<i>FLT3ITD und FLT3D835Y aktivieren STAT5 und MAPK in Ba/F3-Zellen</i>	26
3.2	SU5614 wirkt zytotoxisch in FLT3ITD/D835Y-transformierten Ba/F3-Zellen	28
3.2.1	<i>SU5614 hemmt das Wachstum FLT3ITD- und FLT3D835Y-transformierter Ba/F3-Zellen</i>	28
3.2.2	<i>SU5614 blockiert den Zellzyklus in G₁/G₀ und induziert Apoptose in FLT3-ITD-transformierten Ba/F3-Zellen</i>	29
3.2.3	<i>Mutiertes FLT3 und seine Downstream-Targets MAPK und STAT5 sind direkte Ziele von SU5614 in FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen</i>	31

		4
3.2.4	<i>SU5614 bewirkt eine Herabregulation von BCL-X_L und p21</i>	32
3.3	SU5614 hemmt das Wachstum und induziert Apoptose in AML-Zelllinien mit FLT3-Mutationen	33
3.3.1	<i>Die AML-Zelllinien MV4-11, MonoMac1 und MonoMac6 exprimieren mutierte, konstitutiv aktive FLT3-Rezeptoren</i>	33
3.3.2	<i>SU5614 hemmt selektiv das Wachstum der AML-Zelllinien MV4-11, MonoMac1 und MonoMac6</i>	36
3.3.3	<i>MM1-, MM6- und MV4-11-Zellen sind nicht empfindlich gegenüber Imatinib und SU1498</i>	38
3.3.4	<i>SU5614 führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose in MM1, MM6 und MV4-11-Zellen</i>	39
3.3.5	<i>Die Aktivität von MAPK, STAT3 und STAT5 wird in der AML-Zelllinie MM6 durch FLT3-Inhibition herabreguliert</i>	40
3.4	SU5614 hemmt Wildtyp-FLT3 in der AML-Zelllinie OCI-AML5	41
3.4.1	<i>SU5614 antagonisiert FL-stimuliertes Wachstum in OCI-AML5-Zellen</i>	41
3.4.2	<i>SU5614 hemmt FL-stimulierte FLT3-Phosphorylierung</i>	42
4	<u>Diskussion</u>	44
4.1	SU5614 hemmt die Aktivität der Rezeptortyrosinkinase FLT3	44
4.1.1	<i>Das Ba/F3-FLT3ITD/D835Y-Zellmodell</i>	44
4.1.2	<i>Auswahl des Inhibitors</i>	44
4.1.3	<i>Selektive Zytotoxizität von SU5614 in FLT3ITD/D835Y-transformierten Ba/F3-Zellen</i>	45
4.1.4	<i>SU5614 antagonisiert FLT3-WT-vermittelte Effekte</i>	46
4.1.5	<i>SU5614 dephosphoryliert FLT3 und dessen Downstream-Targets</i>	46
4.2	FLT3-Mutationen aktivieren in AML-Zelllinien essenzielle, nicht-redundante antiapoptotische und proliferative Signale	48
4.2.1	<i>AML-Zelllinien mit FLT3-Mutationen als Modell für FLT3-Mutation-positive AML</i>	48

		5
4.2.2	<i>SU5614 wirkt selektiv zytotoxisch in AML-Zelllinien mit FLT3-Mutation durch Inhibition von FLT3</i>	49
4.3	Signaltransduktion von mutiertem FLT3	51
4.3.1	<i>STAT3 und STAT5</i>	51
4.3.2	<i>Die STAT3/STAT5-Zielgene BCL-X_L und p21</i>	54
4.3.3	<i>MAPK</i>	55
4.4	Identifikation einer neuen FLT3-Mutation	55
4.5	Klinische Implikationen	56
5	<u>Zusammenfassung</u>	59
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	60
7	<u>Anhang</u>	67
7.1	Abkürzungen	67
7.2	Publikationen im Rahmen dieser Arbeit	70
7.2.1	<i>Fachpresse</i>	70
7.2.2	<i>Publizierte Abstracts</i>	70
7.3	Danksagung	71
7.4	Lebenslauf	72

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Dabei führt die Expansion eines malignen Zellklons zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Die AML tritt in Europa und den USA mit einer jährlichen Inzidenz von 2 – 4 / 100 000 auf, wobei die Inzidenz mit dem Alter zunimmt. Die Erkrankung hat eine schlechte Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von unter 65-jährigen Patienten wird mit etwa 40 % in klinischen Studien und mit 32,7 % in einer groß angelegten amerikanischen epidemiologischen Untersuchung angegeben.¹⁻³ Die Prognose nimmt mit steigendem Alter drastisch ab. So beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate der über 75-jährigen nur etwa 2 %. Die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeiten für fünf Jahre liegen in Europa und den USA bei etwa 20 %.^{3,4}

In den letzten Jahrzehnten konnten weit reichende Erkenntnisse über die molekularbiologischen Zusammenhänge der Erkrankung gewonnen werden. So hat sich ein Bild der AML als heterogene Erkrankungsgruppe mit multiplen genetischen Veränderungen entwickelt. Man kennt derzeit mehr als hundert Gene, die bei der AML mutiert sein können, und die leukämischen Zellen eines einzelnen Patienten tragen meist multiple Mutationen. Die genetischen Veränderungen bei der AML lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe umfasst Mutationen, die den Zellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil verschaffen, die andere Gruppe setzt sich aus Mutationen zusammen, die in den Zellen einen Differenzierungsstopp und eine Selbsterneuerungstendenz auf einer bestimmten Stufe der Blutzellentwicklung bewirken. In Knochenmarktransplantations-Studien in Mäusen konnte gezeigt werden, dass mindestens eine Mutation aus jeder dieser Gruppen erforderlich ist, um eine Leukämie zu induzieren. Basierend auf diesen Erkenntnissen hat sich ein Zwei-Mutationen-Modell der Pathogenese der AML entwickelt.⁵

Therapiert wird die AML mit verschiedenen Chemotherapeutika, wobei sich trotz des ständigen Wissenszuwachses das Therapieprinzip in den letzten Jahrzehnten nicht grundlegend geändert hat. Eine Transplantation von Knochenmark oder

peripheren Blutstammzellen kann die Prognose verbessern, ist aber in vielen Fällen nicht möglich.⁴

Ziel der wissenschaftlichen Bemühungen ist die Identifikation von molekularen Angriffspunkten, um direkt in die Pathogenese der Erkrankung eingreifen zu können und damit Effizienz und Verträglichkeit der Therapie zu verbessern. Das langfristige Ziel ist es – basierend auf dem Zwei-Mutationen-Modell – kombinierte, genotyp-spezifische, molekulare Therapien verschiedener Leukämien zu entwickeln, aber seine Verwirklichung ist noch nicht absehbar. Mittelfristig scheint es daher sinnvoll, erste molekulare Therapieformen mit der herkömmlichen Chemotherapie zu kombinieren und so die Heilungschancen zu verbessern. Mit der Einführung von ATRA (*all-trans retinoic acid*) in die Therapie der akuten Promyelozytenleukämie (APL) ist ein erster Schritt in diese Richtung geglückt. Die APL zeichnet sich durch Mutationen mit Beteiligung des Retinsäure-Rezeptors RAR α aus. In den meisten Fällen liegt das Fusionsprotein PML/RAR α (*promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α*) vor, welches durch die chromosomale Tranlokation t(15;17) entsteht. Vereinfacht ausgedrückt ist der Transkriptionsregulator wichtiger Gene RAR α durch die Fusion mit PML defekt. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der myeloischen Differenzierung im Stadium der Promyelozyten. ATRA hebt diesen Effekt auf, die Zellen differenzieren zu Granulozyten und gehen schließlich durch Apoptose zugrunde. Durch diesen ersten molekularen Ansatz in der Standardtherapie der AML hat sich die Prognose der APL deutlich verbessert. Mit 70 – 80 % krankheitsfreier Fünf-Jahres-Überlebensrate ist sie zum am Besten heilbaren AML-Subtyp geworden.⁶ Unter den zahlreichen genetischen Veränderungen in der AML wird nach weiteren geeigneten molekularen Angriffspunkten gesucht. In dieser Arbeit soll für die Rezeptortyrosinkinase FLT3 überprüft werden, ob sie ein potentielles Ziel für neue Therapieansätze in der AML darstellt.

1.2 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*), Synonyme sind CD135, FLK-2 und STK-1, ist ein Vertreter der Protein-Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) der Klasse III.⁷ RTKs dieser Klasse sind durch eine unterbrochene Kinasedomäne gekennzeichnet. FLT3 gehört gemeinsam mit RTKs wie PDGFR (*platelet-derived growth factor*

receptor) oder KIT einer Untergruppe an, die durch einen sehr ähnlichen Aufbau charakterisiert sind. Sie bestehen aus fünf Immunglobulinähnlichen Domänen, einer juxtamembranen (JM) Domäne, zwei Protein-Tyrosinkinase (PTK)-Domänen und einer Interkinase-Domäne.⁸⁻¹⁰ FLT3 wird auf der Oberfläche unreifer hämatopoetischer Zellen exprimiert und spielt eine Rolle für Überleben und Proliferation multipotenter Vorläuferzellen.¹¹ Durch die Bindung von FLT3-Ligand (FL) dimerisiert der Rezeptor, was zur Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege führt.¹²

1.3 FLT3 und akute myeloische Leukämie

FLT3 wird auf 70 – 100 % der Blasten akuter myeloischer Leukämien exprimiert.¹³ Stimulation mit FL führt zur Proliferation dieser Zellen und verhindert Apoptose durch Induktion von BCL-2.¹⁴ Darüber hinaus findet man in den leukämischen Blasten von etwa 30 % der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie FLT3-Proteine mit Mutationen. Diese Mutationen sollen im Folgenden beschrieben werden.

1.3.1 FLT3-Längenmutationen

Die meisten FLT3-Mutationen sind Längenmutationen (FLT3-LM; in etwa 24 % aller AML)¹³, welche in der Regel aus internen Tandemduplikationen (ITD) und Insertionen in der JM-Region von FLT3 bestehen. Es handelt sich dabei um verschieden lange Aminosäuresequenzen, die verdoppelt sind und wodurch die JM-Region des Proteins verlängert ist. Die Mutationen sind *in frame*, d. h. „im Leserahmen“. Das bedeutet, dass die RNA hinter der Insertion korrekt weitertranslatiert wird.¹⁵⁻¹⁸

Der JM-Region von Rezeptortyrosinkinasen der Klasse III wird eine autoinhibitorische Funktion im inaktiven Zustand des Rezeptors zugeschrieben. Die Kristallstruktur von FLT3 scheint dies zu bestätigen.¹⁹ Durch die Verlängerung der JM-Domäne, die aus einer ITD-Mutation resultiert, verliert diese offenbar ihre Funktion. Es resultiert eine unregulierte, d.h. konstitutive Tyrosinkinaseaktivität der FLT3-Rezeptormutanten im Gegensatz zum Wildtyprezeptor.²⁰ Transduziert man sie in IL-3-abhängige Zelllinien, so werden diese faktorunabhängig. In den Zellen

werden sowohl STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) als auch MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) aktiviert, die beide unter anderem eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion von Differenzierung, Proliferation und Überleben spielen. Dieselbe Wirkung hat ein konstitutiv aktives TEL-FLT3-Fusionsprotein.²¹⁻²⁴

In einem Knochenmarkstransplantations(KMT)-Modell bei Mäusen sind FLT3-LM (bzw. das TEL-FLT3-Konstrukt) alleine nicht in der Lage, eine Leukämie zu erzeugen. Stattdessen verursachen sie jedoch eine myeloproliferative Erkrankung.^{25, 26}

FLT3-LM kommen in allen FAB-Subgruppen (*French-American-British classification*) vor, eine häufige Assoziation besteht jedoch mit der Subgruppe M3, d. h. der akuten Promyelozytenleukämie (APL)¹⁶, die fast immer durch das Vorhandensein des leukämischen Fusionsproteins PML/RAR α gekennzeichnet ist. In einem weiteren murinen KMT-Modell konnte gezeigt werden, dass sich durch das Zusammenwirken von FLT3-LM mit PML/RAR α der Phänotyp einer APL entwickelt.²⁷

Die wachstumshemmende Aktivität des PTK-Inhibitors AG1295 gegenüber AML-Blasten mit FLT3-LM ist signifikant höher als die gegenüber Blasten ohne FLT3-LM.²⁸

Diese Ergebnisse belegen die pathogenetische Signifikanz von FLT3-LM für die AML. Nach dem einleitend vorgestellten Zwei-Mutationen-Modell für die Pathogenese der AML handelt es sich bei FLT3-Mutationen um Mutationen, die einen Wachstums- und Überlebensvorteil vermitteln.

1.3.2 FLT3-TKD-Mutationen

Bei etwa 7 % der Patienten mit AML bestehen Mutationen im Bereich der Aktivierungsschleife von FLT3, einer Region innerhalb einer Tyrosinkinasedomäne (TKD) von RTKs der Klasse III, welcher negativ regulatorische Aktivität zugeschrieben wird. Diese Mutationen werden unter dem Übergriff FLT3-TKD-Mutationen zusammengefasst. Am häufigsten sind die Codons 835 und 836 betroffen und hierbei am häufigsten der Austausch von Aspartat 835 zu Tyrosin (FLT3D835Y). Die zahlreichen beschriebenen Punktmutationen sind offenbar alle aktivierend und bewirken wie die FLT3-LM in IL-3-abhängigen Zelllinien faktorunabhängiges Wachstum.²⁹⁻³¹ Interessanterweise entspricht das Codon

Asp835 von FLT3 dem Codon Asp816 von KIT, welches bei Patienten mit Mastozytose und AML mutiert sein kann. Weitere aktivierende Mutationen im Bereich der FLT3-Aktivierungsschleife wurden von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe und anderen Arbeitsgruppen beschrieben.³²⁻³⁶

1.3.3 Klinische Relevanz

Mutationen des *FLT3*-Gens gehören zu den häufigsten genetischen Alterationen in der AML.¹³ Die klinische Bedeutung von FLT3-LM wurde in zahlreichen Studien untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Vorhandensein von FLT3-LM mit höheren Leukozytenzahlen bei der Diagnose assoziiert ist.^{16, 17, 37-40} Darüber hinaus ergab sich in mehreren Studien eine schlechtere Prognose für Patienten mit FLT3-LM^{16, 38-40}, wobei eine andere große Untersuchung zwar eine höhere Rückfallrate, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtmortalität bei Pat. mit FLT3-LM zeigte.¹⁷ Der Verlust des residualen FLT3-Wildtyp-Allels (FLT3-WT), wie er in 30 bis 35 % der Patienten mit FLT3-LM auftritt, erwies sich als prognostisch besonders ungünstig.⁴¹

Die klinische Bedeutung der FLT3-TKD-Mutationen ist nicht klar. Ihre Häufigkeitsverteilung innerhalb der FAB-Subgruppen unterscheidet sich deutlich von der der FLT3-LM. Darüber hinaus konnte keine Assoziation der Mutationen der Codons 835/836 mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung gezeigt werden.⁴²

1.4 Fragestellung / Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Rezeptortyrosinkinase FLT3 einen potenziellen Angriffspunkt für eine gezielte molekulare Therapie der akuten myeloischen Leukämie darstellt. Diese Problemstellung lässt sich in zwei Fragen unterteilen, die hier weitgehend getrennt bearbeitet wurden:

Erstens sollte geklärt werden, ob es möglich und praktikabel ist, die Tyrosinkinaseaktivität von FLT3 zu unterbrechen. Dazu sollte ein geeigneter FLT3-Inhibitor identifiziert werden. Voruntersuchungen zu dieser Arbeit ergaben Hinweise auf eine inhibitorische Aktivität des PTK-Inhibitors SU5614 gegenüber FLT3. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die detaillierte Untersuchung dieser

FLT3-inhibitorischen Aktivität.

Zweitens sollte mit Hilfe eines solchen FLT3-Inhibitors gezeigt werden, ob die Inhibition von FLT3 in der AML im präklinischen Modellsystem eine therapeutische Aktivität besitzt. Es sollte untersucht werden, ob FLT3-Mutationen in leukämischen Zellen einen biologischen Zweck erfüllen, d. h. ob die von FLT3-Mutationen aktivierten Signaltransduktionswege mitverantwortlich für den malignen Phänotyp von AML-Blasten sind, und wenn ja, ob diese Effekte FLT3-abhängig sind oder durch andere redundante Systeme der AML-Zellen ersetzt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 *Material für die Zellkultur*

Material	Bezugsquelle
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	PAN oder Gibco, Deutschland
EDTA	Gibco BRL, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN, Deutschland
Plastikverbrauchsmaterial	Costar, Sarstedt, Nunc oder Becton Dickinson, Deutschland
RPMI-1640 + GlutaMAX Medium	PAN oder Gibco, Deutschland
Sterilfilter Filtropur S02, 0,2 µm	Sarstedt, Deutschland
Streptomycin	Gibco, Deutschland
Trypanblau	Gibco, Deutschland
Trypsin	Gibco, Deutschland
Zellkulturplatten /-flaschen	Greiner oder Sarstedt, Deutschland

2.1.2 *Puffer, Lösungen und Gele*

Material	Beschreibung	Bezugsquelle
2 % Agarosegel	2 g Agarose, 100 ml 1x TBE	Chemikalien von Sigma, Deutschland
2x BBS	280 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 50 mM BES; H ₂ O (bidest) ad 500 ml	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1x Bio-Rad-Dye	Bio-Rad-Dye-Reagenz 1:5 mit H ₂ O verdünnt	Bio-Rad, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma, Deutschland
10x Elektrophorese-Puffer	30 g Tris; 144 g Glycin; 800 ml H ₂ O; 10 g SDS (Natriumdodecylsulfat)	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1x G-NET	2,5 g Gelatine in 100 ml 10x NET gelöst und aufgeköcht und H ₂ O ad 1 l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
HEPES-Puffer	50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; 10 % Glycerol	Chemikalien von Sigma, Deutschland
4x HNTG-Puffer	200 mM HEPES pH 7,5; 600 mM NaCl; 0,4 % Triton X-100; 40 % Glycerol	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Lämmli-Puffer	187,5 mM Tris; 6 % SDS; 30 % Glyzerin; Bromphenolblau	Chemikalien von Sigma, Deutschland

Lämmli-DTT-Puffer	2,5 ml Lämmli-Puffer; 0,6 g DTT (Dithiothreitol)	Chemikalien von Sigma, Deutschland
10x NET	1,5 M NaCl; 0,05 M EDTA pH 8; 0,5 M Tris pH 7,5; 0,5 % Triton X-100	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Ponceau-Rot	1 g Ponceau S in 500ml 2 % Trichloressigsäure gelöst	Chemikalien von Sigma, Deutschland
RIPA-Puffer	0,5 M Tris-HCl pH 7,4; 2,5 % Deoxycholat; 1,5 M NaCl; 10 mM EGTA pH 7; 1 ml NP-40; 100 mM PMSF; 100 mM Orthovanadat (Na_3VO_4); 1 mg/ml Aprotinin; 1 mg/ml Leupeptin; 0,1 mg/ml Pepstatin; 100 mM NaF; H_2O	Chemikalien von Sigma und Fluka, Deutschland
4 % Sammelgel	6,1 ml H_2O ; 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 ohne SDS; 1,3 ml Acrylamid (Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8) 100 μl 10 % SDS; 50 μl 10 % APS (Ammoniumpersulfat); 10 μl TEMED (N',N',N',N'-Tetramethyldiamin)	Chemikalien von Sigma und Roth, Deutschland
Strippinglösung	800 ml 3xTBS-T; 20 ml Mercapthoethanol; 200 ml 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	Chemikalien von Sigma, Deutschland
5x TBE	54 g Tris; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; H_2O (Millipore) ad 1l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
10x TBS	10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1x TBS-T	100ml 10x TBS; 1 % Tween 20; H_2O ad 1 l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
3x TBS-T	300ml 10x TBS; 15ml Tween 20; H_2O ad 1l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Transfektionsmix	300 μl 2xBBS; 30 μl CaCl_2 2,5M; 6 μl DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); H_2O ad 600 μl	Chemikalien von Sigma, Deutschland
10x Transblot	72,75 g Tris; 36,63 g Glycin; 0,475 g SDS	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1x Transblot	10x Transblot 1:10 mit Methanol 20 %	Chemikalien von Sigma, Deutschland
15 % Trenngel	2 g Saccharose; 3,3 ml H_2O ; 11,3 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 15 ml Acrylamid; 150 μl 20 % SDS; 100 μl 10 % APS und 3 μl TEMED	Chemikalien von Sigma, Deutschland
12,5 % Trenngel	2 g Saccharose; 2,9 ml H_2O ; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 6,25 ml Acrylamid; 75 μl 20 % SDS, 50 μl 10 % APS und 1,5 μl TEMED	Chemikalien von Sigma, Deutschland
7,5 % Trenngel	5,4 ml H_2O ; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 3,75ml Acrylamid; 75 μl 20 % SDS, 50 μl 10 % APS und 1,5 μl TEMED	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Tris-HCl pH 8,8	1,5 M Tris; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt	Chemikalien von Sigma, Deutschland

Tris-HCl pH 6,8

1,5 M Tris; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt

Chemikalien von
Sigma, Deutschland

2.1.3 Inhibitoren und Reagenzien

Die PTK-Inhibitoren SU5614 und SU1498 wurden von Calbiochem-Novabiochem (Deutschland) erworben, in DMSO gelöst in Stock-Konzentrationen von 10mM bzw. 50mM, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Imatinib (STI571, Gleevec®) wurde freundlicherweise von Novartis (Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die letztlich erreichten Konzentrationen von DMSO in Wachstumsmedium überschritten nicht 0,1 %. Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs (USA) bezogen. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) Assays wurden mit dem „Cell Proliferation Kit I“ von Roche Diagnostics (Deutschland) durchgeführt. Für die durchflusszytometrische Apoptosemessung wurde das „Annexin V-Phycoerythrin Apoptosis Detection Kit“ von Becton Dickinson (Deutschland) verwendet. Antikörper für Durchflusszytometrie wurden von Becton Dickinson (Deutschland) bezogen.

2.1.4 Zytokine

Zytokin	Beschreibung	Bezugsquelle
IL-3	rekombinantes murines Interleukin-3	Biosource International, Camarillo, CA, USA
FL	rekombinanter humaner FLT3-Ligand	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.1.5 Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Bezugsquelle
anti-FLT3/flk2	S18, sc-480 Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-PY	PY99
anti-STAT3	C20
anti-STAT5	sc-835
antiphospho-Thr202/Tyr204-p42/p44 MAPK-Ak	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
antiphospho-AKT-Ser473	
antiphospho-STAT3-Tyr705	
antiphospho-STAT5-Tyr694	

2.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Laminar-Flow-Sterilbänken (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Deutschland) durchgeführt. Medien und Zusätze wurden gekühlt aufbewahrt und vor Verwendung in einem Wasserbad (Schütt, Deutschland) auf 37 °C erwärmt.

2.2.1 Zelllinien

Sämtliche verwendete Zelllinien (Ba/F3, MV4-11, MonoMac1, MonoMac6, THP-1, OCI-AML5, NB4, U937, K562, HL60, PLB985, WEHI, BOSC23) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ; Deutschland) oder der American Type Culture Collection (ATCC; USA) bezogen und den Empfehlungen der Vertreibergesellschaften entsprechend kultiviert. *Low-Passage* Ba/F3 Zellen wurden bei der DSMZ erworben und in RPMI-1640-Medium mit 10 % FBS kultiviert. Für IL-3 abhängige Zellen wurde zusätzlich 10 % WEHI-konditioniertes Medium als Quelle für murines IL-3 verwendet. Ba/F3-Zellen mit TEL-ABL-, TEL-JAK2- und BCR-ABL-Konstrukten wurden schon zuvor von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe generiert.⁴³ Ba/F3-Zellen sind Pro-B-Zellen aus dem peripheren Blut von BALB/c-Mäusen. Die FLT3ITD-positive AML-Zelllinie MV4-11 stammt aus den FAB-M5-Leukämiezellen eines zehnjährigen Jungen und trägt eine Translokation t(4;11). Die Zelllinien MonoMac6 und MonoMac1 wurden aus dem peripheren Blut eines 64-jährigen Patienten mit einer AML FAB-M5 isoliert (Angaben der DSMZ).

2.2.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator vom Typ Cytoperm (Heraeus, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert. Mediumwechsel wurden bei Bedarf nach Ermittlung der Zellzahl, aber mindestens alle 2 – 3 Tage durchgeführt. Dazu wurden in Suspension wachsende Zellen mittels fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 rpm (220 rcf) und Raumtemperatur (Zentrifuge Typ Rotanta 46RC, Hettich, Deutschland) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in neuem Medium aufgenommen und entsprechend ihres Wachstums gesplittet und in Zellkulturflaschen kultiviert. Adhärente Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen, für fünf Minuten mit

Trypsin/EDTA inkubiert und danach in Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert, gesplittet und in einer Zellkulturschale weiterkultiviert. Für Zellzahlbestimmungen wurden Zellsuspensionen mit Trypanblau gefärbt, in eine Standard-Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) gefüllt und mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Leitz, Deutschland) gezählt.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Je 1×10^7 Zellen wurden in 1,5 ml Einfriermedium (90 % FBS und 10 % DMSO) aufgenommen und in einem Freezing-Container Typ Cryo 1 °C (Nalgene, Deutschland) bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufgetaut wurden die Zellen durch rasche Erwärmung auf 37 °C, Resuspension in Medium, Abzentrifugation, erneute Resuspension in Medium und Kultivierung wie beschrieben.

2.2.4 Herstellung von WEHI-Überständen als IL-3-Quelle

Für die Kultivierung IL-3-abhängiger Zelllinien wurde WEHI-konditioniertes Medium als IL-3-Quelle verwendet. WEHI-Zellen geben in Kultur IL-3 in das Medium ab. Dieses Medium wurde abgenommen, zentrifugiert, sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Für Experimente wurden keine WEHI-Überstände sondern nur rekombinantes IL-3 verwendet.

2.3 Zellproliferationsassays

2.3.1 Experimente mit Ba/F3 Zellen

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml Wachstumsmedium RPMI 1640 mit 10 % FBS ausgesät. IL-3 wurde zugefügt, wenn angegeben. Lebendige Zellen in Proben aus den Versuchsansätzen wurden drei Tage lang nach Färbung mit Trypanblau in einer Standard-Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Experimente mit PTK-Inhibitoren wurden in 48-Well-Platten durchgeführt mit 1 ml Wachstumsmedium pro Well.

2.3.2 Experimente mit leukämischen Zelllinien

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 1 ml RPMI-1640-Medium mit FBS kultiviert. Dabei enthielt das Medium für MV4-11-Zellen 20 % FBS und für alle anderen Zellen 10 % FBS. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen von PTK-Inhibitoren bzw. ohne Inhibitoren ausgesät und für 72 Stunden kultiviert. Für die Experimente zur Inhibition von FL-vermittelten Effekten in OCI-AML5-Zellen wurden diese zunächst für 16 Stunden in RPMI-1640-Medium mit 0,25 % FBS (Hungermedium) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in 48-Well-Platten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in Kulturmedium ohne Zusatz von Serum ausgesät. FL und SU5614 wurden wie angegeben hinzugefügt. Die Zellen wurden so für 96 Stunden kultiviert und anschließend in einer Standard-Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung gezählt. Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

2.3.3 MTT-Assays

Für die Durchführung der MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)-Assays wurden die Zellen täglich gezählt und genau gesplittet, um sie streng in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Die Experimente wurden in 96-Well-Platten mit 100 μ l Medium/Well angesetzt, wobei jeder Wert dreifach angesetzt wurde und die Randleihen nicht benutzt wurden. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in RPMI mit 10 % bzw. 20 % (für MV4-11) FBS und der entsprechenden Konzentration von SU5614 ausgesät. Nach 84 Stunden wurden die Zellen entsprechend der Instruktionen des Herstellers mit MTT behandelt. Nach 96 Stunden wurde die Absorption bei $\lambda = 570$ nm in einem Microplate-Reader Typ OptiMax (Molecular Devices, Deutschland) gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 690 nm. Es wurden je drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Abbildungen zeigen Mittelwert und Standardabweichung der somit erzielten neun verschiedenen Messwerte pro Wert.

2.4 Durchflusszytometrie

Alle Untersuchungen wurden in einem Durchflusszytometer vom Typ FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) durchgeführt.

2.4.1 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Kernfärbung

Die Zellzyklusanalysen erfolgten mittels Messung des DNA-Gehaltes der Zellkerne nach Färbung mit Propidiumjodid (PI) nach dem Protokoll von Buske et al.⁴⁴ Zellen wurden analog zu den Proliferationsassays für 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von SU5614 behandelt, danach mit kaltem PBS gewaschen und in speziellem PI-Lysispuffer resuspendiert (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100, 20 µg/ml Propidiumjodid, pH 8). Nach fünf Minuten Inkubation auf Eis wurde der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

2.4.2 Apoptosemessung mittels Annexin-V-/7-AAD-Messung

Der Anteil früh- und spätapoptotischer Zellen wurde nach Annexin-V- und 7-AAD(Aminoaktinomycin)-Färbung der Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Viable Zellen tragen das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) nur auf der Innenseite ihrer Membran, während frühapoptotische Zellen es auf beiden Seiten tragen. Phycoerythrin-(PE)-markiertes Annexin-V bindet spezifisch PS auf der Außenseite der Membran und färbt so frühapoptotische Zellen. 7-AAD wird nur von Zellen mit geschädigter Membran aufgenommen, d. h. spätapoptotischen oder toten Zellen. Die gleichzeitige Färbung erlaubt die Unterscheidung von viablen, frühapoptotischen und spätapoptotischen Zellen. Die Zellen wurden nach Behandlung mit SU5614 entsprechend dem Protokoll des Herstellers zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in Bindungspuffer mit einer Million Zellen pro ml resuspendiert, in Portionen von 100 µl aliquotiert, mit je 5 µl der Annexin-V-PE- und 7-AAD-Präparationen gefärbt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit vorsichtig gevortext und anschließend mit 400 µl Bindungspuffer aufgefüllt. Danach erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

2.4.3 Analyse der Expression von FLT3 (CD135)

AML-Zelllinien wurden mit kaltem PBS gewaschen, 30 Minuten auf Eis mit einem PE-konjugiertem Isotyp-Kontrollantikörper oder CD135-Antikörper gefärbt,

anschließend wieder gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5 Proteinanalyse

2.5.1 Proteinisolation

Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, in RIPA-Puffer lysiert und 30 Minuten bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Dann wurden die unlöslichen Zellbestandteile in einer Tischzentrifuge (Typ 5415, Eppendorf, Deutschland) bei 13200 rpm 20 Minuten lang abzentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde sofort weiterverwendet oder bei –20 °C gelagert.

2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Lysate wurde mittels Bradford-Reagenz (Bio-Rad-Dye, Bio-Rad, Deutschland) photometrisch ermittelt. Dazu wurden 980 µl 1:5 verdünnter Reagenz mit 20 µl 1:10 verdünnter Proteinprobe für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Leerwert (nur Reagenz) gemessen. Mittels einer definierten Verdünnungsreihe aus BSA-Lösung wurde nach dem gleichen Verfahren eine Eichkurve erstellt, aus der die Messwerte der Proben ermittelt wurden.

2.5.3 Immunpräzipitation (IP)

Die IP dient der Anreicherung von Proteinen aus Ganzzell-Lysaten mittels spezifischer Antikörper. Der Antikörper wurde in 30 µl Protein-A/G-Sepharose (Pharmacia Biotech Europe, Deutschland) für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. 1 – 10 mg Proteinlysate wurde hinzugegeben und alles für mindestens vier Stunden bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit HEPES-Puffer wurde das Immunpräzipitat in 20 µl Lämmli-DTT-Puffer resuspendiert und bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert. Nach Abzentrifugation in einer Tischzentrifuge (Typ 5415, Eppendorf, Deutschland) bei 13200 rpm wurde der Überstand mittels SDS-PAGE weiteranalysiert.

2.5.4 SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die SDS-PAGE wurden in vertikalen Elektrophoresekammern vom Typ Protean II xi (Bio-Rad, Deutschland) mit Netzgeräten des Modells E333 (Consort, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 15 %ige Polyacrylamidgele sowie 7,5 – 12,5 %ige Polyacrylamid-Gradientengele verwendet. Trenngele wurden nach dem Gießen mit destilliertem Wasser beschichtet. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde das Wasser abgenommen und das Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel beschichtet, sowie der Gelkamm eingelegt. Lysate gleicher Mengen der zu untersuchenden Proteine (15 – 100 µg) wurden mit gleichem Volumen Lämmli-DTT-Puffer (mit Bromphenolblaumarker) versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und in einer Tischzentrifuge (Typ 5415, Eppendorf, Deutschland) bei 9000 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Die so präparierten Lysate wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Größenreferenz für die Proteine wurden zwei Molekulargewichtsmarker verwendet (LMW, low molecular weight calibration kit, Amersham, England; HMW, high molecular weight standards broad range, Bio-Rad, Deutschland). Die Geltaschen wurden mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und die Proteine bei 20 bis 32 mA über 12 bis 18 Stunden aufgetrennt, bis der Bromphenolblau-Marker das Ende des Gels erreicht hatte.

2.5.5 Western-Blot

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mittels Semi-Dry-Elektrotransfer vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (modifizierter Western-Blot nach Towbin). Nitrozellulosemembran (Protran, Porengröße 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Deutschland) und Blottingpapiere (Schleicher & Schüll, Deutschland) in der Größe des Gels wurden in Transblotpuffer getränkt. Dann wurde die Semi-Dry-Elektrophorese-Transferkammer (Trans-Blot SD, Bio-Rad, Deutschland) wie folgt zusammengesetzt: Anode, drei Blottingpapiere, Nitrozellulosemembran, Gel, drei Blottingpapiere, Kathode. Bei 250 mA wurde mittels eines Netzgerätes (PowerPac 200, Bio-Rad, Deutschland) der Proteintransfer über drei Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit destilliertem Wasser gespült und mit Ponceau-S-Lösung reversibel gefärbt. Die Molekulargewichtsstandards wurden

markiert und die Färbung durch 20-minütiges Waschen in G-NET entfernt.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran in G-NET bei 4 °C über zwölf Stunden auf dem Kippschüttler inkubiert. Dann wurde die Nitrozellulosemembran mit (entsprechend den Herstellerangaben) verdünnter Primärantikörperlösung (Kaninchen oder Maus) in G-NET bei 4 °C über zwölf Stunden auf dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran für eine Stunde mit an HRPO (*horse radish peroxidase*) gekoppelten Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-Antikörpern (verdünnt in G-NET) inkubiert und anschließend wieder dreimal 15 Minuten mit TBS-T sowie einmal für fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper kam ein ECL-Kit (enhanced chemiluminescence Kit, Amersham, England) zum Einsatz. Die Reagenzien in diesem Kit erzeugen mit HRPO eine Chemolumineszenz, die dann detektiert werden kann. Die Membran wurde eine Minute mit den Reagenzien inkubiert, in Klarsichtfolie verpackt und ein Röntgenfilm (HyperfilmTMECLTM, Amersham, England) bis zu einer Stunde mit der Membran in einer Filmkassette (HypercassetteTM, Amersham, England) belichtet. Der Film wurde in einem automatischen Entwicklungsgerät des Typs Gevomatic 60 (Agfa, Deutschland) entwickelt.

2.5.6 Stripping der Nitrozellulosemembran

Zum Reinigen der Membranen von Antikörpern wurden sie zweimal für je 15 Minuten bei 65 °C mit Strippinglösung inkubiert und anschließend 30 Minuten mit 3xTBS-T gewaschen.

2.6 Genanalyse, Mutagenese, Gentransfer

2.6.1 RNA-Präparation

RNA-Isolation wurde mit Hilfe eines RNeasy-Kits durchgeführt (Qiagen, Deutschland). Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden 1×10^7 Zellen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und lysiert. Nach den Isolationsschritten wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.6.2 RNA-Quantifizierung

10 µl der zu messenden Probe wurden mit 490 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzglas-Präzisionsküvette vom Typ Suprasil (Hellma, Deutschland) mit Hilfe eines Photometers Typ Gene Quant II (Pharmacia Biotech Europe, Deutschland) gemessen.

2.6.3 cDNA-Synthese

cDNA wurde mittels Reverse-Transkriptase aus RNA abgeschrieben. Dazu wurden 20 µl präparierter RNA für zehn Minuten bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurden 8 µl 5x Erststrangpuffer, 1,5 µl Superscript Rnase H Reverse Transcriptase und 4 µl DTT (alle Gibco, Deutschland, Katalog-Nr.: 18064) sowie 3,5 µl dNTP-Mix (Gibco, Kat.-Nr.:10297-018), 2 µl Random Primer (Gibco, Kat.-Nr.: 48190-011), 1 µl rekombinanter Ribonuclease Inhibitor (Promega, Deutschland, Katalog-Nr.: N2511) sowie die RNA vermischt und 70 Minuten bei 37 °C sowie fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.6.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in einem PCR-Thermocycler vom Typ GeneAmp 9700 (Perkin Elmer, USA) durchgeführt. Taq-DNA-Polymerase und andere PCR-Reagenzien wurden bei Applied Biosystems (USA) oder TakaRa Biomedicals (Japan) erworben. Für die Analyse von FLT3ITD wurden die Exons 11 und 12 amplifiziert. Dabei wurde nach dem Protokoll von Kiyoi et al. vorgegangen.³⁸ Verwendet wurden die Primer 11F und 12R: 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' und 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3'. Denaturierung, Hybridisierung, und Synthese wurden 35-mal wie folgt durchgeführt: 94°C für 30 Sekunden, 56°C für eine Minute und 72°C für zwei Minuten. Für die Amplifikation des kompletten FLT3-Gens wurden folgende Primer verwendet (T_m ist die Schmelztemperatur):

Primer	Lage	Amplifizierte Region (bp)	Länge (b)	Tm (°C)	Sequenz (5'-3')
1. pMSCV	MSCV	1 – 260	20	61,4	CCCTTGAACCTCCTCGTTCCG
2. pFLT3-2	182 – 201	260 – 600	20	61,4	AAGACCTCGGGTGTGCGTTG
3. pFLT3-3	539 – 557	600 – 940	19	58,8	ACGCCCTGGTCTGCATATC
4. hFLT3 843 F	843 – 862	940 – 1280	20	61,4	CGGGCTCACCTGGGAATTAG
5. pFLT3-5	1217 – 1237	1280 – 1620	21	55,9	TTTGCAATCATAAGCACCAGC
6. pFLT3-6	1548 – 1568	1620 – 1960	21	55,9	ATACAATCCCTTGGCACATC
7. pFLT3-7	1902 – 1921	1960 – 2300	20	57,3	AACAGGAGTCTCAATCCAGG
8. pFLT3 2205F	2205 – 2224	2300 – 2640	20	59,4	CAGCATGCCTGGTTCAAGAG
9. pFLT3-9	2586 – 2606	2640 – 2980	21	55,9	AGGCATCTACACCATTAAGAG

Ein leerer PCR-Ansatz wurde stets als Negativ-Kontrolle verwendet. 5 µl der Produkte wurden nach Auftrennung in einem 1,5 – 2 %igen Agarosegel durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größenreferenz wurde eine 100-bp-DNA-Leiter verwendet (Promega, USA).

2.6.5 Nukleotid-Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen wurden durch die Firma Sequi-Lab (Deutschland) durchgeführt.

2.6.6 DNA-Konstrukte und Vektoren

Das FLT3ITD-NPOS-Konstrukt enthält eine zusätzliche duplizierte Sequenz von 28 Aminosäuren (CSSDNEYFYVDFREYEDLKWEPRENL) zwischen den Aminosäuren 610 und 611 des Wildtyp-FLT3-Rezeptors. Das FLT3ITD-W51-Konstrukt enthält eine sechs Aminosäuren lange, zwischen den Aminosäuren 601 und 602 eingefügte, verdoppelte Sequenz (REYEDL). Diese Konstrukte wurden freundlicherweise von D. G. Gilliland, Howard Hughes Medical Institute and Brigham and Women's Hospital, Harvard Institutes of Medicine, Harvard Medical School, Boston, USA zur Verfügung gestellt. Alle FLT3 Konstrukte wurden in den retroviralen MSCV-IRES-EYFP/EGFP-Expressionsvektor subkloniert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. K. Humphries, The Terry Fox Laboratory, University of British Columbia, Vancouver, Kanada).

2.6.7 *In vitro*-Mutagenese

Die FLT3D835Y- und FLT3V592A-Mutationen wurden in einem PCR-basierten Verfahren mittels QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) in die vollständige FLT3-WT-cDNA eingefügt. Die Arbeitsschritte wurden den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Die korrekte Sequenz aller Konstrukte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

2.6.8 *Transiente Transfektion von BOSC23-Zellen*

BOSC23 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in 10 cm-Schalen ausgesät. Die transiente Transfektion wurde mit der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode durchgeführt, wobei 6 µg pDNA pro 10 cm-Schale verwendet wurden. 18 Stunden nach der Transfektion wurde neues Medium hinzugefügt. Nach weiteren 30 Stunden Inkubation wurde der retrovirale Überstand zur Transduktion von Ba/F3-Zellen verwendet.

2.6.9 *Transduktion von Ba/F3-Zellen*

2×10^5 Ba/F3-Zellen wurden in 1 ml Wachstumsmedium ausgesät und anschließend einmal in der Anwesenheit von 8 µg/ml Polybrene mit 200 µl des retroviralen Überstandes transduziert. Nach 48 Stunden wurden die EGFP/EYFP-positiven Zellen mit Hilfe eines Zellsortiergerätes (FACS-Vantage-System mit Turbo-Sort device, Becton-Dickinson, USA) isoliert.

2.7 Elektronische Datenverarbeitung

2.7.1 *Statistik*

Für die statistische Auswertung der Zellzyklusanalysen wurde der t-Test für abhängige und unverbundene Stichproben (Excel, Microsoft, USA) verwendet. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

2.7.2 *Densitometrie*

Densitometrische Auswertungen der Western-Blots wurden mit dem Programm Tina 2.09 (Raytest Isotopenmessgeräte, Deutschland) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 FLT3ITD und FLT3D835Y transformieren Ba/F3-Zellen

3.1.1 *FLT3ITD und FLT3D835Y verleihen Ba/F3-Zellen IL-3-Unabhängigkeit*

Es wurden FLT3-Mutationen exprimierende Ba/F3-Zellen generiert. Dazu wurden zwei FLT3ITD-Konstrukte (FLT3ITD-NPOS und FLT3ITD-W51) sowie ein FLT3D835Y-Konstrukt verwendet. Um erfolgreich transduzierte Zellen selektionieren zu können, wurden IL-3-abhängige Ba/F3 mit dem retroviralen Expressionsvektor pMSCV-IRES-EGFP/EYFP transduziert. Dieser Vektor enthält eine *internal ribosomal entry site* (IRES) und ermöglicht die gemeinsame Transkription der FLT3-Konstrukte mit den fluoreszierenden Proteinen EGFP bzw. EYFP (*enhanced green/yellow fluorescent protein*) vom gleichen Transkript. Die Anwesenheit dieser Proteine wurde durchflusszytometrisch ermittelt.

Nach Transduktion von Ba/F3-Zellen mit dem FLT3ITD-NPOS-Retrovirus wurde die Anzahl EGFP-positiver Zellen wiederholt gemessen. Nach IL-3-Entzug zeigte sich ein deutlicher Wachstumsvorteil EGFP-positiver, d. h. FLT3ITD-positiver Zellen gegenüber EGFP-negativen, d. h. nicht-transduzierten Zellen. Der Anteil EGFP-positiver und somit FLT3ITD-NPOS-positiver Zellen betrug vier Tage nach Transduktion 1,3 %, erreichte am dreizehnten Tag 89 % (Abbildung 3.1 A) und nach längerer Kultur letztlich über 99 % (nicht gezeigt).

Alle drei verwendeten mutierten FLT3-Konstrukte bewirkten IL-3-unabhängiges Wachstum in Ba/F3-Zellen (Abbildung 3.1 B). Im Gegensatz dazu wurde durch die Transduktion von Wildtyp-FLT3 in Ba/F3-Zellen keine IL-3-Unabhängigkeit erreicht.

Das Vorliegen identischer Expressionsniveaus aller FLT3-Konstrukte wurde durch Durchflusszytometrie und Western-Blot nach Immunpräzipitation mit einem FLT3-spezifischen Antikörper nachgewiesen (keine Abbildung).

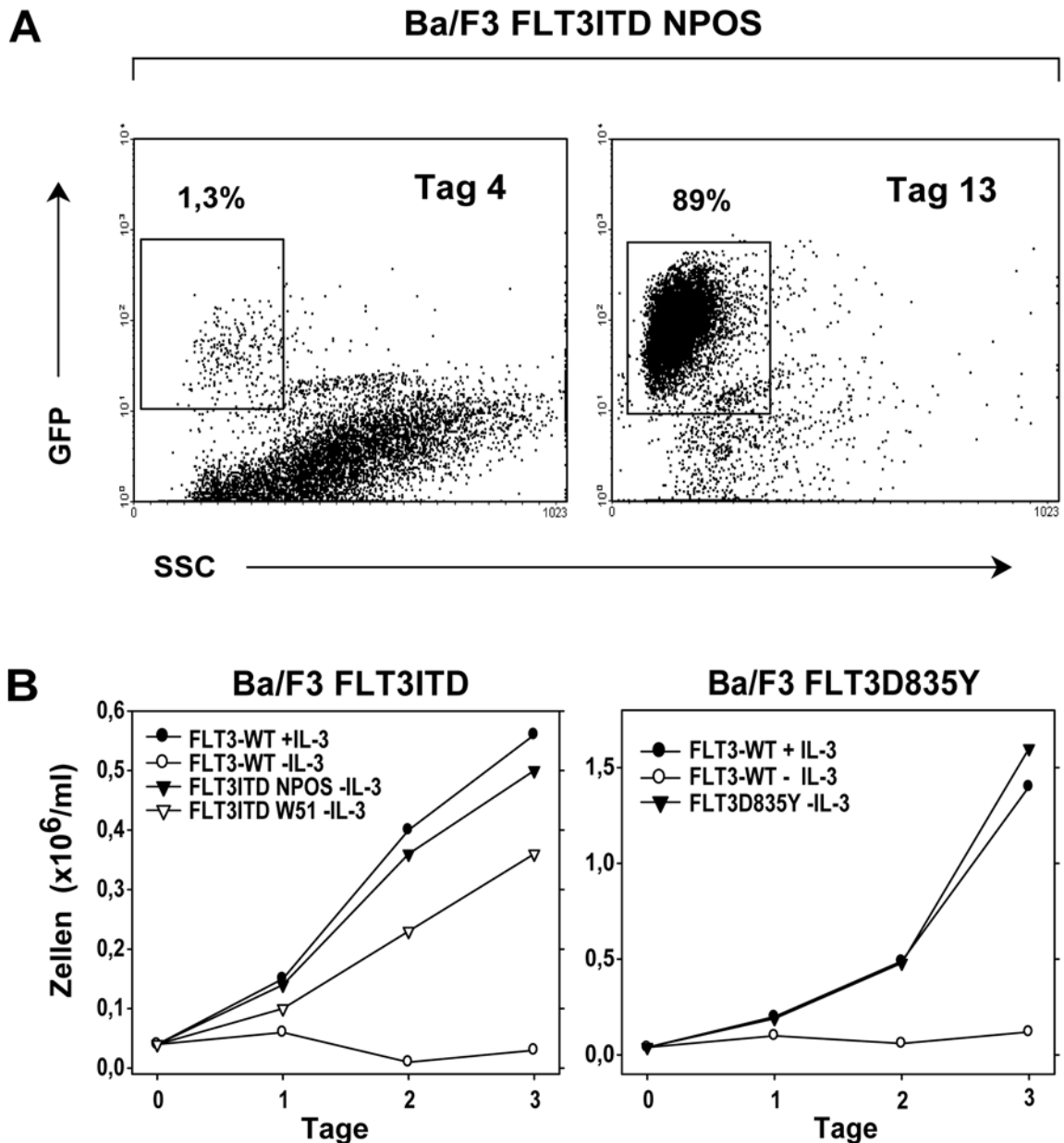


Abbildung 3.1: FLT3ITD und FLT3D835Y transformieren Ba/F3-Zellen zur Faktorunabhängigkeit. FLT3ITD-Mutationen erzeugen einen selektiven Wachstumsvorteil in IL-3-abhängigen Zellen. (A) Durchflusszytometrische Messung der EGFP-Expression in pMSCV-EGFP-IRES-FLT3ITD-NPOS-transduzierten Ba/F3-Zellen 4 Tage und 13 Tage nach Transduktion und IL-3-Entzug. (B) FLT3-Mutationen erzeugen im Gegensatz zu FLT3-WT-Konstrukten IL-3-Unabhängigkeit in Ba/F3-Zellen.

3.1.2 FLT3ITD und FLT3D835Y aktivieren STAT5 und MAPK in Ba/F3-Zellen

Mittels Western-Blot mit phosphospezifischen Antikörpern wurde das Ausmaß der Phosphorylierung und somit der Aktivierungsstatus von MAPK, AKT, STAT3 und STAT5 in FLT3ITD/D835Y-transformierten Ba/F3-Zellen untersucht. Als Kontrollgruppe wurden mit leerem Vektor transformierte Ba/F3-Zellen verwendet.

In den FLT3-transformierten Zellen zeigte sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine starke Aktivierung von STAT5 und MAPK (ERK). Es konnte nur eine schwache Aktivierung von STAT3 und keine Aktivierung von AKT gemessen werden (Abbildung 3.2).

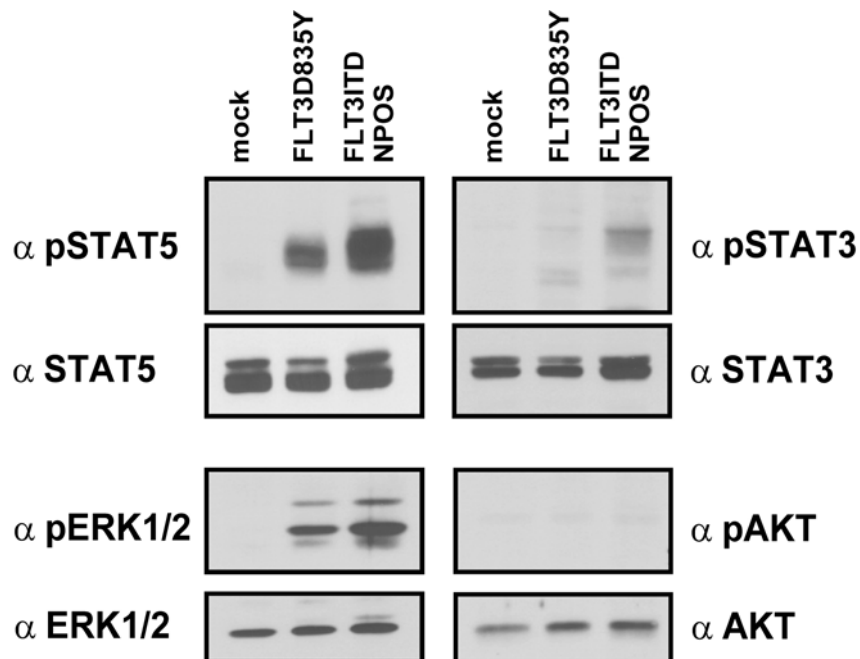


Abbildung 3.2: FLT3ITD und FLT3D835Y aktivieren STAT5 und MAPK in Ba/F3-Zellen. Western-Blots aus Proteinlysaten FLT3-transformierter Ba/F3-Zellen und vektor-transduzierter Zellen (mock). Keine Aktivierung von AKT und nur schwache Aktivierung von STAT3 war nachweisbar.

3.2 SU5614 wirkt zytotoxisch in FLT3ITD/D835Y-transformierten Ba/F3-Zellen

3.2.1 SU5614 hemmt das Wachstum FLT3ITD- und FLT3D835Y-transformierter Ba/F3-Zellen

Die durch FLT3-Mutationen transformierten Ba/F3-Zellen mit den FLT3-Konstrukten ITD-NPOS, ITD-W51 und D835Y wurden in An- bzw. Abwesenheit von 1 μM SU5614 für drei Tage inkubiert. Wie in Abbildung 3.3 und 3.4 ersichtlich, hemmte SU5614 das Wachstum aller FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen. Die inhibitorische Konzentration zur Reduktion auf 50 % des Wachstums der unbehandelten Kontrolle (IC_{50}) betrug 175 nM für FLT3ITD-NPOS- und 250 nM für FLT3D835Y-transformierte Zellen (Abbildung 3.3).

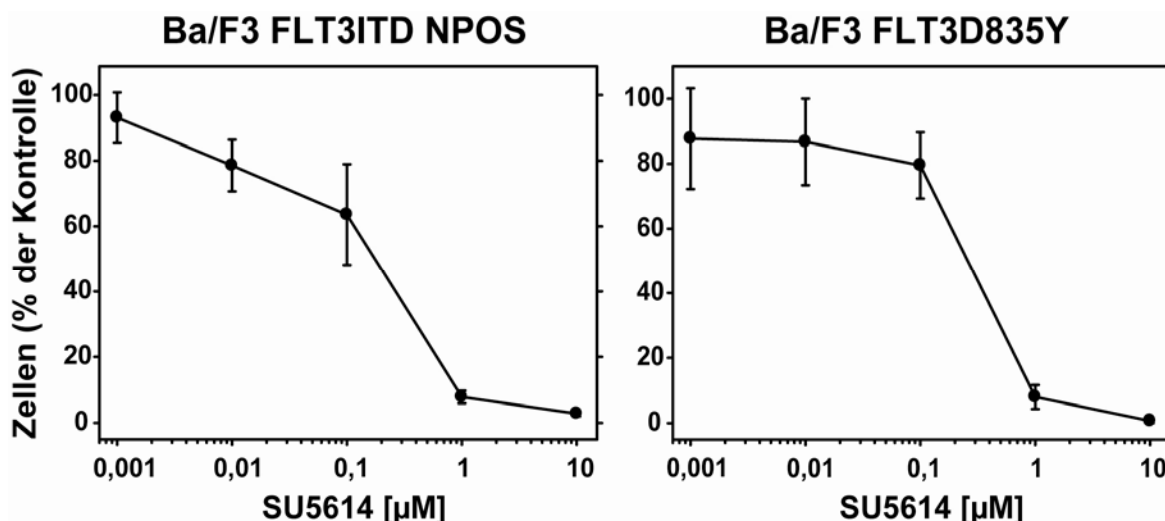


Abbildung 3.3: SU5614 induziert Wachstumsarrest in FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen. Dose-Response-Kurven der inhibitorischen Aktivität von SU5614 nach 72 h Inkubation. Das Wachstum unbehandelter Zellen wurde als 100 % definiert

Durch Zugabe von IL-3 konnte die wachstumshemmende Aktivität vollkommen aufgehoben werden. Ba/F3-Zellen, die durch die aktivierenden Tyrosinkinase TEL-ABL (Abbildung 3.4), TEL-JAK2 oder BCR-ABL (keine Abbildung) transformiert wurden, zeigten dagegen keine Empfindlichkeit gegenüber SU5614 in Konzentrationen bis zu 10 μM .

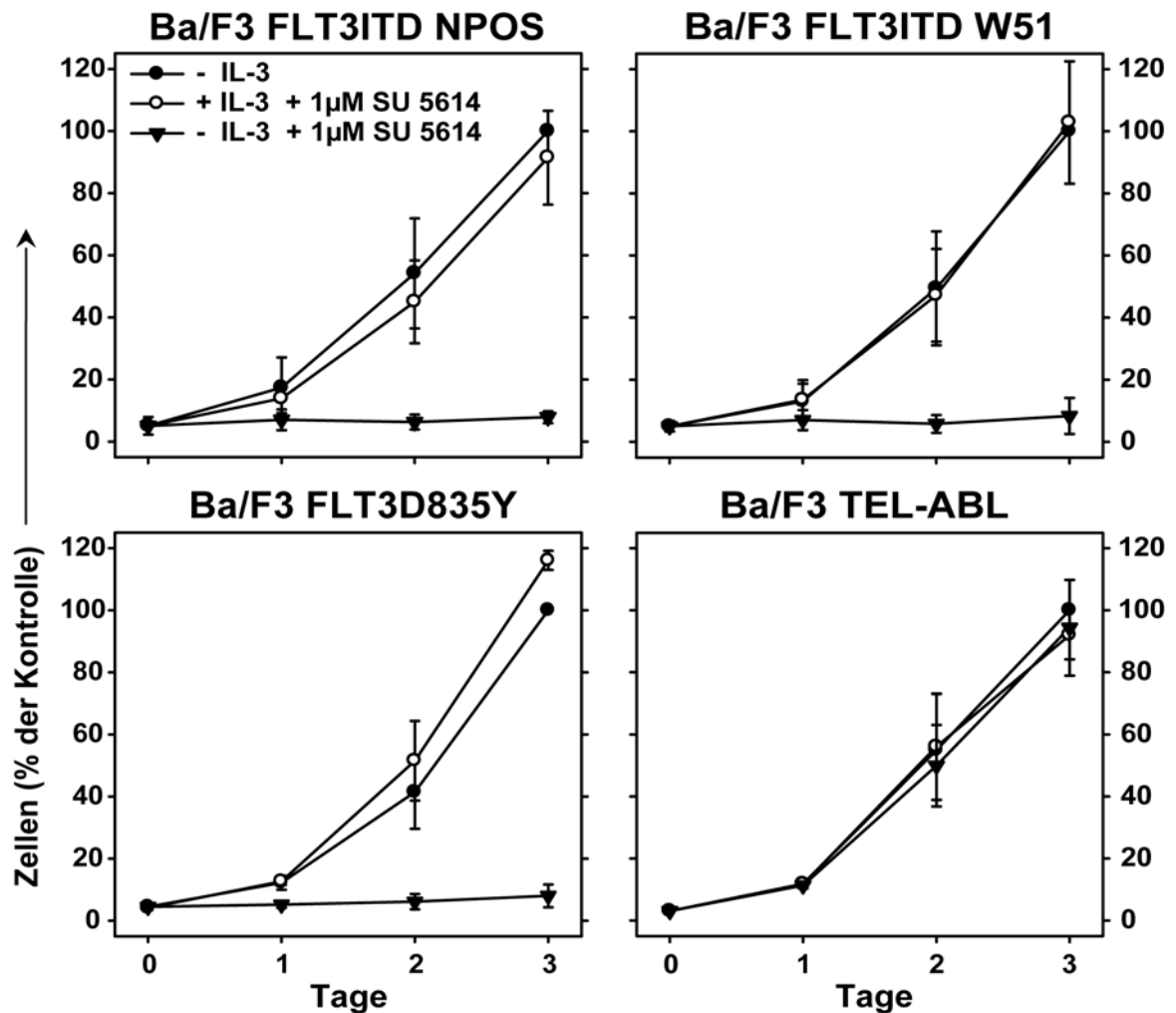


Abbildung 3.4: SU5614 hemmt selektiv FLT3-vermitteltes Wachstum. Durch FLT3 transformierte Ba/F3-Zellen sind selektiv empfindlich gegenüber SU5614, können aber durch IL-3-Zugabe gerettet werden und zeigen dann nicht einmal minimale Wachstumshemmung. TEL-ABL-transformierte Ba/F3-Zellen sind vollkommen unempfindlich gegenüber Behandlung mit SU5614.

3.2.2 SU5614 blockiert den Zellzyklus in G_1/G_0 und induziert Apoptose in FLT3-ITD-transformierten Ba/F3-Zellen

Zur Detektion von Apoptoseinduktion wurden mit SU5614 behandelte Zellen mit PE-konjugiertem Annexin-V und mit 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. In Abwesenheit von IL-3 bewirkte SU5614 in FLT3ITD-transformierten Ba/F3-Zellen rasch eine Auslösung des programmierten Zelltods (Abbildung 3.5). Die Agarose-Gelelektrophorese der DNA behandelter Zellen zeigte eine DNA-

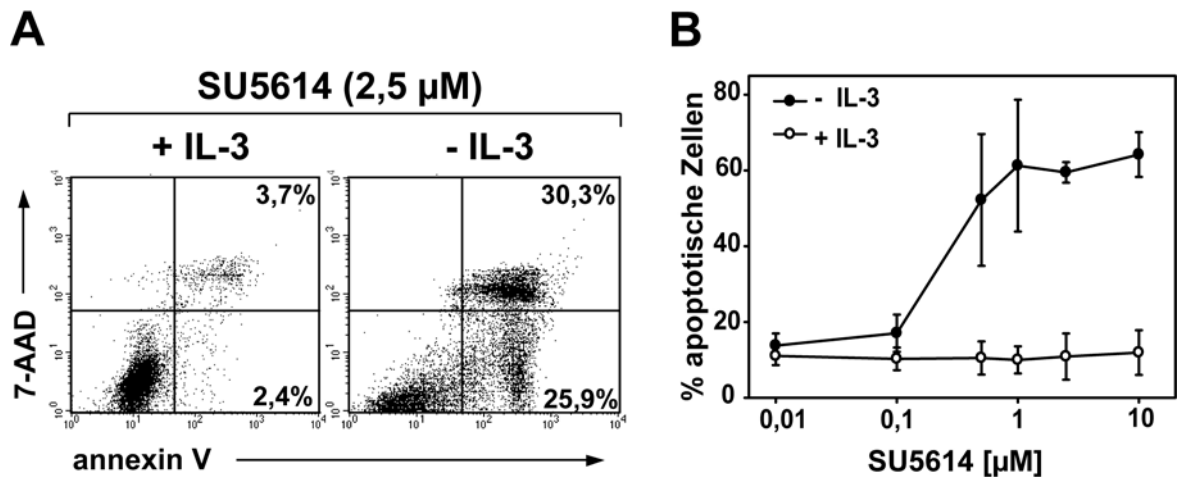


Abbildung 3.5: SU5614 induziert Apoptose in FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen. (A) Repräsentativer Dot-Plot der durchflusszytometrischen Messung einer Annexin-V-PE- und 7-AAD-Färbung nach vorausgegangener Behandlung mit SU5614 für 48 h. (B) Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit 48-stündiger Behandlung mit SU5614. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen.

Leiter im Sinne einer apoptotischen Fragmentierung des Erbmaterials (Abbildung 3.6). Nach Zugabe von IL-3 war SU5614 in Konzentrationen bis 10 μ M jedoch vollkommen wirkungslos (Abbildung 3.5 B).

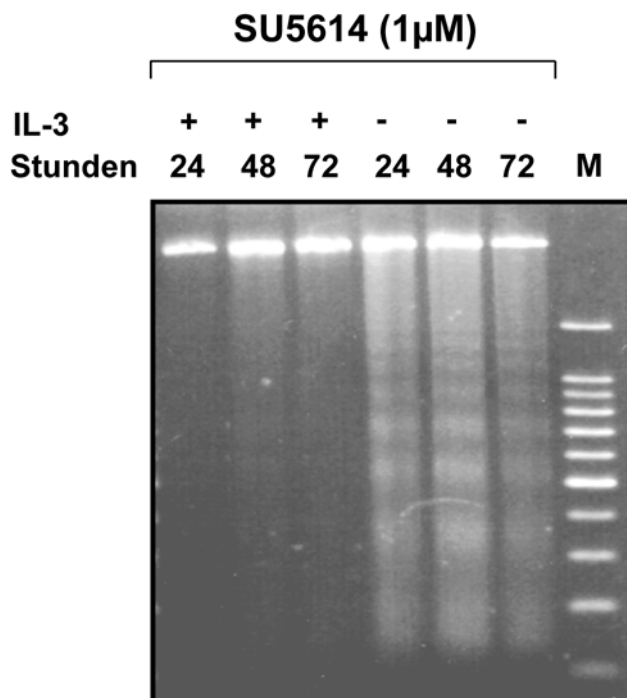


Abbildung 3.6: DNA-Fragmentierung als Folge SU5614-induzierter Apoptose in FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen. DNA-Gelelektrophorese von Ba/F3-FLT3-NPOS nach Behandlung mit 1 μ M SU5614 in An- bzw. Abwesenheit von 10 ng/ml IL-3. gDNA wurde auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert.

Durch Färbung der Zellkerne behandelter Zellen mit Propidiumjodid (PI) wurde der DNA-Gehalt und somit indirekt die Position der Zellen in den Stadien des Zellzyklus ermittelt. In Abwesenheit von IL-3 bewirkte SU5614 eine Zellzyklusarretierung in der G_1/G_0 -Phase. Der relative Anteil der Zellen in G_1/G_0 stieg durch Behandlung mit 2,5 μM SU5614 von 65,4 % \pm 0,8 % auf 79,9 % \pm 3,3 %. Der relative Anteil der Zellen in der S-Phase und G_2/M -Phase nahm entsprechend ab. (Abbildung 3.7) Darüber hinaus nahm der Anteil der Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt im Sinne nicht-vitaler Zellen zu, was die Ergebnisse der Apoptosemessungen bestätigt (nicht gezeigt).

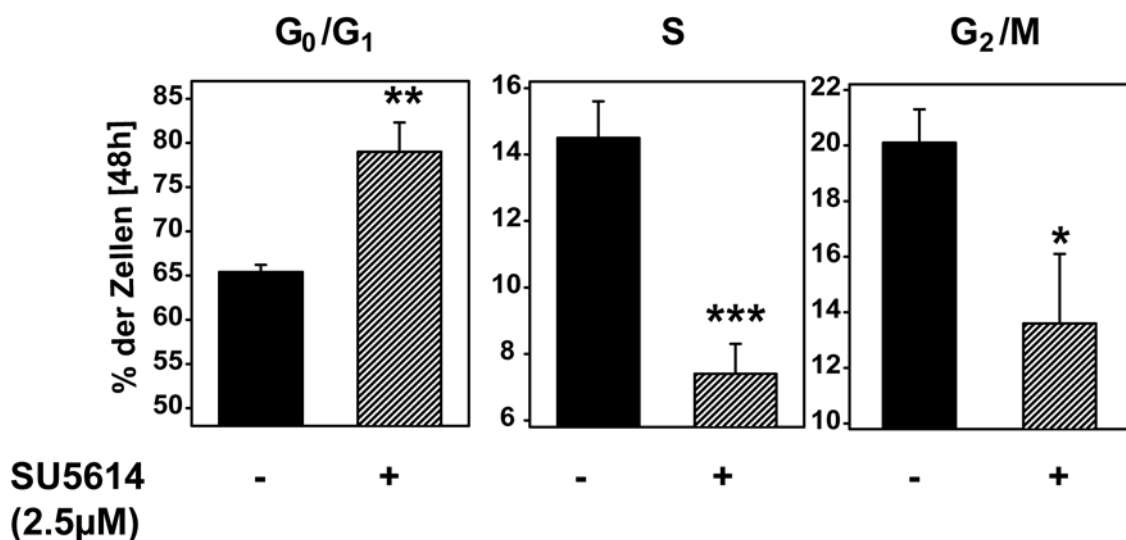


Abbildung 3.7: SU5614 induziert Zellzyklusarrest in FLT3ITD-NPOS-transformierten Ba/F3-Zellen. Ergebnisse der Zellzyklusanalysen mittels Propidiumjodid-Kernfärbung und DNA-Gehalt-Bestimmung. Abb. zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ nach dem t-Test für unverbundene Stichproben beim Vergleich der Anteile von behandelten und unbehandelten Zellen in den Zellzyklusphasen.

3.2.3 Mutiertes FLT3 und seine Downstream-Targets MAPK und STAT5 sind direkte Ziele von SU5614 in FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen

FLT3ITD- und FLT3D835Y-transformierte Ba/F3-Zellen wurden unterschiedlich lang mit verschiedenen Dosen SU5614 behandelt und anschließend lysiert. Als Maß der Aktivierung der untersuchten Proteine wurde ihre Phosphorylierung untersucht. Zur Ermittlung der Aktivität der FLT3-Mutanten wurde FLT3 aus diesen Lysaten mittels Immunpräzipitation (IP) mit einem Anti-FLT3-Antikörper angereichert. Im anschließenden Western-Blot mit einem Anti-Phosphotyrosin(PY)-Antikörper konnte gezeigt werden, dass SU5614 die

Hyperphosphorylierung von FLT3ITD (Abbildung 3.8 A) und FLT3D835Y (nicht gezeigt) stark und schnell hemmte. Die Aktivierung von den FLT3-Downstream-Targets ERK (*extracellular regulated kinase*, eine MAPK) und STAT5 wurde in Ganzzell-Lysaten untersucht, wobei phosphospezifische Antikörper für die Proteine zur Anwendung kamen. Bereits drei Stunden nach Behandlung mit SU5614 wurde die Phosphorylierung von MAPK und STAT5 deutlich herabreguliert (Abbildung 3.8 B und C). Die Aktivitätsminderung von FLT3, ERK und STAT5 folgte sowohl einer zeitlichen als auch dosisabhängigen Kinetik.

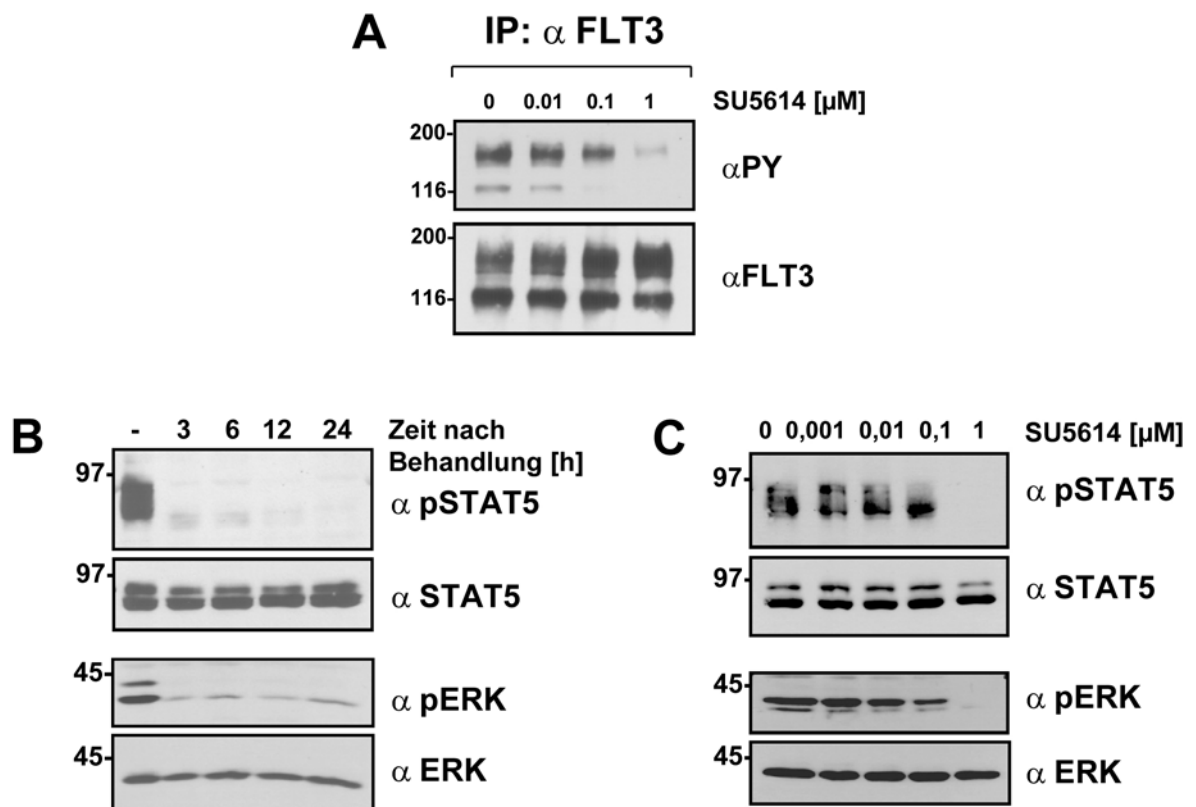


Abbildung 3.8: SU5614 hemmt die Phosphorylierung an Tyrosinresten von FLT3, STAT5 und MAPK in zeitlicher und dosisabhängiger Kinetik. (A) FLT3ITD-NPOS-transformierte Ba/F3-Zellen wurden 6 h mit SU5614 inkubiert und anschliessend lysiert. FLT3 in den Lysaten wurden mit FLT3-Ak-Immünpräzipitation (IP) angereichert und dem Western-Blot mit FLT3-Ak oder Phosphotyrosin(PY)-Ak zugeführt. (B) Ba/F3-FLT3ITD-NPOS-Zellen wurden mit 1 μ M SU5614 inkubiert und Lysate per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. (C) Western-Blot nach 6-stündiger Behandlung mit SU5614.

3.2.4 SU5614 bewirkt eine Herabregulation von BCL-X_L und p21

Um Zielgene zu identifizieren, die für Apoptose und Wachstumshemmung durch FLT3-Inhibition in FLT3-transformierten Zellen verantwortlich sein könnten, wurden in FLT3ITD-transformierten Ba/F3-Zellen zwei Proteine untersucht,

BCL-X_L und p21. Das Expressionslevel beider Proteine war in unbehandelten Zellen hoch. In Anwesenheit von 1 µM SU5614 wurden die beide Proteine herunterreguliert und waren nach 72 Stunden kaum noch nachweisbar (Abbildung 3.9). Die gleiche Beladung aller Spuren wurde durch Reblotting mit einem β-Actin-spezifischem Antikörper sichergestellt.

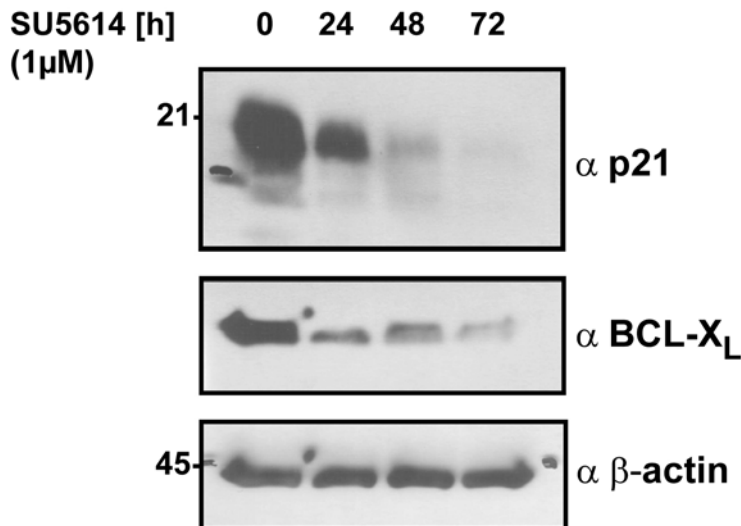


Abbildung 3.9: SU5614 führt dosisabhängig zur Herabregulation der STAT5-Zielgene BCL-X_L und p21 in FLT3ITD-NPOS-transformierten Ba/F3-Zellen. Zellen wurden mit 1 µM SU5614 behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Western-Blots wurden mit Ak gegen BCL-X_L, p21 und β-Aktin analysiert und dazwischen von Antikörper gereinigt.

3.3 SU5614 hemmt das Wachstum und induziert Apoptose in AML-Zelllinien mit FLT3-Mutationen

3.3.1 Die AML-Zelllinien MV4-11, MonoMac1 und MonoMac6 exprimieren mutierte, konstitutiv aktive FLT3-Rezeptoren

Um FLT3-positive AML-Zelllinien zu identifizieren, wurden zehn Zelllinien durchflusszytometrisch mit einem PE-konjugierten CD135-Antikörper gescreent (Abbildung 3.10; Zusammenfassung in Tabelle 3.1). Bei fünf dieser Linien konnte FLT3 auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Immunpräzipitation (IP) und Western-Blot mit FLT3-spezifischen Antikörpern bestätigten diese Ergebnisse.

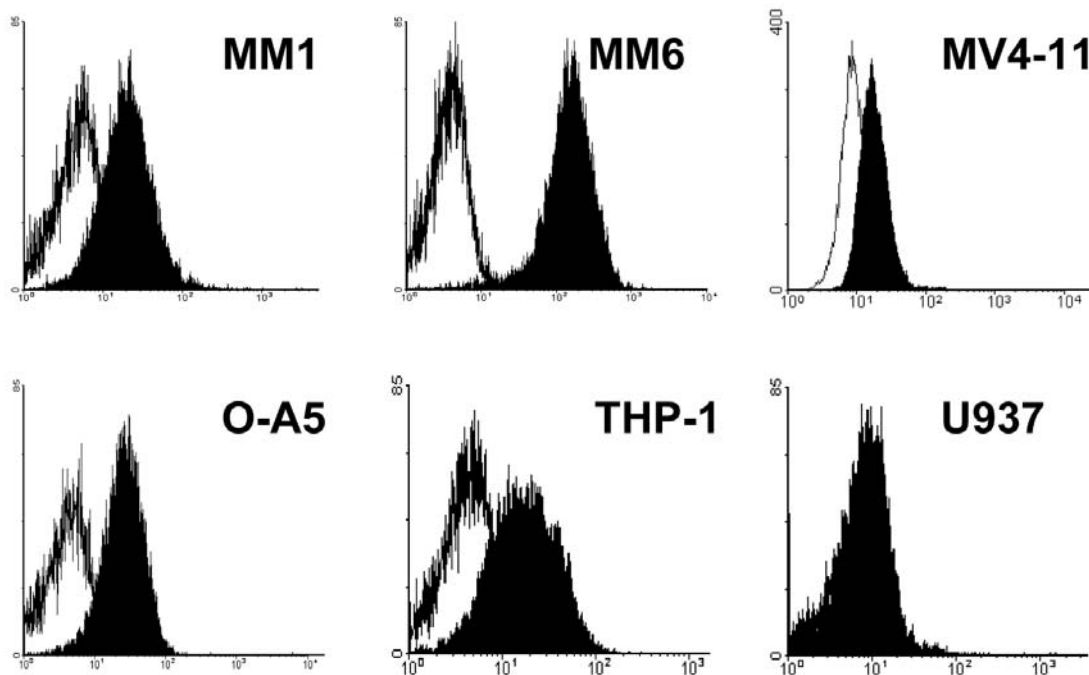


Abbildung 3.10: FLT3-Expression in AML-Zelllinien. Durchflusszytometrische Messung. Leere Histogramme entsprechen dem Isotyp-Antikörper, schwarze Histogramme der mit CD135-Ak gemessenen Fluoreszenz.

In MV4-11-Zellen konnte durch Sequenzierung von Exon 17 eine FLT3ITD-Mutation identifiziert werden. Es handelt sich 30bp-umfassende Längenmutation, welche zu einer Verdopplung und Insertion von zehn Aminosäuren zwischen Codon 591 und 592 führt (VDFREYEYDH). Zusätzlich konnte durch Amplifikation des Exon 17 und anschließende Agarose-Gelelektrophorese in diesen Zellen der Verlust des Wildtypallels nachgewiesen werden.

Um die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von FLT3 in den anderen FLT3-positiven Zelllinien zu überprüfen, wurden FLT3-IPs mit PY-Antikörpern geblottet. In Abwesenheit von FL konnte in zwei Zelllinien eine eindeutige Phosphorylierung von FLT3 nachgewiesen werden (MonoMac1 und MonoMac6). In Anwesenheit von FL konnte diese Aktivität noch weiter gesteigert werden. In den zwei Zelllinien mit unphosphoryliertem FLT3 bewirkte die Stimulation mit FL eine starke Aktivierung im Sinne eines intakten FLT3-Proteins (Abbildung 3.11).

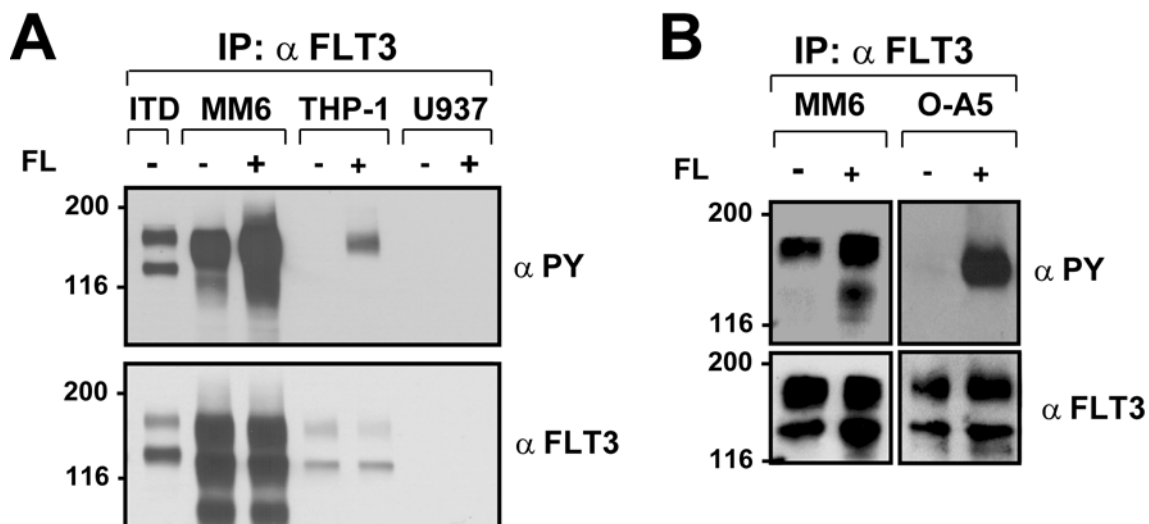


Abbildung 3.11: FLT3-Expression und FLT3-Aktivierung in AML-Zelllinien. Phosphotyrosin-Western-Blots nach FLT3-IP aus Zellen mit (+) und ohne (-) FL-Stimulation. Die Blots wurden anschließend gestriipt und mit FLT3-Ak analysiert. In (A) sind Ba/F3-Zellen mit FLT3ITD-Mutation als Positivkontrolle abgebildet.

Um die Ursache für die konstitutive Aktivierung von FLT3 in MonoMac1 (MM1) und MonoMac6 (MM6) zu klären, wurde die komplette FLT3-cDNA aus diesen Zelllinien sequenziert. Beide Zelllinien (beide wurden aus Zellen des gleichen Patienten isoliert) tragen die gleiche Mutation. Es handelt sich um eine bisher nicht vorgeschriebene Punktmutation in der JM-Region, einer Substitution von Valin592 durch Alanin (FLT3V592A).

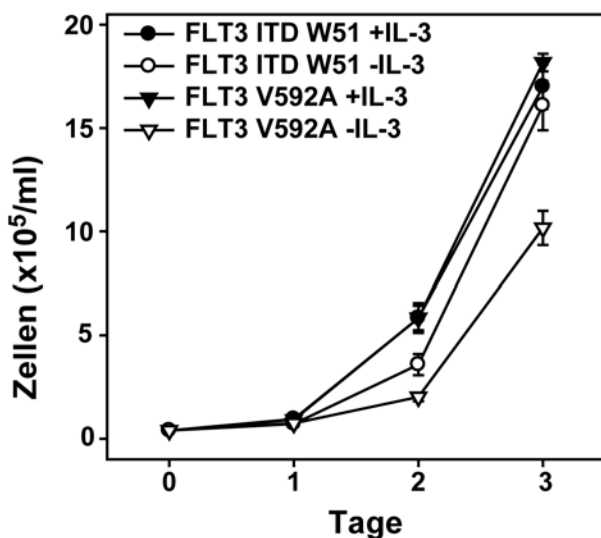


Abbildung 3.12: In MM1- und MM6-Zellen exprimiertes FLT3V592A-Protein induziert Faktorunabhängigkeit in Ba/F3-Zellen. Ba/F3-Zellen mit stabiler FLT3ITD- und FLT3V592A-Expression wurden in An- und Abwesenheit von IL-3 (10 ng/ml) kultiviert. Die Abbildung zeigt eines von drei repräsentativen unabhängigen Experimenten.

Überexpression dieser FLT3-Mutante in Ba/F3-Zellen führte zu faktorunabhängigem Wachstum dieser Zellen, wenn auch etwas langsameren Wachstumsraten, als sie in FLT3ITD-transformierten Ba/F3 beobachtet werden (Abb. 3.12).

Tabelle 3.1: SU5614-Sensitivität und FLT3-Status verschiedener AML-Zelllinien

Zelllinie	FLT3 (FACS)	FLT3 (IP-WB)	FLT3-PY (IP-WB)	FLT3- Mutation	SU5614 IC ₅₀ [µM]
MM6	+++	+++	+++	+	0,45
MM1	+++	+++	+	+	0,6
MV4-11	+	+	–	+	0,3
THP-1	++	+	–	–	> 10
OA5	++	++	–	–	> 10
HL60	–	NB	–	–	> 10
PLB985	–	NB	–	–	> 10
K562	–	NB	–	–	> 10
NB4	–	–	–	–	> 10
U937	–	–	–	–	> 10

Die FLT3-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie und IP und WB bestimmt. Die Ergebnisse wurden anhand der Fluoreszenz- bzw. Signalintensität quantifiziert in – (abwesend), + (schwach), ++ (intermediär) und +++ (stark). FLT3-Mutation zeigt – (abwesend) oder + (anwesend). IC₅₀ ist die Konzentration, die nach 72 Stunden 50 % des Wachstums hemmt, ermittelt durch Zählung nach Trypanblaufärbung. Die Sensitivität einiger der abgebildeten Zelllinien gegenüber SU5614 wurde bereits von Mitgliedern unserer Gruppe im Rahmen einer anderen Arbeit demonstriert.⁴⁵ NB, nicht bestimmt.

3.3.2 SU5614 hemmt selektiv das Wachstum der AML-Zelllinien MV4-11, MonoMac1 und MonoMac6

Die zehn auf FLT3-Expression gescreenten AML-Zelllinien wurden auf ihre Sensitivität gegenüber SU5614 untersucht. Dazu wurden alle Zellen für 72 Stunden mit Inhibitorkonzentrationen von 0,001 µM bis 10 µM inkubiert. Die Zelllinien mit nicht aktiviertem FLT3-Protein (THP-1, OCI-AML5) und die ohne FLT3-Expression (NB4, U937, K562, HL60, PLB985) waren völlig unempfindlich gegenüber SU5614 und zeigten keine Wachstumsbeeinträchtigung. Im Gegensatz dazu waren die drei Zelllinien mit mutiertem FLT3-Rezeptor, MM1, MM6 und MV4-11 sensitiv gegenüber SU5614 und ihr Wachstum war komplett hemmbar. Die IC₅₀ betrug dabei 300 bis 600 nM in den verschiedenen Zelllinien (Abbildung

3.13; Tabelle 3.1).

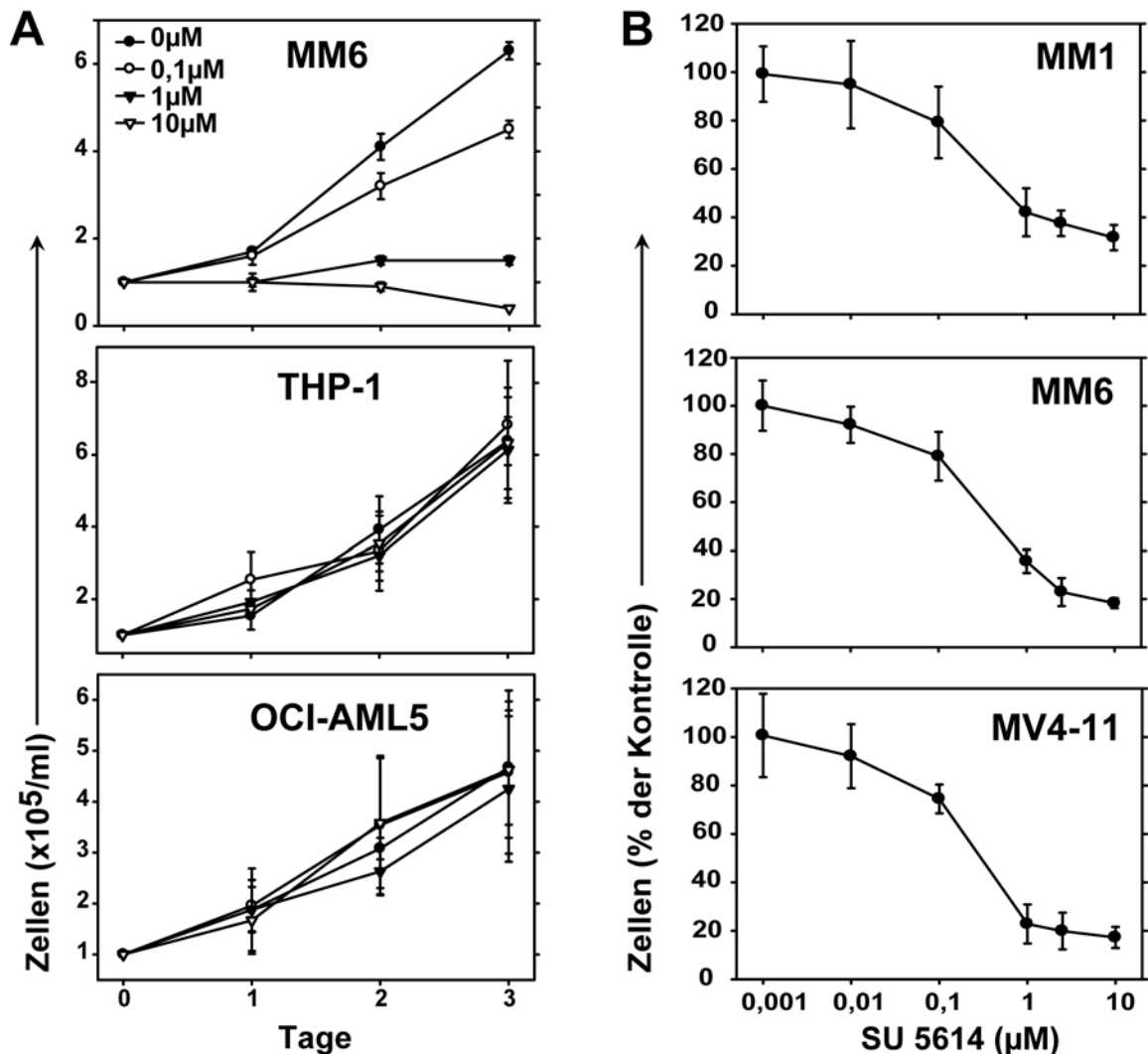


Abbildung 3.13: SU5614 hemmt selektiv die Proliferation von AML-Zelllinien mit konstitutiv aktivem FLT3-Rezeptor. MM6 zeigt ein repräsentatives von drei Ergebnissen. Alle anderen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Experimenten. Die in (A) abgebildeten Daten wurden im Rahmen einer vorangegangenen Untersuchung ermittelt und freundlicherweise von Dr. F. Faber zur Verfügung gestellt.⁴⁵ (B) zeigt die Dose-Response-Kurven nach 72 h. 100 % wurde als Wachstum der unbehandelten Kontrolle definiert.

Um die IC_{50} von SU5614 in der FLT3ITD-positiven Zelllinie MV4-11 genauer zu untersuchen wurden die Zellen im empfindlichen Dosisbereich mit 17 verschiedenen, eng gestuften Inhibitorkonzentrationen behandelt und mittels MTT-Assay ausgewertet. Dabei ergab sich eine IC_{50} von 150 nM (Abbildung 3.14).

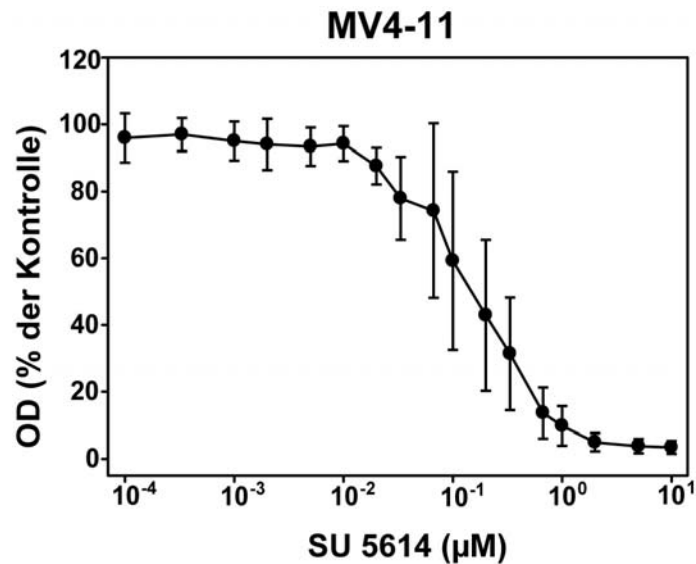


Abbildung 3.14: SU5614 Dose-Response-Kurve von MV4-11-Zellen gemessen im MTT-Assay. MTT-Färbung wurde 84 h nach Beginn der Inkubation begonnen, vgl. Kapitel 2.3.3.

3.3.3 MM1-, MM6- und MV4-11-Zellen sind nicht empfindlich gegenüber Imatinib und SU1498

Um die Beteiligung weiterer Tyrosinkinase auszuschließen, wurden empfindliche Zelllinien mit den PTK-Hemmstoffen Imatinib (STI571, Gleevec®) und SU1498 behandelt. Beide Substanzen haben keine Aktivität gegenüber FLT3, inhibieren aber die Kinasen PDGFR, KIT, ABL, ARG^{46, 47} und VEGFR-2^{48, 49}. Wie aus Abbildung 3.15 ersichtlich, hatten weder Imatinib noch SU1498 vergleichbare inhibitorische Aktivität wie SU5614 in den Zelllinien MM6 oder MV4-11. Gleiches galt für FLT3ITD-transformierte Ba/F3-Zellen (keine Abbildung).

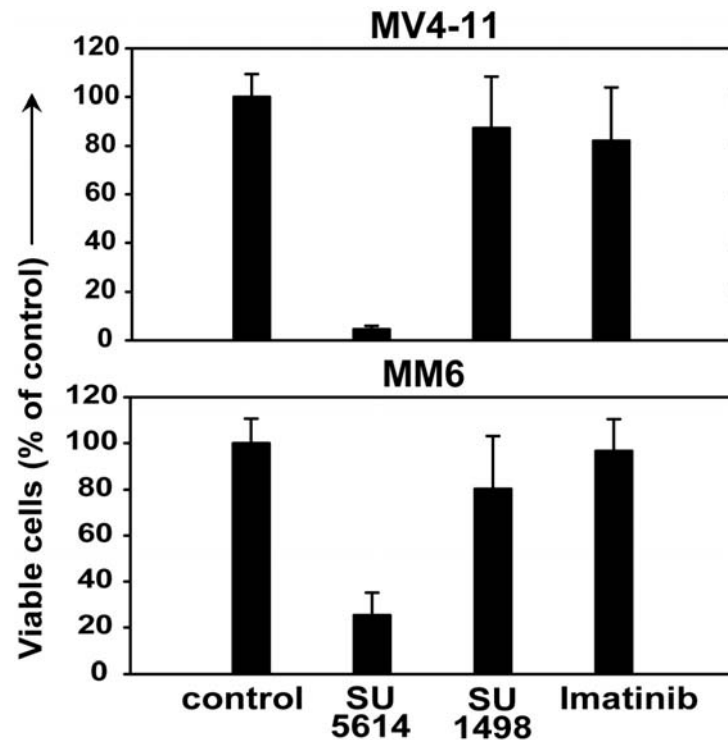


Abbildung 3.15: Aktivität von SU5614, SU1498 und Imatinib gegenüber MV4-11- und MM6-Zellen. Die Balkengraphik zeigt das Wachstum nach 72 h Inkubation mit je 5 μM der Inhibitoren. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente

3.3.4 SU5614 führt zu Zellzyklusarrest und Apoptose in MM1, MM6 und MV4-11-Zellen

MM1-, MM6- und MV4-11-Zellen wurden 48 Stunden lang mit 5 μM SU5614 inkubiert. Mittels PI-Färbung bzw. Annexin-V/7-AAD-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie konnte in behandelten Zellen die Induktion des programmierten Zelltodes nachgewiesen werden. Abbildung 3.16 A und B zeigen zwei typische Experimente. Die Gesamtzahl aller apoptotischen Zellen gemessen mit Annexin V/7-AAD-Färbung (d.h. Summe aus frühapoptotischen [Annexin V-positiv/7-AAD-negativ] und spätapoptotischen [doppelt positiven] Zellen) betrug in allen drei Zelllinien zwischen 90 und 98 % (vgl. Abbildung 3.16 C).

Analog zu den Ergebnissen mit durch mutiertes FLT3 transformierten Ba/F3-Zellen war die Apoptoseinduktion auch in MM1-, MM6- und MV4-11-Zellen von einer Arretierung des Zellzyklus begleitet. Behandlung mit SU5614 führte auch hier zu einer Zunahme der Zellen in der G_1/G_0 -Phase und signifikanter Abnahme der Zellen in der S-Phase und G_2/M -Phase (keine Abbildung).

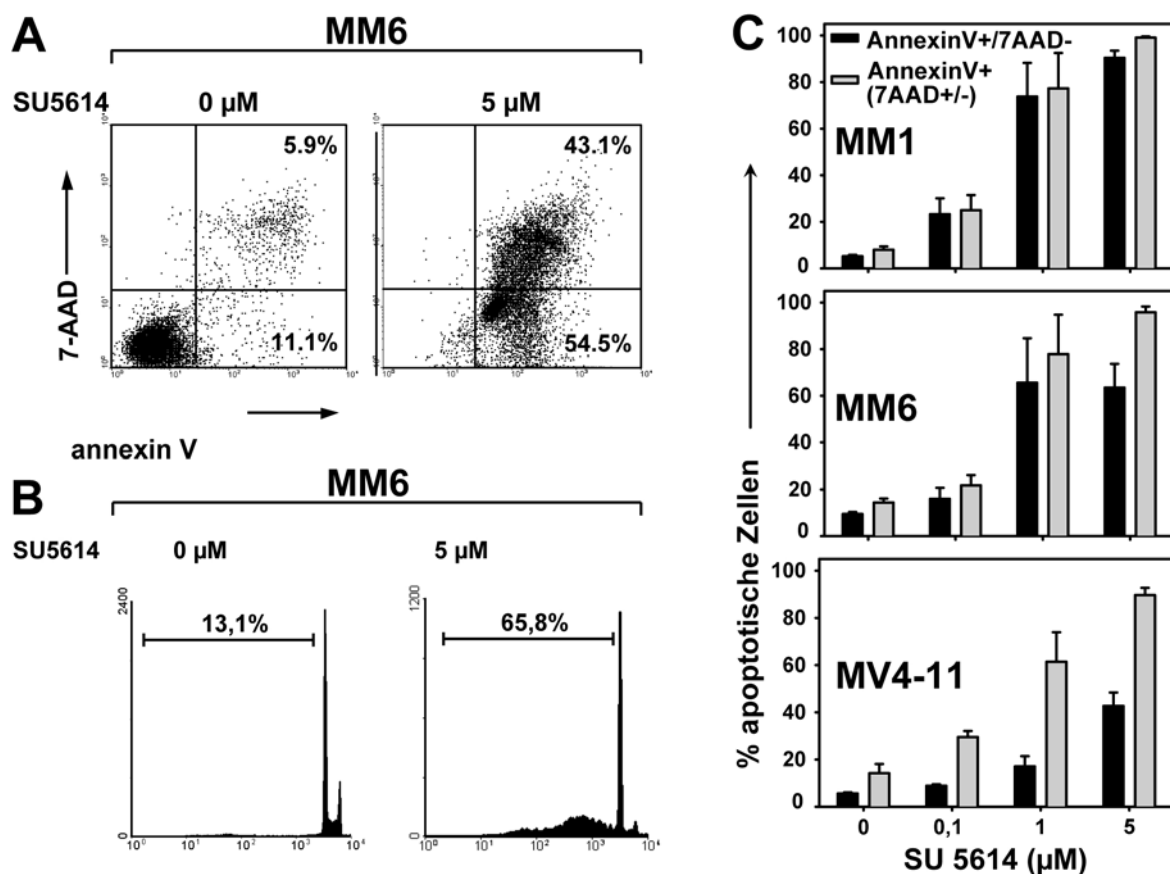


Abbildung 3.16: FLT3-Inhibition durch SU5614 induziert Apoptose in AML-Zelllinien mit konstitutiv aktivem FLT3-Protein. (A) Durchflusszytometrie Annexin-V-/7-AAD-gefärbter MM6-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit 5 µM SU5614. Gezeigt ist ein repräsentativer Dot-Plot aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Durchflusszytometrische Analyse der wie in (A) behandelten Zellen nach PI-Färbung. Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt sind apoptotisch. 1 von 3 Experimenten ist gezeigt. (C) Dose-Response-Kinetik aus wie in (A) durchgeführten Experimenten. Schwarze Balken repräsentieren frühapoptotische und graue Balken die Summe aus früh- und spätapoptotischen Zellen. Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.5 Die Aktivität von MAPK, STAT3 und STAT5 wird in der AML-Zelllinie MM6 durch FLT3-Inhibition herabreguliert

Wie in Abbildung 3.17 A ersichtlich, wurde die starke konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors in MM6-Zellen schon nach drei Stunden komplett durch SU5614 aufgehoben. Densitometrische Auswertung verschiedener Western-Blots ergab hier eine IC_{50} von 150 nM.

Des Weiteren konnte – analog zu den Ergebnissen mit den konstruierten FLT3-Ba/F3-Zellmodellen – in der leukämischen Zelllinie MM6 konstitutive Aktivierung von STAT3, STAT5 und MAPK gezeigt werden. Exposition der Zellen gegenüber SU5614 in Konzentrationen von 0,1 bis 5 µM führte zu dosisabhängigem Aktivitätsverlust von STAT3, STAT5 (Abbildung 3.17 B) und MAPK (nicht gezeigt).

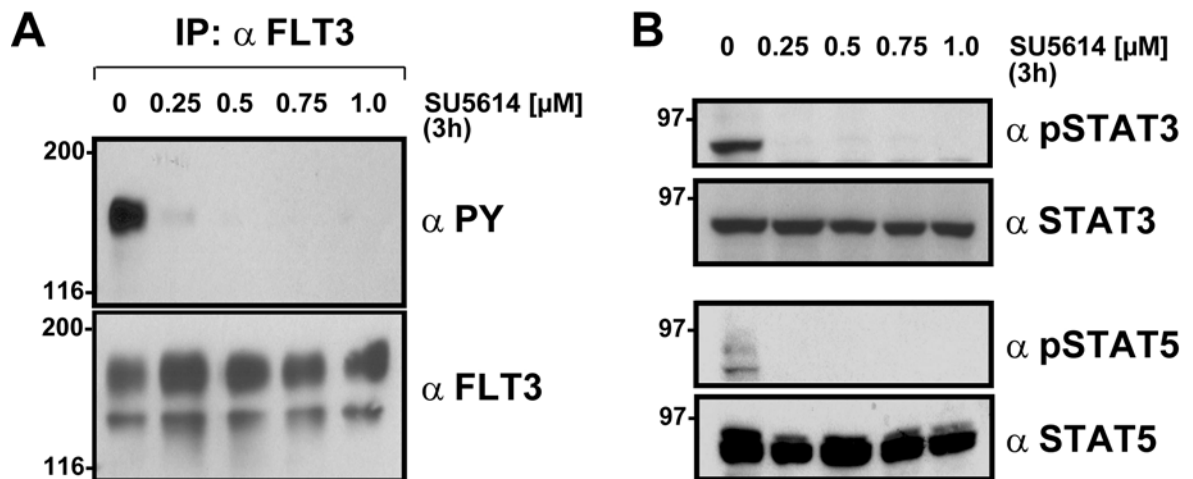


Abbildung 3.17: SU5614 hemmt die Tyrosinphosphorylierung von FLT3, STAT3 und STAT5 in MM6-Zellen. (A) MM6 Zellen wurden 3 h mit SU5614 inkubiert und lysiert. Nach FLT3-IP wurde die Phosphorylierung mittel PY-Ak im Western-Blot untersucht. Blots wurden gestrippt und mit FLT3-Ak geblottet. (B) MM6-Zellen wurden behandelt wie in (A). Lysate wurden im Western-Blot mittels STAT-Ak und phosphospezifischen STAT-Ak untersucht.

3.4 SU5614 hemmt Wildtyp-FLT3 in der AML-Zelllinie OCI-AML5

3.4.1 SU5614 antagonisiert FL-stimuliertes Wachstum in OCI-AML5-Zellen

Die FLT3-WT-exprimierende AML-Zelllinie OCI-AML5 wurde unter verschiedenen Kulturbedingungen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber SU5614 getestet. Unter normalen Kulturbedingungen mit 10 % FBS blieb das Zellwachstum unbeeinflusst durch SU5614 in Konzentrationen von bis zu 10 μ M (Tabelle 3.1; Abbildung 3.18 B). Unter serumfreien Bedingungen gingen die Zellen rasch an Apoptose zugrunde. Unter Zusatz von FL in einer Konzentration von 100 ng/ml wurde unter serumfreien Bedingungen jedoch die Viabilitätsrate signifikant erhöht, und es zeigte sich eine minimale Wachstumstendenz im Verlauf von vier Tagen. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit 5 μ M SU5614 konnte dieser antiapoptotische und proliferative Effekt von FL komplett aufgehoben werden (Abbildung 3.18 A).

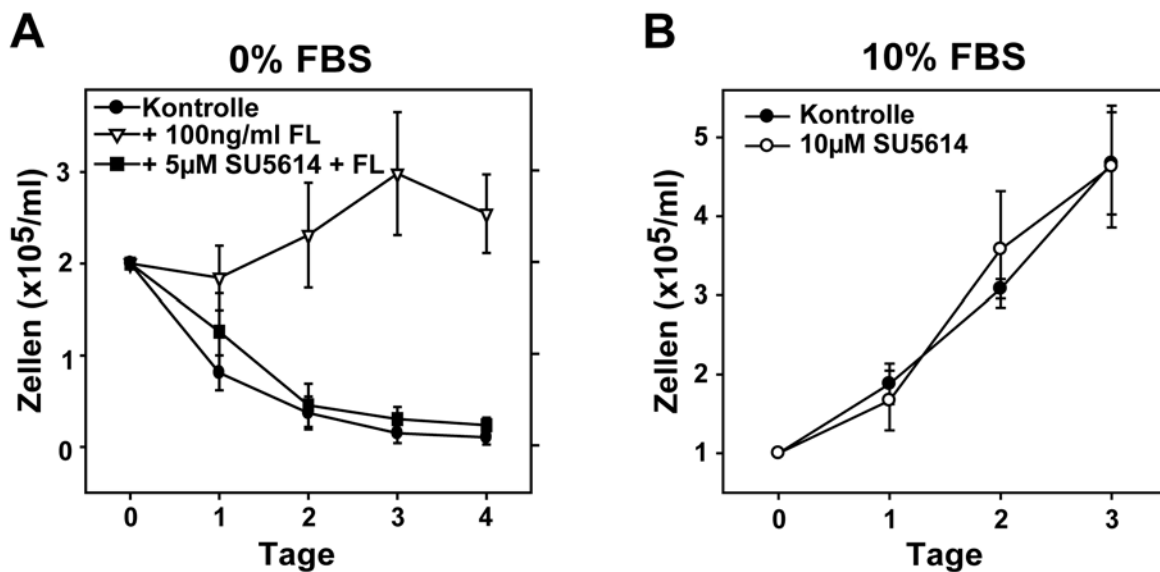


Abbildung 3.18: SU5614 hebt FL-vermittelte Effekte in OCI-AML5-Zellen unter serumfreien Wachstumsbedingungen auf. (A) Nach 16 h Kultivierung in Hungermedium (0,25 % fötales Kälberserum; FBS) und anschließender Kultur ohne FBS ist das Wachstum von OCI-AML5-Zellen mit FL stimulierbar. SU5614 hemmt diese Wirkung durch Inhibition von FLT3-WT. (B) Unter normalen Serumbedingungen haben weder FL noch SU5614 einen Effekt auf OCI-AML5-Zellen.

3.4.2 SU5614 hemmt FL-stimulierte FLT3-Phosphorylierung

Um das biochemische Korrelat dieser Effekte zu demonstrieren, wurden serumgehungerte OCI-AML5-Zellen mit FL stimuliert. Mittels FLT3-IP und Western-Blot konnte nach Stimulation mit FL eine starke Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors gezeigt werden, die durch Behandlung mit 1 µM SU5614 komplett unterbunden wurde (Abbildung 3.19).

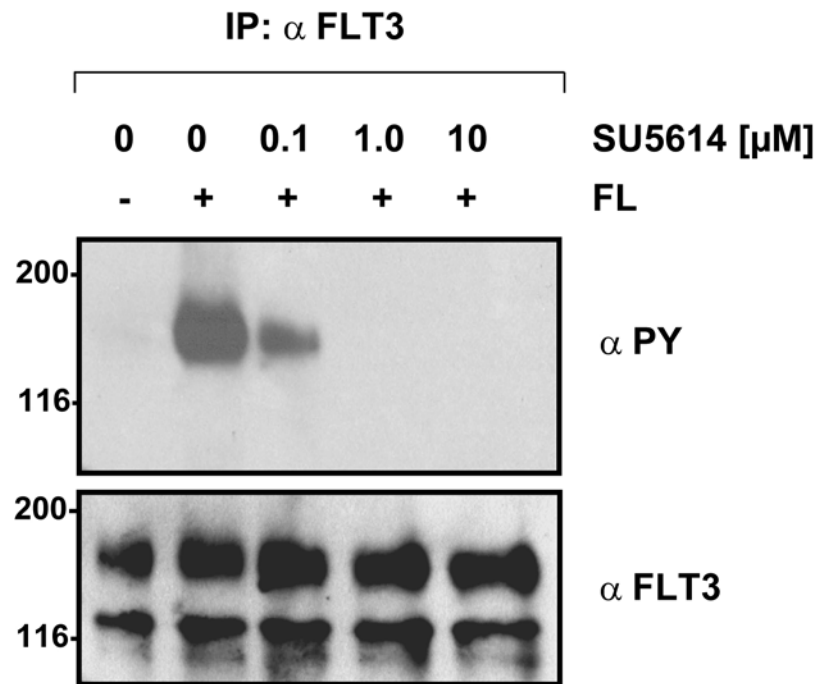


Abbildung 3.19: SU5614 hemmt die FL-stimulierte FLT3-Aktivierung unter Hungerbedingungen. Nach 16-stündigem Hungern mit 0,3 % FBS wurden die Zellen mit SU5614 inkubiert, wenn angegeben. Nach fünfminütiger FL-Stimulation wurden sie lysiert. Lysate wurden mit FLT3-Ak immunpräzipitiert und die Tyrosinphosphorylierung im Western-Blot untersucht.

4 Diskussion

Das *FLT3*-Gen ist eines der am häufigsten mutierten bekannten Gene bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.¹³ Abhängig von der Art der Mutation haben die meisten dieser Patienten eine tendenziell schlechtere Prognose als AML-Patienten ohne FLT-3-Mutationen.^{16, 17, 38, 42} Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte von verschiedenen Gruppen das proliferative Potenzial von FLT3-Mutationen demonstriert werden. Auf dieser Erkenntnis basierend wurde hier im präklinischen Modellsystem untersucht, ob FLT3 als molekulares Ziel zukünftiger Therapieansätze geeignet sein könnte.

4.1 **SU5614 hemmt die Aktivität der Rezeptortyrosinkinase FLT3**

4.1.1 *Das Ba/F3-FLT3ITD/D835Y-Zellmodell*

Um FLT3-Mutationen in einem Zellmodell untersuchen zu können, wurden zu Beginn der Arbeit Ba/F3-Zelllinien generiert, die FLT3-LM und FLT3-TKD-Mutationen exprimieren. Die Eigenschaften solcher Zelllinien wurden schon zuvor beschrieben und konnten hier bestätigt werden.²⁰⁻²² Alle untersuchten FLT3-Mutationen besaßen konstitutive Tyrosinkinaseaktivität und verliehen Ba/F3-Zellen IL-3-Unabhängigkeit. Der Selektionsvorteil der transformierten Zellen in IL-3-freiem Medium erwies sich als ebenso einfache wie effiziente Methode der Anreicherung erfolgreich transduzierter Zellen.

Dieses Zellmodell ermöglichte die genaue Untersuchung der Funktion und Signaltransduktion von FLT3-Mutationen. Darüber hinaus war es gut geeignet, FLT3-Inhibitoren zu identifizieren.

4.1.2 *Auswahl des Inhibitors*

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifikation eines wirksamen FLT3-Inhibitors. Es ist eine Vielzahl kleinmolekularer PTK-Hemmstoffe zu wissenschaftlichen Zwecken erhältlich. Die erfolgversprechende, aber aufwändige Methode eines breit angelegten Screenings nach Substanzen mit FLT3-inhibitorischer Aktivität stand nicht zur Verfügung. Wegen der strukturellen Verwandtschaft der RTKs innerhalb der Klasse III war aber die Vorstellung nahe liegend, dass es unter bekannten

Inhibitoren gegen RTKs dieser Klasse auch Substanzen mit Aktivität gegenüber FLT3 gibt. Levis et al. zeigten, dass der PTK-Hemmstoff AG1295 aus der Gruppe der Tyrphostine Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion in FLT3-ITD-positiven AML-Blasten in deutlich größerem Ausmaß bewirkt als in FLT3-ITD-negativen AML-Blasten. Darüber hinaus konnte auf biochemischer Ebene die dosisabhängige Dephosphorylierung von FLT3-ITD durch AG1295 demonstriert werden.²⁸ Für die eng verwandte Substanz AG1296 konnte eine andere Gruppe FLT3-inhibitorische Aktivität nachweisen.²⁴ Allerdings zeigte der Inhibitor AG1295 in der Arbeit von Levis et. al. ab einer Konzentration von 5 µM unspezifische Wirkungen, und selbst bei dieser Maximaldosis waren die Effekte nur schwach, was auf eine niedrige Selektivität des Inhibitors für FLT3-ITD hinweist.

Das Indolinonderivat SU5614 ist als kleinmolekularer PTK-Inhibitor mit Aktivität gegenüber PDGFRβ (platelet derived growth factor receptor β) und Rezeptoren für VEGF (vascular endothelial derived growth factor) erhältlich. Mitglieder unserer Arbeitsgruppe und andere konnten demonstrieren, dass dieser PTK-Inhibitor neben VEGFR-2 (KDR) auch die Rezeptortyrosinkinase KIT inhibiert. Bei KIT-exprimierenden AML-Zelllinien bewirkte er eine Hemmung des Wachstums sowie Induktion von Apoptose.^{45, 50}

Auf der Basis dieser Ergebnisse entstand die Hypothese, dass SU5614 ein Hemmstoff von FLT3 sein könnte. Sie wurde an FLT3ITD/D835Y-transformierten Ba/F3-Zellen überprüft.

4.1.3 Selektive Zytotoxizität von SU5614 in FLT3ITD/D835Y-transformierten Ba/F3-Zellen

FLT3ITD/D835Y-transformierte Ba/F3-Zellen gingen durch Behandlung mit SU5614 zugrunde. Dabei konnten in den Zellen dosisabhängig Wachstumsstopp, Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. All diese zytotoxischen Effekte waren durch Zugabe von IL-3 komplett antagonisierbar. Das Außergewöhnliche daran ist weniger die Toxizität von SU5614 – mit jeder in irgendeiner Form zytotoxischen Substanz wäre das möglich – als vielmehr die komplette Antagonisierbarkeit der Toxizität durch IL-3. Aus dieser Antagonisierbarkeit durch IL-3 lässt sich folgern, dass SU5614 an keinem Punkt in das IL-3-vermittelte Wachstum von Ba/F3-Zellen eingreift, sondern vielmehr in diesem Modell vollkommen „spezifisch“ für die FLT3-vermittelten Effekte ist. Mit

anderen Worten, SU5614 versetzt FLT3-transformierte Zellen wieder zurück in den Zustand der IL-3-Abhängigkeit.

Ba/F3-Zellen werden auch durch die konstitutiv aktiven Tyrosinkinasen der leukämischen Fusionsproteine TEL-ABL, TEL-JAK2 und BCR-ABL zur IL-3-Unabhängigkeit transformiert. In derartig transformierten Ba/F3-Zellen hatte SU5614 jedoch keine Wirkung, was die Selektivität für mutiertes FLT3 unterstreicht.

4.1.4 SU5614 antagonisiert FLT3-WT-vermittelte Effekte

In der AML-Zelllinie OCI-AML5 konnte die Expression von FLT3 nachgewiesen werden. Dieses FLT3 zeigte keine Hyperphosphorylierung und OCI-AML5-Zellen waren unter normalen Kulturbedingungen (10 % FBS) vollkommen unempfindlich gegenüber SU5614. Wissenschaftler der DSMZ in Braunschweig hatten die FLT3-Expression auf diesen Zellen schon zuvor demonstriert und konnten darüber hinaus zeigen, dass Stimulation mit FL OCI-AML5 in serumfreier Kultur vor Apoptose schützt und zu einem geringen Grad proliferieren lässt.⁵¹⁻⁵³ Dieses Modell wurde verwendet, um die Aktivität von SU5614 gegenüber FLT3-WT zu demonstrieren. Der Inhibitor hob alle FL-vermittelten Wirkungen auf, sodass die Zellen rasch zugrunde gingen.

4.1.5 SU5614 dephosphoryliert FLT3 und dessen Downstream-Targets

Letztlich konnte in allen verwendeten Modellen auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass SU5614 zur schnellen Dephosphorylierung von mutiertem FLT3 bzw. FL-stimuliertem Wildtyp-FLT3 führt. In Zellen mit mutiertem FLT3 wurde zusätzlich die in Zeitverlauf und Amplitude parallel verlaufende Dephosphorylierung der Downstream-Targets STAT5 und MAPK gezeigt.

Auch wenn ein direkter Nachweis der Interaktion zwischen SU5614 und FLT3 nur mit aufwändigen Verfahren möglich ist, die hier nicht zur Verfügung standen, kann aus den hier demonstrierten zellbiologischen und biochemischen Daten gefolgert werden, dass das Indolinonderivat SU5614 ein potenter Inhibitor der Rezeptortyrosinkinase FLT3 ist.

Zusammenfassend sprechen folgende Befunde für diese Hypothese:

1. Spezifische Zytotoxizität von SU5614 bei FLT3-vermittelter Proliferation in FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen und fehlende Zytotoxizität bei IL-3-vermittelter Proliferation in den gleichen Zellen.
2. Selektive Zytotoxizität von SU5614 für FLT3ITD/D835Y-transformierte Ba/F3-Zellen und fehlende Zytotoxizität in durch andere PTKs transformierten Ba/F3-Zellen.
3. Antagonisierung FL-vermittelter Effekte durch SU5614 in einer AML-Zelllinie mit endogener FLT3-WT-Expression.
4. Nachweis der Hemmung der Aktivierung von FLT3 und dessen Downstream-Targets durch SU5614 auf biochemischer Ebene.

Tabelle 4.1 bietet einen Überblick über die inhibitorische Aktivität von SU5614 gegenüber FLT3ITD und gegenüber anderen Tyrosinkinase.

Tabelle 4.1: Aktivität von SU5614 gegenüber verschiedenen Proteintyrosinkinasen

PTK	IC ₅₀ [μM]	
	Kinase-Assay	Biologischer Assay
FLT3	NB	0,17
KIT	0,03	0,2
VEGFR-2/VEGF	0,46	0,07
PDGFRβ/PDGF	0,36	0,5
FMS	13	NB
EGFR/EGF	> 100	>100
FGFR-1/FGF	> 100	> 50
TEL-ABL / BCR-ABL	NB	> 10
TEL-JAK2	NB	> 10

Bei FLT3, TEL-ABL und TEL-JAK2 ist IC₅₀ die Konzentration von SU5614, die 50 % des Wachstums transformierter Ba/F3-Zellen nach 72-stündiger Inkubation hemmt, durch Trypanblaufärbung ermittelt. IC₅₀ von KIT entspricht dem in Kasumi-1-Zellen ermittelten Wert durch Mitglieder unserer Gruppe.⁴⁵ Alle anderen Werte nach Duhrsen et al.⁵⁴ NB, nicht bestimmt.

4.2 FLT3-Mutationen aktivieren in AML-Zelllinien essenzielle, nicht-redundante antiapoptotische und proliferative Signale

4.2.1 AML-Zelllinien mit FLT3-Mutationen als Modell für FLT3-Mutation-positive AML

Wegen der Häufigkeit von FLT3-Mutationen in der AML ist es nicht unwahrscheinlich, dass solche Mutationen auch in Zelllinien gefunden werden können, die aus den Blasten akuter myeloischer Leukämien hervorgegangen sind. Der FLT3-Status von zehn AML-Zelllinien wurde deshalb untersucht und in drei der Zelllinien wurden aktivierende FLT3-Mutationen gefunden (MonoMac1, MonoMac6, MV4-11; siehe Tabelle 3.1).

Diese Zelllinien stellen ein gut geeignetes Modell zur Untersuchung der Rolle von FLT3-Mutationen in leukämischen Zellen dar. Vor- und Nachteile eines solchen Modells gegenüber Experimenten in primären AML-Blasten liegen in der Heterogenität der AML begründet. Unter dem Begriff akute myeloische Leukämie werden Erkrankungen zusammengefasst, denen eine große Vielzahl molekularer Abnormalitäten zugrunde liegt. Aber nicht aus allen primären AML-Blasten lassen sich stabile AML-Zelllinien gewinnen, wodurch eine Selektion auf dem Weg von AML-Blasten zu AML-Zelllinien stattfindet. Darüber hinaus ist es schwer zu beurteilen, inwieweit die Zellen dabei Veränderungen durchlaufen haben. Verallgemeinerungen der Ergebnisse aus Experimenten mit einzelnen Zelllinien sind deshalb immer nur eingeschränkt möglich. Bei den von uns untersuchten Zelllinien lag die Häufigkeit von FLT3-WT und FLT3ITD-Mutationen unter den epidemiologischen Häufigkeiten. So zeigten nur 50 % der Zelllinien FLT3-Expression (versus 70 – 100 % in AML)¹³, und eine ITD-Mutation konnte lediglich in der Zelllinie MV4-11 nachgewiesen werden (10 % versus 24 %). Im Gegensatz dazu konnte eine weitere, bisher unbekannte Mutation in 20 % der Zellen gefunden werden. Die Arbeit mit Zelllinien hat gegenüber Experimenten mit primären AML-Blasten neben technischen Vorteilen in der Kultivierung vor allem den Vorteil, dass Zelllinien ein stabiles und definiertes System darstellen, wodurch leichter eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können. In dieser Arbeit wurden erstmals Untersuchungen zu Signaltransduktion und Funktion von FLT3-Mutationen in Zellen durchgeführt, die leukämischen

Ursprungs sind. In diesem frühen Stadium der Erkenntnisse schien deshalb die Verwendung von Zelllinien sinnvoll.

4.2.2 SU5614 wirkt selektiv zytotoxisch in AML-Zelllinien mit FLT3-Mutation durch Inhibition von FLT3

Nur drei der zehn untersuchten AML-Zelllinien waren sensitiv gegenüber SU5614, und interessanterweise waren dies die gleichen drei Zelllinien, in denen eine FLT3-Mutation nachgewiesen werden konnte. SU5614 bewirkte in den Zelllinien dosisabhängig Proliferationsinhibition, Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase und Induktion von Apoptose. Die IC₅₀ in Proliferationsassays lag dabei mit Werten zwischen 300 nM für MV4-11-Zellen und 600 nM für MM1-Zellen etwas höher als die IC₅₀ in den FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen (175 – 250 nM), aber noch in einer vergleichbaren Größenordnung. Tabelle 4.2 vergleicht die in FLT3ITD-NPOS- Ba/F3 und die in MM6-Zellen ermittelten Werte.

Tabelle 4.2: Aktivität von SU5614 in verschiedenen FLT3-Zellmodellen

Biologischer Effekt	IC ₅₀ [nM]	
	Ba/F3 FLT3ITD-NPOS	MonoMac6
Proliferationshemmung	175	450
Apoptose	450	650
Dephosphorylierung von FLT3	100	150

Bei Proliferationshemmung entspricht IC₅₀ der Konzentration von SU5614, die 50 % des Wachstums der Zellen nach 72-stündiger Inkubation hemmt, ermittelt durch Trypanblaufärbung. Bei Apoptose entspricht IC₅₀ der Konzentration von SU5614, die nach 48-stündiger Inkubation abzüglich des apoptotischen Zellanteils in der Kontrolle 50 % Annexin V-positive Zellen verursacht und bei Dephosphorylierung der Konzentration, die nach drei (MM6) bzw. sechs Stunden (NPOS) zu 50 %iger Abnahme der Autophosphorylierung führt. Die Autophosphorylierung wurde nach Immunpräzipitation mit FLT3-spezifischem Antikörper mittels PY-Ak bestimmt und densitometrisch ausgewertet.

Die in MTT-Assays ermittelte IC₅₀ in MV4-11 lag mit 150 nM etwas unterhalb des durch Zählen ermittelten Wertes. Ursache hierfür könnte die wesentlich genauere Abschätzung mittels eng gestaffelter Inhibitorkonzentrationen im MTT-Assay sein. Allerdings könnten auch die unterschiedlichen Assaysysteme für die Differenz verantwortlich sein.

Da die Inhibition einer anderen Tyrosinkinase durch SU5614 in diesen Zellen die Zytotoxizität bedingt haben könnte, wurden die Zellen mit zwei weiteren PTK-

Inhibitoren behandelt, die Aktivität gegenüber FLT3-verwandten Tyrosinkinase, aber nicht gegenüber FLT3 selbst haben. Die Zellen zeigten keine Empfindlichkeit gegenüber Imatinib (STI571, Gleevec®) und SU1498. Damit konnte für alle bekannten Zielproteine dieser beiden Inhibitoren (PDGFR, KIT, ABL, ARG, FLK-1 oder KDR) ausgeschlossen werden, dass ihre Inhibition die Ursache der Zytotoxizität durch SU5614 in diesen Zellen ist. Darüber hinaus konnte in vorangegangenen Experimenten von Dr. F. Faber aus unserer Arbeitsgruppe eine Expression der SU5614-Zielproteine KIT und KDR in allen drei Zelllinien direkt ausgeschlossen werden.⁴⁵

Die Aktivierung von FLT3 und seiner Downstream-Targets konnte durch SU5614 gehemmt werden. Die Zeitkinetik und die IC_{50} dieser biochemischen Effekte waren in der gleichen Größenordnung wie die der zytotoxischen Effekte. Darüber hinaus waren sie vergleichbar mit den im Ba/F3-Zellmodell ermittelten Werten bei FLT3-Inhibition (vgl. Tabelle 4.2).

Es konnte demonstriert werden, dass SU5614 ein Inhibitor von FLT3 ist. Ebenso konnte demonstriert werden, dass AML-Zelllinien mit FLT3-Mutation selektiv empfindlich gegenüber SU5614 sind. Aufgrund des Ausschlusses etlicher anderer Tyrosinkinase als Ziel der Inhibition und aufgrund der engen Korrelation der biochemischen Effekte mit den zytotoxischen Effekten scheint die Annahme eines kausalen Zusammenhangs gerechtfertigt.

Die Inhibition einer anderen unidentifizierten Tyrosinkinase durch SU5614 als Ursache der Toxizität in Verbindung mit einer zufälligen Koinzidenz der FLT3-Inhibition und der selektiven Toxizität von SU5614 gegenüber Zellen mit FLT3-Mutation kann zwar mit den gegebenen Methoden nicht komplett ausgeschlossen werden, scheint aber sehr unwahrscheinlich.

Die hier präsentierte zytotoxische Wirkung der gezielten Inhibition von FLT3 in AML-Zelllinien mit mutiertem FLT3-Rezeptor zeigt einen wichtigen Sachverhalt auf: Trotz der verschiedenen genetischen Veränderungen, die in AML-Zelllinien auftreten, sind die untersuchten Zellen abhängig vom antiapoptotischen und proliferativen Potenzial von FLT3. FLT3-Mutationen aktivieren in diesen Zellen also essenzielle Signalwege, deren Wegfall durch kein anderes intrazelluläres Signalsystem ersetzt wird.

4.3 Signaltransduktion von mutiertem FLT3

Aufgrund der hohen Expression erwiesen sich MM6-Zellen als gutes Modell zur Analyse der FLT3-Signaltransduktion in AML-Zelllinien. In ihnen wurde eine Hyperphosphorylierung des mutierten FLT3-Rezeptors sowie eine Aktivierung der Downstream-Targets STAT3, STAT5 und MAPK demonstriert. Durch Zugabe von SU5614 wurde die Aktivität von FLT3 und dieser Downstream-Targets zeit- und dosisabhängig gehemmt. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde dieser und anderer Arbeiten aus dem Ba/F3-Modell erstmals in einer Zelllinie leukämischen Ursprungs.^{21, 22} Darüber hinaus konnte hier eine FLT3ITD-abhängige Expression von STAT-Zielgenen gezeigt werden, die für das antiapoptotische Potenzial von FLT3-LM verantwortlich sein könnten.

4.3.1 STAT3 und STAT5

Mitglieder der Familie der STATs, oder *Signal Transducers and Activators of Transcription*, sind Transkriptionsfaktoren mit diversen biologischen Aufgaben. Beim Menschen kennt man STAT1 – STAT6 sowie verschiedene Isoformen und Spleißvarianten dieser STATs mit offenbar sehr unterschiedlichen Funktionen. Eine zentrale Rolle spielen STATs als Signalvermittler und Transkriptionsfaktoren bei den zellulären Antworten auf Zytokine im Rahmen der normalen Hämatopoese. Dabei können sie sowohl an der Signaltransduktion von Wachstumssignalen als auch an Differenzierungsschritten beteiligt sein. Dementsprechend scheint eine Fehlregulation verschiedener STATs eine entscheidende Rolle in der Pathogenese hämato-onkologischer Erkrankungen zu spielen.^{55, 56}

STAT3 scheint neben Aufgaben in der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren wichtige Funktionen bei der embryonalen Entwicklung verschiedener Gewebe zu haben. So erleiden STAT3-Knockout-Mäuse intrauterinen Fruchttod.⁵⁷ In einer Vielzahl von malignen Tumoren unterschiedlichster Ursprungsgewebe kann eine konstitutive Aktivierung von STAT3 nachgewiesen werden.⁵⁶ Darüber hinaus ist ein konstitutiv aktives STAT3 in der Lage, Fibroblasten zu transformieren, die in Mäusen Tumoren bilden.⁵⁸ Sowohl ein Funktionsverlust, als auch eine unregulierte Aktivierung von STAT3 können offenbar weitreichende Folgen haben. In dieser

Arbeit konnte gezeigt werden, dass FLT3-Mutationen eine konstitutive Aktivierung von STAT3 bewirken. Dies könnte ein wichtiger Mediator des transformierenden Potenzials von FLT3-Mutationen sein.

Von STAT5 sind zwei Isoformen, STAT5a und STAT5b bekannt. Zwei verschiedene Gene kodieren für die fast identischen Proteine. Trotz ihrer Ähnlichkeit erfüllen diese Proteine zumindest teilweise unterschiedliche Aufgaben, wie Gen-Knockout-Studien in Mäusen gezeigt haben: STAT5a-Knockout-Mäuse entwickeln sich normal, zeigen jedoch eine gestörte Brustdrüsenentwicklung sowie Störungen in der Proliferation verschiedener Immunzellen. STAT5b-Knockout-Mäuse sind kleinwüchsig und zeigen eine Störungen insbesondere der geschlechtsspezifischen Wirkungen von Wachstumshormon (GH, *growth hormone*). STAT5a/b-Doppel-Knockout-Mäuse sind auch lebensfähig, jedoch infertil und haben neben Defekten in den Prolaktin- und GH-Signalwegen (entsprechend den Befunden in den Einzel-Knockout-Mäusen) auch Zellzyklusstörungen in T-Zellen, die über die Störungen in den STAT5a-Knockout-Mäusen hinausgehen. Die Tiere leiden unter einer fötalen Anämie. Wenn sie ausgewachsen sind ist lediglich eine leichte Leukozytopenie mit Lymphopenie und Granulozytose nachweisbar. Das Erstaunliche dabei ist, dass diese Tiere eine relativ intakte Hämatopoese haben, obwohl STAT5 als Downstream-Target vieler an der Hämatopoese beteiligten Zytokine identifiziert wurde. Offenbar sind ein großer Teil dieser Mechanismen redundant.^{55, 59} In leukämischen Zelllinien und Blasten kann regelmäßig eine konstitutive STAT5-Aktivierung nachgewiesen werden.^{60, 61} Insbesondere wird durch einige leukämische Fusionsproteine mit Tyrosinkinaseaktivität eine starke Aktivierung von STAT5 hervorgerufen. Dazu zählen zum Beispiel BCR/ABL, TEL/JAK2, TEL/PDGFR, TEL/ABL und HIP1/PDGFR. Hier scheint STAT5 aber unterschiedliche Funktionen zu übernehmen. So bleibt die transformierende Aktivität von BCR-ABL auch nach experimenteller Ausschaltung von STAT5 erhalten, was zeigt, dass STAT5-Aktivierung hier nicht der einzige entscheidende Signalweg ist.⁶² Im Gegensatz dazu ist die Transformation durch TEL-JAK2 komplett von STAT5 abhängig.⁶³ Mitglieder unserer Gruppe und andere konnten demonstrieren, dass ein konstitutiv aktives STAT5-Konstrukt IL-3-abhängige Zelllinien zur Faktorunabhängigkeit transformiert.^{43, 64} Zusammenfassend scheint ein Funktionsverlust von STAT5 zwar wegen redundanter Systeme keine dramatische Auswirkung auf die

Hämatopoese zu haben, eine konstitutive Aktivierung von STAT5 hat jedoch offenbar eindeutig onkogene Potenz. Am Beispiel von BCR-ABL konnte gezeigt werden, dass auch in einem Fall mit konstitutiv aktivem STAT5 eine Redundanz der STAT5-Signale vorliegen kann. Hier könnte die STAT5-Aktivierung eine zusätzliche Apoptose-Resistenz der Zellen bewirken. So konnten Hoover et al. zeigen, dass BCR-ABL-transformierte Ba/F3 zwar auch nach Ausschaltung von STAT5 faktorunabhängig wachsen, weil durch die gleichzeitige Aktivierung von RAS und AKT Redundanz für diese Funktion vorliegt, dass diese Zellen durch die fehlende STAT5-Wirkung dann aber deutlich empfindlicher gegenüber dem proapoptotischen Reiz einer DNA-Schädigung sind. Verglichen mit RAS und AKT bewirkte STAT5 in diesem Modell die stärkste Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion durch DNA-Schädigung.⁶⁵ Wie bereits berichtet, konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass FLT3-LM einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor in der AML darstellen. Eine mögliche Ursache dafür könnte zum Beispiel eine höhere Resistenz der Zellen gegenüber Zytostatika sein. Unter diesem Aspekt erscheint die hier gezeigte Aktivierung von STAT5 in einer AML-Zelllinie mit FLT3-Mutation besonders interessant.

Die genaue Funktion der hier demonstrierten Aktivierung von STAT3 und STAT5 lässt sich nur durch direkte funktionelle Studien ermitteln. Vor dem Hintergrund der Daten über die Bedeutung von STAT3 und STAT5 in der Pathogenese verschiedener maligner Erkrankungen scheint es aber wahrscheinlich, dass die Aktivierung dieser STATs durch mutiertes FLT3 mitverantwortlich für das transformierende Potenzial von FLT3-Mutationen ist. Ob eines der beiden dabei die entscheidende Rolle spielt, kann aus den demonstrierten Daten nicht entschieden werden. Beide STATs haben offenbar genug proliferatives Potenzial, um die Faktorunabhängigkeit in den FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen bewirkt haben zu können. Für eine tragende Rolle von STAT5 in der Signaltransduktion von FLT3-Mutationen spricht einerseits die viel stärkere Aktivierung von STAT5 gegenüber STAT3 in den FLT3-transformierten Ba/F3-Zellen, und andererseits die Entdeckung von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, dass das Auftreten von FLT3-LM und die FLT3-Expression in primären AML-Blasten zwar stark mit STAT5-Aktivierung assoziiert ist, nicht aber mit STAT3-Aktivierung.⁶⁶

4.3.2 Die STAT3/STAT5-Zielgene *BCL-X_L* und *p21*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel der Proteine *BCL-X_L* und *p21* in FLT3ITD-transformierten Ba/F3-Zellen hoch ist, und dass eine Unterbrechung der Signaltransduktion von FLT3 durch SU5614 diese Expression herabreguliert. Die kodierenden Gene *BCL-X_L* und *p21* werden unter anderem durch STATs reguliert. Insbesondere weisen beide Gene direkte STAT5-Bindungsstellen in ihrer Promoterregion auf und können so transkriptionell durch STAT5 reguliert werden.⁵⁶

BCL-X_L ist ein antiapoptotisches Protein der BCL-2-Familie. Man unterscheidet antiapoptotische und proapoptotische Proteine in dieser Familie. Die antiapoptotischen Proteine der BCL-2-Familie wirken unter anderem dadurch, dass sie ihre proapoptotischen Familienmitglieder blockieren, indem sie inaktive Heterodimere mit ihnen bilden.⁶⁷ In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass *BCL-X_L* eine wichtige Funktion für die Resistenz von Zelllinien gegenüber proapoptotischen Reizen wie Zytostatikabehandlung hat.^{68, 69} An den 60 Zelllinien des NCI-ACDS (*National Cancer Institute Anticancer Drug Screen*) wurde sowohl die Sensitivität gegenüber 122 Chemotherapeutika untersucht, als auch die Expression ausgewählter Gene, denen eine Funktion bei der Reaktion auf Zellschädigung zugesprochen wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die stärkste Korrelation zwischen der Expression eines Genes und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika für *BCL-X_L* besteht.⁷⁰ Die hier demonstrierte Expression von *BCL-X_L* als Downstream-Target von FLT3-LM könnte deshalb von entscheidender funktioneller Bedeutung sein.

Das Protein *p21*^{WAF1/CIP1} wurde als erster Inhibitor der *Cyclin-dependent kinase* (*CDK*) identifiziert. Es wurde gezeigt, dass *p21* nach einer DNA-Schädigung einen Zellzyklusarrest in G₁ verursacht. In der vorliegenden Arbeit wurde im Zusammenhang mit der zytotoxischen Aktivität von SU5614 aber eine verminderte Expression von *p21* und trotzdem ein G₁-Arrest beobachtet. Dieser Befund lässt sich nur schwer deuten. Mögliche Erklärungen sind, dass entweder *p21* in diesem System eine untergeordnete Rolle spielt und andere Regulatoren des Zellzyklus hier gegensätzliche Wirkung haben, oder dass *p21* in FLT3ITD-transformierten Ba/F3-Zellen vor allem andere Funktionen erfüllt. Es wurde beschrieben, dass *p21* unter bestimmten Bedingungen auch einen Arrest auch in anderen

Zellzyklusphasen bewirken kann, und – in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse – dass eine erhöhte Expression von p21 nicht notwendigerweise im Zusammenhang mit einem Zellzyklusarrest auftreten muss. Darüber hinaus konnten für p21 negativ regulatorische Funktionen in der Kontrolle der Apoptose gezeigt werden.⁷¹ Ebenso wurde eine erhöhte p21-Expression im Zusammenhang mit Zytostatikaresistenz BCR-ABL-positiver Zellen beschrieben.⁷² Zusammenfassend scheint ein Mitwirken von p21 bei den antiapoptotischen Effekten von FLT3-LM möglich.

4.3.3 MAPK

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass ERKs weitere Downstream-Targets von FLT3-Mutationen sind. ERK1 und ERK2 sind Mitglieder der Familie der MAPKs. Diese werden durch Phosphorylierung an spezifischen Aminosäureresten aktiviert und phosphorylieren dann selbst eine Vielzahl membrangebundener und zytoplasmatischer Substrate. Außerdem aktivieren sie im Zellkern Transkriptionsfaktoren und regulieren so die Expression verschiedener Gene. Entsprechend vielfältig sind ihre beschriebenen Funktionen als Regulatoren von metabolischen Prozessen, Zellzyklus, Zellmigration, Zellform, Proliferation und Differenzierung.⁷³ Ihre Rolle in der Pathogenese der AML wird jedoch kontrovers diskutiert. Während Ajenjo et al. in AML-Zelllinien keinen Effekt von MAPK-Inhibitoren verzeichneten⁷⁴, konnten Milella et al. Hinweise für eine wichtige antiapoptotische Funktion von MAPK in AML-Zelllinien demonstrieren.⁷⁵

4.4 Identifikation einer neuen FLT3-Mutation

In den Zelllinien MonoMac1 und MonoMac6 (beide von Zellen desselben Patienten) fand sich ein FLT3-Protein mit bisher nicht beschriebener Punktmutation der JM-Region, FLT3V592A. Auch diese Mutation ist aktivierend und dazu in der Lage, Ba/F3-Zellen zu transformieren. Diese Mutation wurde mittlerweile auch in einem Patienten gefunden. Außerdem wurden weitere Punktmutationen in der JM-Region beschrieben.^{33, 76} Die epidemiologische Rolle dieser Mutationen ist nicht eindeutig zu beurteilen, da sie beim üblichen Screening nach FLT3-LM mittels PCR nicht erfasst werden.

4.5 Klinische Implikationen

In der bereits erwähnten Arbeit von Levis et al. zeigte sich eine signifikant erhöhte Sensitivität von FLT3-LM-positiven AML-Blasten gegenüber dem FLT3-Inhibitor AG1295. Allerdings konnte dabei nicht bewiesen werden, dass die Wirkung nur auf die Inhibition der FLT3-Mutationen zurückzuführen war. Auch wenn das transformierende Potenzial von FLT3-Mutationen zuvor in IL-3-abhängigen Zelllinien und in einem KMT-Modell der Maus gezeigt wurde, konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass das Überleben von AML-Zelllinien mit FLT3-Mutationen von diesen Mutationen abhängig ist, und FLT3-Inhibitoren deshalb selektiv zytotoxisch für diese Zellen sind.

Die pharmakologische Inhibition von FLT3 stellt deshalb einen viel versprechenden Ansatz für eine gezielte molekulare Therapie bei fast einem Drittel der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie dar.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden Anfang 2003 publiziert.⁷⁷ In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde die FLT3-inhibitorische Aktivität von SU5614 unabhängig von dieser Arbeit zeitlich parallel von einer Arbeitsgruppe der Firma SUGEN demonstriert.⁷⁸ Die SUGEN-Arbeit zeigte darüber hinaus eine vergleichbare FLT3-Inhibitorische Aktivität für den PTK-Inhibitor SU5416. Die Substanz SU5416 ist nahezu identisch mit SU5614 und unterscheidet sich lediglich durch die Substitution eines Chloratoms am Indolinonring. Sie hat ein vergleichbares inhibitorisches Spektrum wie SU5614^{79, 80} und hatte schon zuvor bei einer AML-Patientin zu einer stabilen Remission geführt.⁸¹ In einer klinischen Studie konnte FLT3-Dephosphorylierung durch SU5416 in Patienten gezeigt werden, jedoch ohne eindeutige Korrelation mit klinischen Effekten.⁸²

Seit der Demonstration der selektiven zytotoxischen Wirkung von FLT3-Inhibitoren in FLT3-Mutation-positiven AML-Zellen durch die hier vorgestellte und andere Arbeiten wurden weitere FLT3-Hemmstoffen identifiziert. Für verschiedene dieser Substanzen konnte demonstriert werden, dass sie in KMT-Modellen in Mäusen das Überleben einer FLT3ITD-induzierten Erkrankung signifikant verlängern.⁸³⁻⁸⁵ Einige Inhibitoren befinden sich mittlerweile in der klinischen Evaluation. Dazu zählen Substanzen mit oraler Bioverfügbarkeit wie PKC412, CEP-701, MLN518 und SU11248. Zusammenfassend kann zum jetzigen Zeitpunkt gesagt werden,

dass das Therapieprinzip funktioniert, also eine FLT3-Dephosphorylierung in vivo stattfindet. Die Verträglichkeit der Medikamente ist in der Regel gut. In vielen Fällen konnte eine Reduktion der Anzahl peripherer Blasten induziert werden. Komplette Remissionen sind aber die Ausnahme.⁸⁶⁻⁸⁹

Es gibt noch einige unbeantwortete Fragen, beispielsweise nach dem optimalen Spektrum eines PTK-Inhibitors. Denn kein einziger dieser Hemmstoffe ist ein reiner FLT3-Inhibitor. Zu ihren Zielen zählen Proteine wie PKC, PDGFR, KDR, KIT, EGFR um nur einige zu nennen. Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar, inwieweit die Hemmung verschiedener anderer PTKs bei der Therapie der AML ein Vorteil oder ein Nachteil ist.⁸⁹ Eine weitere Frage ist, ob bestimmte Patientengruppen innerhalb der Gruppe FLT3-Mutation-positiver AML von der Behandlung mit einem FLT3-Inhibitor besonders profitieren. Es wurde beschrieben, dass verschiedene FLT3-Mutationen unterschiedliche Sensitivität gegenüber FLT3-Inhibitoren haben.^{90, 91} Aber auch die Behandlung FLT3-WT-exprimierender hämatologischer Neoplasien mit FLT3-Inhibitoren wird diskutiert. So konnte bei Zellen kindlicher akuter lymphoblastischer Leukämien eine selektive Empfindlichkeit FLT3-WT-exprimierender Zellen gegenüber einem FLT3-Inhibitor demonstriert werden.⁹²

Ein Grund für die niedrige Effizienz von FLT3-Inhibitoren als Monotherapie in den angesprochenen Studien ist sicherlich die Auswahl mehrfach vortherapierter und therapierefraktärer AML-Fälle für Studien der Phasen eins und zwei. Eine weitere mögliche Ursache liegt aber in der Art der Erkrankung begründet. Der AML liegen multiple genetische Veränderungen zugrunde. FLT3-Mutationen sind nicht alleine in der Lage, eine AML zu hervorzurufen und dementsprechend ist eine molekulare Therapie der AML gegen ein einziges Zielprotein möglicherweise nicht ausreichend. Damit unterscheidet sich die AML deutlich von der chronisch myeloischen Leukämie, bei der die Inhibition der pathogenetisch ursächlichen und zunächst allein verantwortlichen leukämischen Tyrosinkinase BCR-ABL durch Imatinib gute Erfolge erzielt.⁴⁷

Das Problem der Resistenzentwicklung, das auch aus der Therapie der CML mit Imatinib bekannt ist, könnte noch hinzukommen. So konnte gezeigt werden, dass FLT3-Mutation-positiv Zellen in vitro binnen kurzer Zeit weitere Mutationen im *FLT3*-Gen erwerben, die eine Resistenz gegenüber FLT3-Inhibitoren bewirken.^{93, 94} Als Strategien, um diesem Problem gerecht zu werden, kommen

neben dem Screening nach weiteren FLT3-Inhibitoren Kombinationstherapien in Frage. Sowohl die Kombination verschiedener FLT3-Inhibitoren als auch die Kombination von FLT3-Inhibitoren mit Medikamenten mit einem anderen zellulären Ansatzpunkt, wie beispielsweise Zytostatika, könnten eine Resistenzentstehung verlangsamen.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass FLT3ITD-Mutationen eine starke Expression des STAT5-Zielgens *BCL-X_L* bewirken, dem Gen, dessen Expression die stärkste Assoziation mit dem Auftreten von Zytostatika-Resistenz in Zelllinien hat. In mehreren Untersuchungen haben Patienten mit FLT3-LM-positiver AML eine schlechtere Prognose als Patienten mit FLT3-LM-negativer AML. Ursache hierfür könnte eine erhöhte Zytostatika-Resistenz der Zellen sein. Aber selbst wenn diese Hypothese nicht zutrifft, kann umgekehrt gefolgert werden, dass eine FLT3-Inhibition mit daraus resultierender Herabregulation des *BCL-X_L*-Gens die Sensitivität leukämischer Blasten gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika erhöhen könnte. In Einklang mit dieser These sind die erst kürzlich von Levis et al. demonstrierten Ergebnisse über die synergistische Wirkung von einem FLT3-Inhibitor mit Chemotherapeutika in vitro.⁹⁵ Eine Kombination von FLT3-Inhibitoren mit herkömmlicher Chemotherapie scheint deshalb besonders viel versprechend.

5 Zusammenfassung

Bei etwa 30 % der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) können aktivierende Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 gefunden werden. Damit ist *FLT3* eines der am häufigsten mutierten Gene in der AML. Die Mutationen treten in zwei Regionen des FLT3-Rezeptors auf: Längenmutationen (FLT3-LM) in der juxtamembranösen Region (24 %) und Punktmutationen der Aktivierungsschleife der zweiten Tyrosinkinasedomäne (FLT3-TKD-Mutationen; 7 %). FLT3-Mutationen verleihen Ba/F3-Zellen Unabhängigkeit von Interleukin-3. In einem Knochenmarktransplantationsmodell der Maus erzeugen FLT3-LM ein myeloproliferatives Syndrom und in Zusammenwirken mit PML-RAR α eine akute Promyelozytenleukämie. Darüber hinaus scheint das Auftreten von FLT3-LM bei Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein.

In dieser Arbeit wurden AML-Zelllinien und durch FLT3-Mutationen transformierte Ba/F3-Zellen mit dem kleinmolekularen PTK-Inhibitor SU5614 behandelt. SU5614 induziert selektiv Wachstumsarrest, Zellzyklusarrest und Apoptose in Ba/F3-Zellen und leukämischen Zelllinien, die FLT3-Mutationen tragen. Darüber hinaus hebt SU5614 die antiapoptotische und wachstumsfördernde Wirkung von FLT3-Ligand (FL) in FL-abhängigen Zellen auf. In Zelllinien, die keinen aktivierten FLT3-Rezeptor tragen, zeigte die Substanz keine zytotoxische Wirkung. Auf biochemischer Ebene hemmt SU5614 die Hyperphosphorylierung des FLT3-Rezeptors und seiner Downstream-Targets STAT3, STAT5 und MAPK, sowie die Expression der STAT5-Zielgene BCL-X_L und p21.

Es konnte somit demonstriert werden, dass das Indolinonderivat SU5614 ein potenter Hemmstoff von mutiertem FLT3 und Wildtyp-FLT3 ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zelllinien leukämischen Ursprungs, die endogen FLT3-Mutationen exprimieren, selektiv empfindlich gegenüber SU5614 sind. Diese selektive und potente Zytotoxizität von FLT3-Inhibitoren impliziert den klinischen Einsatz solcher Inhibitoren als zusätzliche molekulare Therapiemöglichkeit bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und FLT3-Mutationen.

6 Literaturverzeichnis

1. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341:1051-62.
2. Clarke CA, Glaser SL. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2000; 342:358-9.
3. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001 National Cancer Institute, 2004: Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2001/.
4. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50:197-222.
5. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004:80-97.
6. Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003:82-101.
7. Small D, Levenstein M, Kim E, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:459-63.
8. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. 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* 1991; 88:9026-30.
9. Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 1991; 6:1641-50.
10. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:373-98.
11. McKenna HJ, de Vries P, Brasel K, Lyman SD, Williams DE. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86:3413-20.
12. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; 91:1101-34.
13. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100:1532-42.
14. Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, et al. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 1996; 88:3987-97.
15. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10:1911-8.
16. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. 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* 2001; 98:1752-9.
17. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia (AML): Correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study, and usefulness as a marker for detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100:59-66.
 18. Reilly JT. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol* 2002; 116:744-57.
 19. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004; 13:169-78.
 20. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998; 12:1333-7.
 21. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000; 96:3907-14.
 22. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19:624-31.
 23. Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 2000; 14:1766-76.
 24. Tse KF, Novelli E, Civin CI, Bohmer FD, Small D. Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia* 2001; 15:1001-10.
 25. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2002; 99:310-8.
 26. Baldwin BR, Tse KF, Small D. Transgenic mice expressing a constitutively activated FLT3 receptor display a myeloproliferative disease phenotype. *Blood* 2001; 98:801a.
 27. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:8283-8.
 28. Levis M, Tse KF, Smith BD, Garrett E, Small D. A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations. *Blood* 2001; 98:885-7.
 29. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97:2434-2439.
 30. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT.

- Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113:983-8.
31. Schnittger S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T. Rapid, Simple and Reliable Detection of FLT3 Asp835 Point Mutations in Acute Myeloid Leukemia and Identification of a New Length Mutation In Exon 20. *Blood* (abstract) 2001; 98:107a.
 32. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100:3423-5.
 33. Smith ML, Arch R, Smith LL, et al. Development of a human acute myeloid leukaemia screening panel and consequent identification of novel gene mutation in FLT3 and CCND3. *Br J Haematol* 2005; 128:318-23.
 34. Matsuno N, Nanri T, Kawakita T, Mitsuya H, Asou N. A novel FLT3 activation loop mutation N841K in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 30:30.
 35. Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, et al. Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2005; 105:335-40. Epub 2004 Sep 02.
 36. Jiang J, Paez JG, Lee JC, et al. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood* 2004; 104:1855-8. Epub 2004 Jun 03.
 37. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia* 1997; 11:1447-52.
 38. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93:3074-80.
 39. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97:89-94.
 40. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 2000; 111:190-5.
 41. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer Res* 2001; 61:7233-9.
 42. Schnittger S, Boell I, Schoch C, et al. FLT3D835/I836 Point Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Correlation to Cytogenetics, Cytomorphology, and Prognosis in 1229 Patients. *Blood* 2002; 100:329a.
 43. Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 2002; 30:262-71.
 44. Buske C, Becker D, Feuring-Buske M, et al. TGF-beta inhibits growth and

- induces apoptosis in leukemic B cell precursors. *Leukemia* 1997; 11:386-92.
45. Spiekermann K, Faber F, Voswinckel R, Hiddemann W. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells. *Exp Hematol* 2002; 30:767-73.
 46. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 2001; 97:2440-8.
 47. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002; 346:683-93.
 48. Strawn LM, McMahon G, App H, et al. Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res* 1996; 56:3540-5.
 49. Boguslawski G, McGlynn PW, Harvey KA, Kovala AT. SU1498, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2, causes accumulation of phosphorylated ERK kinases and inhibits their activity in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 2004; 279:5716-24. Epub 2003 Nov 18.
 50. Ma Y, Carter E, Wang X, Shu C, McMahon G, Longley BJ. Indolinone derivatives inhibit constitutively activated KIT mutants and kill neoplastic mast cells. *J Invest Dermatol* 2000; 114:392-4.
 51. Dehmel U, Zaborski M, Meierhoff G, et al. Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. I. Proliferative response of myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1996; 10:261-70.
 52. Dehmel U, Quentmeier H, Drexler HG. Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. II. Agonistic and antagonistic effects of other cytokines. *Leukemia* 1996; 10:271-8.
 53. Meyer C, Drexler HG. FLT3 ligand inhibits apoptosis and promotes survival of myeloid leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma* 1999; 32:577-81.
 54. Duhresen U, Martinez T, Vohwinkel G, et al. Effects of vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor inhibitors on long-term cultures from normal human bone marrow. *Growth Factors* 2001; 19:1-17.
 55. Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 2000; 19:2511-22.
 56. Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000; 19:6613-26.
 57. Takeda K, Noguchi K, Shi W, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3801-4.
 58. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98:295-303.
 59. Levy DE, Gilliland DG. Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene* 2000; 19:2505-10.
 60. Xia Z, Baer MR, Block AW, Baumann H, Wetzler M. Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res* 1998; 58:3173-80.
 61. Spiekermann K, Biethahn S, Wilde S, Hiddemann W, Alves F. Constitutive

- activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol* 2001; 67:63-71.
62. Sexl V, Piekorz R, Moriggl R, et al. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood* 2000; 96:2277-83.
 63. Schwaller J, Parganas E, Wang D, et al. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell* 2000; 6:693-704.
 64. Santos SC, Lacronique V, Bouchaert I, et al. Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene* 2001; 20:2080-90.
 65. Hoover RR, Gerlach MJ, Koh EY, Daley GQ. Cooperative and redundant effects of STAT5 and Ras signaling in BCR/ABL transformed hematopoietic cells. *Oncogene* 2001; 20:5826-35.
 66. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W. Overexpression and Constitutive Activation of FLT3 Induces STAT5 Activation in Primary Acute Myeloid Leukemia Blast Cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2140-50.
 67. Schimmer AD, Hedley DW, Penn LZ, Minden MD. Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood* 2001; 98:3541-53.
 68. Deverman BE, Cook BL, Manson SR, et al. Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* 2002; 111:51-62.
 69. Thomas J, Leverrier Y, Marvel J. Bcl-X is the major pleiotropic anti-apoptotic gene activated by retroviral insertion mutagenesis in an IL-3 dependent bone marrow derived cell line. *Oncogene* 1998; 16:1399-408.
 70. Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ, Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60:6101-10.
 71. Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 2000; 1471:M43-56.
 72. Keeshan K, Mills KI, Cotter TG, McKenna SL. Elevated Bcr-Abl expression levels are sufficient for a haematopoietic cell line to acquire a drug-resistant phenotype. *Leukemia* 2001; 15:1823-33.
 73. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103:211-25.
 74. Ajenjo N, Aaronson DS, Ceballos E, Richard C, Leon J, Crespo P. Myeloid leukemia cell growth and differentiation are independent of mitogen-activated protein kinase ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2000; 275:7189-97.
 75. Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, et al. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2001; 108:851-9.
 76. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Acute myeloid leukemia patients with an activating mutation in FLT3 respond to a small molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2004; Sep 2 (epub).

77. Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R, et al. 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* 2003; 101:1494-504.
78. Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, et al. SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* 2002; 100:2941-9.
79. Fong TA, Shawver LK, Sun L, et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; 59:99-106.
80. Smolich BD, Yuen HA, West KA, Giles FJ, Albitar M, Cherrington JM. The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts. *Blood* 2001; 97:1413-21.
81. Mesters RM, Padro T, Bieker R, et al. Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in a patient with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98:241-3.
82. O'Farrell AM, Yuen HA, Smolich B, et al. Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2004; 28:679-89.
83. Levis M, Allebach J, Tse KF, et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002; 99:3885-91.
84. Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* 2002; 1:421-32.
85. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 2002; 1:433-43.
86. Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:3669-76. Epub 2004 Jan 15.
87. Fiedler W, Serve H, Dohner H, et al. A phase I study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* 2004:2004-05-1846.
88. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005; 105:54-60. Epub 2004 Sep 02.
89. Stone RM, O'Donnell M R, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004:98-117.
90. Grundler R, Thiede C, Miething C, Steudel C, Peschel C, Duyster J. Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different

- activating mutations of the FLT3 receptor. *Blood* 2003; 102:646-51. Epub 2003 Mar 27.
91. Clark JJ, Cools J, Curley DP, et al. Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518. *Blood* 2004; 104:2867-72. Epub 2004 Jul 15.
 92. Brown P, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* 2004; 16:16.
 93. Bagrintseva K, Schwab R, Kohl TM, et al. 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* 2004; 103:2266-75. Epub 2003 Nov 6.
 94. Cools J, Mentens N, Furet P, et al. Prediction of Resistance to Small Molecule FLT3 Inhibitors: Implications for Molecularly Targeted Therapy of Acute Leukemia. *Cancer Res* 2004; 64:6385-9.
 95. Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood* 2004; 104:1145-50. Epub 2004 May 04.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoaktinomycin (vgl. Kap. 2.4.2)
A	Alanin, Ala
ABL	<i>Abelson tyrosine kinase</i> ; zytoplasmatische Tyrosinkinase, konstitutiv aktiv im Fusionsprotein BCR-ABL
AKT	Serin/Threonin-Proteinkinase mit Funktionen in verschiedenen Signaltransduktionswegen; Proteinkinase B (PKB)
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytenleukämie
ARG	<i>ABL related gene</i>
Asp	Aspartat, D
ATRA	<i>all-trans retinoic acid</i>
BCL-X _L	Antiapoptotisches Protein
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BCR-ABL	Fusionsprotein mit zentraler Rolle in der Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie; Korrelat der Philadelphia-Chromosom-Translokation auf Proteinebene
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
D	Aspartat, Asp
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	<i>erk-related tyrosine kinase</i> ; Enzyme der MAPK-Familie
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FAB	<i>French-American-British-Classification</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FL	FLT3-Ligand
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>

FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FLK-1	<i>fetal liver kinase 1</i> ; VEGFR-2
FLK-2	<i>fetal liver kinase 2</i> ; FLT3
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FLT3-LM	FLT3-Längenmutationen, i. e. S. FLT3ITD
FLT3ITD	<i>FLT3 internal tandem duplication</i>
FLT3-TKD	<i>FLT3 tyrosine kinase domain (mutation)</i>
FLT3-WT	Wildtyp-FLT3
IL-3	Interleukin-3
ITD	<i>Internal tandem duplication</i>
JM	Juxtamembran-, juxtamembranös
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i> ; VEGFR-2
KIT	CD117, Rezeptortyrosinkinase der Klasse III
KMT	Knochenmarktransplantation
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PTK	Proteintyrosinkinase
PML/RAR α	<i>promyelocytic leukemia / retinoic acid receptor α</i> ; leukämisches Fusionsprotein bei der APL
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
RTK	Rezeptortyrosinkinase (auch RPTK)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.5.4)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STK-1	<i>stem cell tyrosine kinase 1 (= FLT3)</i>
TEL	Onkoprotein
TEL-ABL	Leukämisches Fusionsprotein
TEL-JAK2	Leukämisches Fusionsprotein
TKD	Tyrosinkinasedomäne

V	Valin, V
VEGF	<i>vascular endothelial derived growth factor</i>
VEGFR-1	<i>vascular endothelial derived growth factor receptor 1; FLT-1</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial derived growth factor receptor 2; FLK-1,</i> KDR
Y	Tyrosin, Tyr

7.2 Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

7.2.1 Originalartikel

Spiekermann K, **Dirschinger RJ**, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Buske C, Schnittger S, Kelly LM, Gilliland DG, Hiddemann W. 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** 2003; 101(4): 1494-1504.

7.2.2 Publierte Abstracts

Spiekermann K, **Dirschinger RJ**, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Buske C, Schnittger S, Kelly LM, Gilliland DG, Hiddemann W. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML cells expressing a constitutively activated FLT3. Gemeinsame Jahrestagung der DGHO und ÖGHO, München, 2002. **Onkologie** 2002; 25 (Suppl. 4):142 (#495).

Dirschinger RJ, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Buske C, Schnittger S, Kelly LM, Gilliland DG, Hiddemann W, Spiekermann K. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML cells expressing a constitutively activated FLT3. 14th EORTC – NCI – AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Frankfurt, 2002. **European Journal of Cancer** 2002; 38 (Suppl. 7): S83 (#269).

Spiekermann K, **Dirschinger RJ**, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Buske C, Schnittger S, Kelly LM, Gilliland DG, Hiddemann W. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML cells expressing a constitutively activated FLT3. American Society of Hematology, 44th annual meeting, Philadelphia, 2002. **Blood** 2002; 100 (11): 34a (#118).

7.3 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Hiddemann für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Promotionsarbeit an der Medizinischen Klinik III der Ludwig-Maximilians-Universität durchzuführen. Darüber hinaus möchte ich für die Ermöglichung der Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Karsten Spiekermann für die herausragende Betreuung im Rahmen dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich Frau Ruth Schwab für die Unterweisung in zahlreichen Methoden und hervorragende technische Assistenz danken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. Ksenia Bagrintseva und Herrn Dr. med. Florian Faber für anregende Diskussionen und gute Kooperation innerhalb der Arbeitsgruppe.

7.4 Lebenslauf

Ralf Josef Dirschinger

geboren am 30.09.1977 in München

Ausbildung

1983 –1987	Grundschulen Neuried und München-Forstenried
1987 –1996	Thomas-Mann-Gymnasium
1995	Test für medizinische Studiengänge Testwert 120 (97,7 %)
1996	Abitur, Note:1,3
1996 – 2004	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Unterbrechung durch Zivildienst
1999	Ärztliche Vorprüfung
2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2004	Abschluss des Medizinstudiums, Gesamtnote: gut

Zivildienst

1997 – 1998	Pflegedienst in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Klinikum Großhadern der LMU München (Direktor i. d. Zeitraum: Prof. Dr. E. Kastenbauer)
-------------	--

Famulaturen und praktisches Jahr

1999	Famulatur auf der Intensivstation der 1. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar der TU München (Direktor: Prof. Dr. A. Schömig)
2001	Famulatur in der Herzanaesthesie in der Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum Großhadern der LMU München (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter)
2002	Praxisfamulatur in der chirurgischen Praxis Dr. A. Grube, München

- 2003 – 2004 1. Tertial des Praktischen Jahres im Rotationsprogramm der Medizinischen Kliniken II und III, Klinikum Großhadern der LMU München (Direktoren: Prof. Dr. B. Göke und Prof. Dr. W. Hiddemann)
- 2004 2. Tertial des Praktischen Jahres an der Klinik für Anaesthesiologie Klinikum Großhadern der LMU München (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter)
- 2004 3. Tertial des Praktischen Jahres an den Kliniken für Allgemein- und Unfallchirurgie Städtisches Krankenhaus München-Harlaching (Chefärzte: Prof. Dr. J. Horn und Prof. Dr. H. Hertlein)

Berufliche Tätigkeit

seit 02/2005 Assistenzarzt an der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen, Deutsches Herzzentrum München (Direktor: Prof. Dr. A. Schömig)