

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

**Funktionelle Charakterisierung von extrazellulären  
Mutationen der Rezeptortyrosinkinasen KIT und  
FLT3 in der akuten myeloischen Leukämie**

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

vorgelegt von  
Tobias Martin Kohl  
aus  
Augsburg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Hiddemann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Rupp
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Krietsch Prof. Dr. B. Emmerich
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. K. Spiekermann
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2005

*Meinen Eltern,*

*Thomas und Rita*

*gewidmet*

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer **Karsten Spiekermann** und meinem Doktorvater **Wolfgang Hiddemann**. Karsten verstand es jederzeit, mich zu motivieren und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Bei **Susanne Schnittger** und den Mitarbeitern des Labors für Leukämiediagnostik möchte ich mich für die gelungene Zusammenarbeit bedanken.

Großen Dank möchte ich überdies **allen Mitgliedern der KKG Leukämie** aussprechen, die durch ihre Offenheit und Freundschaft für mich in den letzten Jahren zu einer großen Familie geworden sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit – oder Teile hiervon – wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Schnittger, S., **Kohl, T. M.**, Leopold, N., Schoch, C., Wichmann, H. E., Kern, W., Lohse, P., Hiddemann, W., Haferlach, T., Spiekermann, K. 2005: 'D324N single-nucleotide polymorphism in the FLT3 gene is associated with higher risk of myeloid leukemias'. **Genes Chromosomes Cancer** [Epub-Vorveröffentlichung am 30.November 2005]

Schnittger, S., **Kohl, T. M.**, Haferlach, T., Kern, W., Hiddemann, W., Spiekermann, K., Schoch, C. 2005: 'KIT-D816 mutations in AML1-ETO positive AML are associated with impaired event-free and overall survival'. **Blood** [Epub-Vorveröffentlichung am 27.Oktober 2005]

Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., **Kohl, T. M.**, Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M., Buske, C. 2005: 'The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice'. **J Clin Invest** 115: 2159-2168.

**Kohl, T. M.**, Schnittger, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2005: 'KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor'. **Blood** 105: 3319-21.

Bagrintseva, K., Schwab, R., **Kohl, T. M.**, Schnittger, S., Eichenlaub, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2004: 'Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitors in FLT3-ITD-transformed hematopoietic cells'. **Blood** 103: 2266-75.

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BS <sup>3</sup>	[Bis(sulfosuccinimidyl)suberat]
BSA	bovines Serumalbumin
CBF	<i>core binding factor</i>
CCR	komplette zytogenetische Remission
CR	komplette Remission
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Ci	kombinatorischer Index
CML	chronische myeloische Leukämie
CSF1R	<i>colony stimulating factor-1 receptor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Disuccinimidylsuberat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>event free survival</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
env	<i>envelope</i>
FACS	fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FCS	fötales Kälberserum
FL	FLT3-Ligand
gag	gruppenspezifisches Antigen
GIST	gastrointestinale Stromatumore
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HGF	<i>hematopoietic growth factors</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HUGO	Human Genome Organization
ICC	interstitielle Zellen nach Cajal

## A b k ü r z u n g s v e r z e i c h n i s

IL-3R	Interleukin-3-Rezeptor
IP	Immunopräzipitation
ITD	<i>internal tandem duplication</i>
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LM	Längenmutation
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	molar (mol/l)
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MSCV	<i>murine stem cell virus</i>
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
OS	<i>median overall survival</i>
PI	Propidiumiodid
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pol	Polymerase-Multienzymkomplex
PTK	Proteintyrosinkinase(n)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase(n)
s-AML	sekundäre AML
SCF	<i>stem cell factor</i> (Steel-Faktor, KIT-Ligand)
SMCD	<i>systemic mast cell disease</i>
SMMHC	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
t-AML	therapiebedingte AML
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WT	Wildtyp

## Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	1
1.1	Die akute myeloische Leukämie .....	1
1.1.1	Die Pathogenese und Einteilung der akuten myeloischen Leukämie .....	1
1.1.2	Leukämien unter Beteiligung von <i>Core-Binding</i> -Faktoren (CBF-Leukämien) .....	3
1.1.3	Proteintyrosinkinasen als Onkogene.....	4
1.1.4	Der KIT-Rezeptor und aktivierende Mutationen.....	6
1.1.5	Der FLT3-Rezeptor und aktivierende Mutationen .....	7
1.1.6	Gezielte Therapie mit selektiven PTK-Inhibitoren.....	9
2	Zielsetzung der Arbeit.....	11
3	Material und Methoden .....	12
3.1	Material .....	12
3.1.1	Chemikalien und Enzyme .....	12
3.1.2	Lösungen und Puffer.....	12
3.1.3	Liste der Ausgangs-DNA-Konstrukte .....	14
3.1.4	Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	15
3.1.5	Liste der verwendeten Antikörper .....	16
3.1.6	Verwendete Zytokine und Inhibitoren.....	17
3.1.7	Verwendete PCR-Programme.....	17
3.1.8	Verwendete Software.....	18
3.2	Molekularbiologische Methoden .....	19
3.2.1	Ortsgerichtete Mutagenese.....	19
3.1.1	Herstellung von kompetenten Bakterien.....	19
3.1.2	Transformation von kompetenten Bakterien .....	20
3.1.3	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	21
3.1.4	Präparation von mRNA aus Zelllinien.....	21
3.1.5	Restriktionsanalyse von DNA-Konstrukten .....	21
3.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA.....	21
3.1.7	Sequenzierung von DNA-Proben .....	22
3.2	Methoden der Zellkultur .....	23
3.2.1	Zellkulturbedingungen.....	23



# Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Verwendung von retroviralen Vektoren .....	24
3.2.3	Transiente Transfektion .....	25
3.2.4	Stabile Transduktion .....	25
3.2.5	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien.....	25
3.2.6	Rekonstitution von Zytokinen und Inhibitoren und Lagerung .....	26
3.2.7	Bestimmung der Viabilität von Zellen mittels Trypanblau-Ausschluß- Test.....	26
3.2.8	MTT-Viabilitätstest.....	26
3.2.9	Apoptose-Test mit Annexin- und 7-AAD-Färbung.....	27
3.2.10	Zellzyklus-Analyse durch Färbung mit Propidiumiodid .....	29
3.2.11	Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflußzytometrie .....	29
3.2.12	Hungern von Zellen und Lysatpräparation .....	30
3.3	Immunologische Methoden.....	30
3.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford .....	30
3.3.2	Chemisches Crosslinking für Rezeptordimerisierung .....	31
3.3.3	Immunopräzipitation.....	31
3.3.4	SDS-PAGE-Gelelektrophorese.....	32
3.3.5	Immunoblotting.....	33
3.3.6	Strippen von Western Blots .....	34
3.4	Sonstige Methoden.....	34
3.4.1	Statistische Auswertung von Patientendaten .....	34
3.4.2	Bestimmung von kombinatorischen Indizes nach Chou und Talalay ....	35
3.4.3	Recherche in Online-Datenbanken .....	36
4	Ergebnisse .....	37
4.1	Funktionelle Charakterisierung von extrazellulären Mutationen des Protoonkogens <i>c-KIT</i> in Exon 8.....	37
4.1.1	Genaue Zuordnung der Mutationen zu den jeweiligen Ig-ähnlichen Domänen der Rezeptoren.....	37
4.1.2	<i>C-KIT</i> -Exon-8-Mutationen in Patienten weisen gemeinsame Muster auf.....	41
4.1.3	<i>C-KIT</i> -Exon-8-Mutanten wurden stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert.....	42
4.1.4	Exon-8-Mutationen in <i>c-KIT</i> führen im Ba/F3-Modell zu erhöhter Viabilität und Ansprechbarkeit auf Liganden.....	44
4.1.5	Exon-8-Mutationen führen zu erhöhter Apoptoseresistenz von transduzierten Ba/F3-Zellen im Vergleich zu Wildtyp.....	45
4.1.6	<i>KIT</i> -Mutante Exon8-3 zeigt spontane und erhöhte liganden-induzierte Rezeptordimerisierung.....	46

# Inhaltsverzeichnis

4.1.7	Kotransduktion des Wildtyp-Rezeptors mit Exon8-3-Mutante führt nicht zu erhöhter Transformation.....	50
4.1.8	Stimulation des KIT-Rezeptors bewirkt die Aktivierung der nachgeordneten Signalwege MAPK und AKT in Ba/F3-Zellen .....	51
4.1.9	Exon8-3-Mutante zeigt spontane und erhöhte liganden-induzierte Aktivierung von MAPK im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor.....	56
4.1.10	Alle getesteten Exon-8-Mutanten sprechen auf den selektiven PTK-Inhibitor Imatinib an .....	57
4.2	Kombinationen von PTK-Inhibitoren und konventioneller Chemotherapie .....	58
4.2.1	Die Kombination der ATP-Antagonisten PKC412 und SU5614 zeigt keinen Synergismus in Zellen mit FLT3-Längenmutationen.....	58
4.2.2	Die Kombination aus PKC412 bzw. SU5614 und Cytosin-Arabinosid zeigt Synergismus-Effekte .....	59
4.3	Charakterisierung des D324N-Polymorphismus im FLT3-Rezeptor ..	61
4.3.1	Der FLT3-D324N-Polymorphismus tritt gehäuft in Patienten mit myeloischen Leukämien auf.....	61
4.3.2	FLT3-D324N zeigt keine funktionellen Unterschiede zu Wildtyp-FLT3 im Zellkulturmodell .....	62
4.4	Punkt-Mutationen von Codon D816 von <i>c-KIT</i> in der AML .....	64
4.4.1	D816-Mutationen treten vorwiegend bei Patienten mit t(8;21) auf und verschlechtern deutlich deren Prognose.....	64
4.4.2	Der Imatinib-resistente KIT-D816V-Rezeptor spricht auf den PTK-Inhibitor PKC412 an .....	65
4.4.3	PKC412 führt zu G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Arrest in KIT-D816V-exprimierenden Ba/F3-Zellen .....	67
5	Diskussion .....	70
5.1	KIT-Exon-8-Mutationen zeigen <i>in vitro</i> transformierendes Potential.	70
5.1.1	Exon-8-Mutationen zeigen transformierendes Potential, vergleichbar mit dem extrazellulärer Mutationen in anderen RTK.....	70
5.1.2	KIT-Exon-8-Mutanten und KIT-WT unterscheiden sich nicht in der Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden .....	72
5.2	Die Kombination von PTK-Inhibitoren mit anderen Wirkstoffklassen könnte das klinische Ergebnis verbessern .....	74

## Inhaltsverzeichnis

5.3	Der FLT3-D324N-Polymorphismus könnte zu einer Prädisposition für myeloische Leukämien führen .....	75
5.4	Patienten mit KIT-Mutationen in Exon 8 und 17 könnten von neuen therapeutischen Optionen profitieren.....	77
6	Ausblick .....	80
7	Zusammenfassung .....	81
8	Abstract .....	82
9	Literaturverzeichnis.....	84
10	Lebenslauf.....	98

# **1 Einführung**

## **1.1 Die akute myeloische Leukämie**

### **1.1.1 Die Pathogenese und Einteilung der akuten myeloischen Leukämie**

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems, die durch klonale Expansion leukämischer Blasten mit daraus resultierender Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie gekennzeichnet ist. Von der De-novo-AML, also einer akuten Leukämie ohne erkennbare Ursachen wird die sekundäre und therapiebedingte AML (s- bzw. t-AML) unterschieden. Die s-AML geht dabei aus anderen hämatologischen Erkrankungen wie der chronisch-myelomonozytären Leukämie (CMML) oder Myelodysplasien bzw. chronischen myeloproliferativen Syndromen hervor, während die t-AML durch vorangegangene Chemotherapie mit Alkylantien oder Epipodophyllotoxinen ausgelöst werden kann (Levine und Bloomfield, 1992). Die Gesamtinzidenz der AML liegt in den USA bei 3-4 pro 100 000 Personen und für Personen im Alter von 80 Jahren bei über 70 pro 100 000 (U.S. Government Statistics, 2002).

Diagnose und Einteilung der AML erfolgt durch zytomorphologische Beurteilung von Blut- und Knochenmarksausstrichen in Kombination mit zytochemischer Analyse, v.a. mittels Myeloperoxidase-, Esterase- oder Sudanschwarz-Färbung. Nach WHO-Klassifikation liegt eine akute Leukämie bei einem Blastenanteil im Knochenmark von über 20% vor. Die Empfehlungen der WHO zur Klassifikation der AML bezieht neben Zytomorphologie und Zytochemie auch Molekular- und Zytogenetik mit ein, wobei in die erste Gruppe dieser Einteilung Fälle mit zytogenetisch und molekulargenetisch definierten Subtypen, wie t(8;21) oder inv(16) fallen (Harris, 1999). Die drei weiteren Untergruppen beinhalten AML mit multilineärer Dysplasie, therapieassoziierte AML und MDS sowie AML ohne anderweitige Klassifikation. Demgegenüber unterscheidet die FAB-(French-American-British-)Klassifikation die AML-Subtypen M1-M7, welche sich insbesondere im Reifegrad der Blasten und ihrer Linienzugehörigkeit unterscheiden (Bennett, 1976).

## E i n f ü h r u n g

AML M2 ist dabei beispielsweise eine myeloblastäre AML mit Ausreifung der Blasten bis zu Promyelozyten und darüber hinaus. 20% der Patienten mit AML M2 weisen eine Translokation der Chromosomen 8 und 21 (t(8;21)) auf. AML M4eo bezeichnet Blasten vom myelomonozytären Typ mit Eosinophilie. Besonderheit sind bei diesem Subtyp die Eosinophilen, die eine abnorme Granulation aufweisen. Eine AML M2 mit Eosinophilie lässt sich durch die Chloracetat-Reaktion davon abgrenzen (Fuchs, 2002).

Die Prognose der AML hängt neben Alter, Leukozytenzahl und Laktatdehydrogenase (LDH-) Spiegel des Patienten insbesondere vom Vorhandensein spezieller zytogenetischer Marker ab. Zu prognostisch günstigen Faktoren werden dabei die Translokationen 15;17 und 8;21 sowie die Inversion des Chromosoms 16 gerechnet (Haferlach, 2003; Mrozek, 2001; Mrozek, 1997; Plantier, 1994), wohingegen unbalancierte chromosomale Aberrationen wie beispielsweise -5, 5q-, 7q- neben komplexem Karyotyp zu einer schlechteren Prognose führen. Überdies werden auch Längenmutationen im FLT3-Rezeptor (FLT3-LM) mit einer erhöhten Rezidivrate in Verbindung gebracht (Kiyoi, 1999).

Ziel einer Behandlung der AML ist zunächst das Erreichen einer kompletten Remission (CR), also der Eradikation der malignen Zellpopulation bis unter die morphologisch-klinische Nachweisgrenze, wobei zur Ermittlung der minimalen Resterkrankung (MRD) immer häufiger auch sehr sensitive PCR-Techniken herangezogen werden. Es gibt sowohl für Induktionstherapie als auch für Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie eine Reihe von unterschiedlichen Regimen, beispielsweise TAD-HAM bzw. HAM-HAM als Doppelinduktion wie in der AML CG-99-Studie, wo 6-Thioguanin-Cytosin-Arabinosid-Daunorubicin bzw. Hochdosis-Cytosin-Arabinosid-Mitoxantron mit oder ohne Gabe von G-CSF verabfolgt wird (Buchner, 2003; Hiddemann, 2004).

Wie auch im Rahmen anderer maligner Erkrankungen zu beobachten, gibt es bei der AML eine kleine Subpopulation so genannter leukämischer Stammzellen, welche über die Kapazität verfügen, sich selbst zu erneuern (*'self-renewing capacity'*) (Huntly und Gilliland, 2005). Diese Stammzellen werden in der Pathogenese der Leukämie im Gegensatz zu den physiologisch auftretenden adulten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) als *'leukemia stem cells'* (LSC) bezeichnet. Bahnbrechend für die Charakterisierung der LSC war die Etablierung von (vorwiegend murinen) Xenotransplantations-Modellen, im Rahmen derer immundefiziente Mäuse nach subletaler Bestrahlung sowohl mit HSC als auch mit LSC transplantiert werden können (McCune, 1988). Neuere Studien deuten darauf hin, dass

auch solide Tumore wie Tumore der Brust oder des zentralen Nervensystems auf die Transformation von adulten somatischen Stammzellen zurückzuführen sind (Al-Hajj und Clarke, 2004). Diese Zellen bleiben während des gesamten Lebens bestehen und können daher die für eine maligne Transformation notwendigen Mutationen akkumulieren.

## **1.1.2 Leukämien unter Beteiligung von *Core-Binding*-Faktoren (CBF-Leukämien)**

Die Familie der *Core-Binding*-Faktoren (CBF) umfasst drei DNA-bindende CBF $\alpha$ -Untereinheiten (nach offizieller HUGO-Nomenklatur RUNX1, RUNX2, RUNX3) sowie eine CBF $\beta$ -Untereinheit, welche nicht-DNA-bindend ist (Speck und Gilliland, 2002). Alle CBF $\alpha$ -Untereinheiten besitzen eine runt-bindende Domäne, die jeweils dieselbe PyG-PyGGT-Konsensus-Sequenz erkennt und die Transkription entsprechender Zielgene aktivieren bzw. reprimieren kann. Die CBF $\beta$ -Untereinheit ist hingegen nicht in der Lage, direkt an DNA zu binden, erhöht aber die Affinität von gebundenen CBF $\alpha$ -Untereinheiten und schützt diese vor Proteolyse (Ogawa, 1993; Huang, 2001). Homozygoter Knock-out von AML1 (RUNX1) oder CBF $\beta$  verursacht einen Block in der definitiven Blutbildung, was im Mausmodell zur Letalität im Embryonalstadium führt (Okuda, 1996; Sasaki, 1996). CBF sind ein häufiges Ziel von Gen-Rearrangements und Mutationen, die mit der Entstehung akuter Leukämien beim Menschen in Verbindung gebracht werden. Die drei häufigsten Translokationen sind t(8;21)(q22;q22) und inv(16)(p13;q22), die bei ungefähr 25% der adulten AML-Patienten auftreten, sowie t(12;21)(p13;q22), welche in ungefähr 20-25% der Fälle von pädiatrischer ALL gefunden wird (Speck und Gilliland, 2002). Produkt der Translokation 8;21 ist das Fusionsprotein AML1-ETO, welches die DNA-bindende Domäne von AML1 an das nahezu vollständige ETO-Protein fusioniert. Inversion des Chromosoms 16 führt zur Bildung des CBF $\beta$ -SMMHC-Fusionsproteins. Hierbei ist die RUNX-1-Bindungsdomäne von CBF $\beta$  an die schwere Kette des Myosins aus dem glatten Muskel gekoppelt. Im murinen Knock-in-Modell ähnelt die durch AML1-ETO bzw. CBF $\beta$ -SMMHC hervorgerufene embryonale Letalität dem Phänotyp, der auch nach homozygotem Knock-out von AML1 bzw. CBF $\beta$  beobachtet wird (Okuda, 1998; Castilla, 1996). Dieser beobachtete Phänotyp wird im Falle von AML1-ETO auf die Rekrutierung eines nukleären transkriptionellen Repressorkomplexes durch ETO zurückgeführt, woran

# E i n f ü h r u n g

beispielsweise SIN3 und Histondeacetylasen beteiligt sind (Gelmetti, 1998; Lutterbach, 1998). CBF $\beta$ -SMMHC hingegen soll AML1 durch Bindung an Aktinfilamente mittels der  $\alpha$ -helikalen Domäne von SMMHC im Zytoplasma anreichern und somit ebenfalls dessen Funktion im Zellkern inhibieren (Adya, 1998).

Sowohl AML1-ETO als auch CBF $\beta$ -SMMHC sind spezifisch mit bestimmten genetischen Subtypen der AML assoziiert. Translokation 8;21 tritt bevorzugt in der AML M2 auf, während eine Inversion des Chromosoms 16 fast ausschließlich in der AML M4eo zu detektieren ist. Beide Unterformen der AML werden mit Hochdosis-Cytarabin als Konsolidierungstherapie behandelt und die betroffenen Patienten besitzen eine gute Prognose.

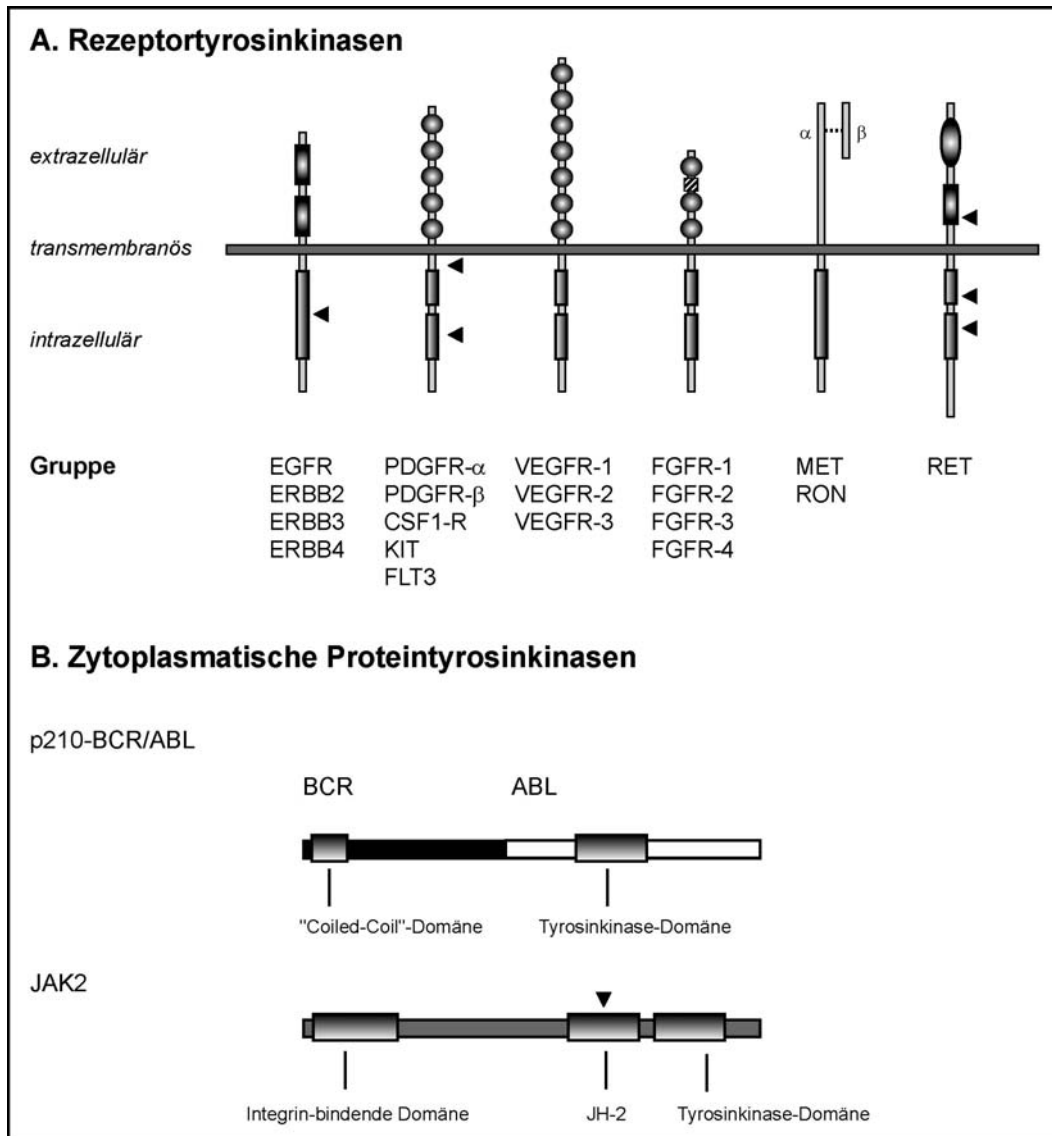
Während die Expression von CBF $\beta$ -SMMHC vom nativen CBF $\beta$ -Promoter in Mäusen zu embryonaler Letalität führt, sind Mäuse, in denen das Protein vom hMRP8-Promoter aus translatiert und daher nicht in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, lebensfähig und entwickeln über 15 Monate keine Leukämien (Kogan, 1998). Koexpression mit der konstitutiven NRAS-Mutante G12D bewirkte jedoch eine signifikant höhere Rate von Myelodysplasien. Diese und andere Studien lassen darauf schließen, dass die Voraussetzung für das Entstehen von CBF-Leukämien ein weiterer 'hit' ist, der zu einem Wachstumsvorteil der betroffenen hämatopoetischen Vorläuferzellen führt (Schessl, 2005; Castilla, 1999). Translokationen unter Beteiligung von CBF, wie t(3;21), treten beispielsweise auch in einigen Fällen von BCR-ABL-positiver CML auf (Speck und Gilliland, 2002).

## 1.1.3 Proteintyrosinkinasen als Onkogene

Proteintyrosinkinasen (PTK) sind an der Entstehung und am Verlauf einer Reihe maligner Neoplasien beteiligt (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Vlahovic und Crawford, 2003; Vogelstein und Kinzler, 2004; Bell und Ryan, 2005). Diese können, wie die hier vorgestellten Protoonkogene *c-KIT* und *FLT3*, Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder zytoplasmatische Tyrosinkinasen, wie z.B. BCR-ABL oder JAK2, sein. RTK sind transmembranöse Proteine, die eine intrinsische, durch den passenden Liganden aktivierbare intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne besitzen. Nach dem Grad der Homologie der Aminosäuresequenz in der Kinase-Domäne werden die RTK in 20 Klassen eingeteilt (Reilly, 2003). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht von PTK, die mit der Pathogenese von Malignomen in Verbindung

# Einführung

gebracht werden. Dazu gehören beispielsweise Rezeptortyrosinkinasen aus der EGFR-Familie, die in der Pathogenese von Mamma- und Ovarial-Karzinomen eine Rolle spielen (Menard, 2004; Seiden, 2001) oder Mitglieder der PDGFR-Familie, die – wie weiter unten beschrieben - an der Entstehung von hämatologischen Neoplasien beteiligt sind.



**Abbildung 1: Proteintyrosinkinasen mit wichtiger Bedeutung für die Initiierung oder Progression maligner Tumore**

(A) Rezeptortyrosinkinasen; Legende: cisteinreiche Domäne; Ig-ähnliche Domäne; „acidic-box“; Cadherin-ähnliche Domäne; gibt den Ort häufiger Mutationen an

(B) zytosolische Tyrosinkinasen



Die Aktivierung dieser Kinasen ist unter physiologischen Umständen streng reguliert. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Rezeptoroligomerisierung mit anschließender Tyrosin-Autophosphorylierung am intrazellulären Teil des Rezeptors (Heldin, 1995). Im Grundzustand ist die Aktivität der Kinase ausgeschaltet. Bestimmte Mutationen oder Fusionen mit anderen Proteinen können die Kinasen jedoch auch konstitutiv aktivieren und eine permanente Signalaktivität hervorrufen.

## 1.1.4 Der KIT-Rezeptor und aktivierende Mutationen

Das Protoonkogen *c-KIT* ist auf Chromosom 4q12 lokalisiert und kodiert für einen Rezeptor mit einer Größe von 976 Aminosäuren (Lyman und Jacobsen, 1998). KIT gehört zur Klasse III der Rezeptortyrosinkinasen wie auch FLT3, CSF1R, PDGFRA und PDGFRB. KIT besitzt neun potentielle N-Glykosylierungsstellen im extrazellulären Bereich, hingegen keine Stellen für O-Glykosylierung. Nach Immunopräzipitation erscheinen zwei Banden, die eine Größe von ungefähr 108 kDa, was dem unglykosylierten, bzw. 140-155 kDa besitzen, was dem glykosylierten Rezeptor entspricht. Durch *pulse-chase*-Analysen wurde gezeigt, dass das 155 kDa schwere Protein aus dem leichteren hervorgeht (Blume-Jensen, 1991). Die Größe des KIT-Rezeptors variiert nach dem betreffenden Gewebe, in dem er exprimiert wird (Majumder, 1988). Alternatives Splicing resultiert in verschiedenen KIT-Isoformen, die sich durch An- und Abwesenheit eines vier Aminosäuren langen Peptides (Gly-Asn-Asn-Lys, 510 bis 513) bzw. eines Serins an Position 715 unterscheiden, wobei alle Isoformen in Leukämie-Zelllinien und in primären AML-Zellen exprimiert werden (Crosier, 1993). KIT-Expression wurde nur in Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie auf mRNA- und Proteinebene gefunden, nicht aber in Zellen von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (Ikeda, 1993; Wang, 1989).

KIT ist physiologisch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen (zu etwa 70% auf CD34+ Zellen), Melanozyten, Mastzellen und den interstitiellen Zellen nach Cajal (ICC) exprimiert (Ashman, 1999). In homozygoten Knock-out-Modellen von KIT wurde Hypopigmentierung, Sterilität und ein Fehlen von ICC beobachtet (Reilly, 2003). Im blutbildenden System kommt es zur Verminderung erythroider Vorläuferzellen und Mastzellen.

Eine große Anzahl aktivierender Mutationen wurde für das *KIT*-Protoonkogen identifiziert, die mit der Pathogenese einer Reihe nicht-verwandter Krankheiten in Verbindung

gebracht wurden (Longley, 2001; Taylor und Metcalfe, 2000; Sattler und Salgia, 2004). Mutationen in der Aktivierungsschleife von KIT (Exon-17-Mutationen) an der Position D816 treten insbesondere bei Patienten mit systemischer Mastrozytose (SMCD) auf, wobei bei pädiatrischen und adulten SMCD-Patienten mit D816-Mutationen ein schwerer Verlauf zu beobachten ist (Longley, 1999; Worobec, 1998). Sie wurden aber ebenfalls bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und Keimzelltumoren beschrieben (Beghini, 1998; Tian, 1999). Aktivierende KIT-Mutationen wurden desweiteren in bis zu 90% der Patienten mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) gefunden, wobei am häufigsten Exon 11 des *KIT*-Gens betroffen ist, und die Aminosäuren 550 bis 560 eine Hot-Spot-Region darstellen (Hirota, 1998; Longley, 2001). Diese befinden sich im Bereich der inhibitorischen Alpha-Helix von KIT und führen wie Exon-17-Mutationen zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins. Im Knock-in-Modell entwickelten Mäuse, die heterozygot für die Deletion von V558 waren, Symptome eines GIST (Sommer, 2003). Wie von Gari et al. zuerst berichtet, treten in etwa 30% der AML-Patienten mit AML M4eo Mutationen von KIT in Exon 8 auf, die zu einer erhöhten Rezidivrate bei den betroffenen Patienten führen (Gari, 1999; Care, 2003). Die Mutationen bestehen aus kleineren Deletionen mit oder ohne Insertionen, die jedoch den Leserahmen erhalten.

## **1.1.5 Der FLT3-Rezeptor und aktivierende Mutationen**

Das *FLT3*-Gen befindet sich auf Chromosom 13q12 und kodiert einen Rezeptor von 993 Aminosäuren. Der FLT3-Rezeptor besitzt zehn extrazellulär gelegene N-Glykosylierungsstellen. Wie KIT ist auch FLT3 in Form einer Doppelbande nach Immunpräzipitation und Western-Blot nachweisbar (Lyman und Jacobsen, 1998). FLT3 ist insbesondere auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Lyman und Jacobsen, 1998), wobei Expression vorwiegend in frühen myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen nachgewiesen wurde, nicht aber in Erythrozyten, Megakaryozyten oder Mastzellen (Stirewalt und Radich, 2003). Die Applikation von FLT3-Ligand (FL) führt *in vivo* zur Expansion von dendritischen Zellen und wurde bereits als Adjuvans in der Tumorthherapie erprobt (Fong, 2001).

Ein Knock-out von FLT3 im Mausmodell führte zu relativ unbeeinträchtigter Hämatopoese mit einer geringen Verkleinerung der Pro-B- und Prä-B-Zell-Kompartimente

## E i n f ü h r u n g

(Mackarechtschian, 1995). Erst eine gemeinsame Ausschaltung von FLT3 und KIT rief letale Defekte in der Blutbildung hervor (Mackarechtschian, 1995).

Aktivierende Mutationen im *FLT3*-Gen wurden bei Patienten mit AML, ALL und MDS identifiziert. FLT3-Längenmutationen (FLT3-LM) treten bei 15-35% der Patienten in der AML und bei 5-10% der Patienten in der ALL auf (Abu-Duhier, 2000; Schnittger, 2002). Diese betreffen Exon 13 und 14 des *FLT3*-Gens und entstehen dadurch, dass ein Teil der juxtamembranösen Sequenz in-frame dupliziert und in der gleichen Orientierung wie die Originalsequenz eingefügt wird. Einzel-Strang-DNA der Sequenz von D593 bis K602 enthält ein Palindrom, so dass cis-hybridisierte DNA in Haarnadelstruktur (*hairpin*) während der Replikation in diesem Bereich zur Ausbildung einer LM führen kann (Kiyoi, 1998). Es ist anzunehmen, dass LM, die zu einer Leserasterverschiebung führen, keinen Proliferationsvorteil und damit Selektion für die betreffenden Zielzellen bewirken und daher in Patientenproben nicht detektierbar sind. Die Ergebnisse der Expression von FLT3-LM in murinen Knochenmarktransplantationsmodellen scheint in hohem Maße von der verwendeten Mauslinie und dem diesbezüglichen genetischen Hintergrund abzuhängen (Schessl, 2005; Ono, 2005; Kelly, 2002), wobei Kelly et al. die Entstehung eines myeloproliferativen Syndroms in BALB/c Mäusen schilderten (Kelly, 2002), dies aber nicht in C57BL/CH3-Mäusen reproduziert werden konnte (Schessl, 2005).

Neben FLT3-LM treten in der AML zu 5-10% auch Punktmutationen an Position D835 in der Tyrosinkinasedomäne von FLT3 (FLT3-TKD) auf, welche die homologe Aminosäure zu KIT-D816 darstellt. Die strukturelle Konsequenz dieser Punktmutationen besteht u.a. darin, dass im aktiven Zentrum ein sogenannter Asx-Turn, d.h. eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der Seitenkette eines Aspartat- oder Asparagin-Restes und dem übernächsten Stickstoff-Atom der Polypeptidkette, gestört wird. Dadurch werden Wechselwirkungen, die im Normalzustand die Aktivierungsschleife in geschlossener Konformation halten, aufgehoben und sie wird in Richtung Solvent exponiert (Torrent, 2004). Dies würde die konstitutive Aktivierung der an dieser Stelle mutierten Rezeptoren sowie die 9fach erhöhte Affinität zu ATP erklären (Heinrich, 2002). Ein ähnlicher Mechanismus wird für die von Spiekermann et al. identifizierte FLT3-840GS-Insertion (Spiekermann, 2002a) postuliert, die ebenfalls die Verankerung der Aktivierungsschleife im aktiven Zentrum lösen soll (Torrent, 2004). Eine Mutation an der homologen Position in KIT (N822) wurde in der AML Zelllinie Kasumi-1 gefunden (Larizza, 2005).

## 1.1.6 Gezielte Therapie mit selektiven PTK-Inhibitoren

Mutierte und damit konstitutiv aktivierte Rezeptortyrosinkinasen eignen sich in hohem Maße als Zielstrukturen in der Therapie von hämatologischen Neoplasien (Tallman, 2005; Wadleigh, 2005). Am Beispiel des kleinmolekularen ABL-Inhibitors Imatinib mesilat (Glivec<sup>®</sup>) wurde sehr eindrucksvoll die Wirksamkeit dieses Prinzips für Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) und gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), welche nur sehr schlecht auf konventionelle Chemotherapie ansprechen, unter Beweis gestellt (Druker, 2001; Sawyers, 2002; van Oosterom, 2001). Imatinib inhibiert die zytoplasmatischen Kinasen ABL und BCR-ABL sowie die Rezeptortyrosinkinasen KIT und PDGFRB im submikromolaren Bereich, nicht aber andere Tyrosin- oder Serin-Threonin-Kinasen (Buchdunger, 1996; Carroll, 1997). FLT3 gehört aufgrund der sterischen Hinderung der Inhibitor-Bindung durch ein nicht-konserviertes Phenylalanin (F691) nicht zu den Zielproteinen (Bohmer, 2003). Ein Problem bei der Imatinib-Behandlung von CML-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung, z.B. in Blastenkrise, stellt die Entstehung von Resistenzen dar, die insbesondere durch Punktmutationen in BCR-ABL, wie beispielsweise T315I, auftreten (Hochhaus, 2001).

Seit der erfolgreichen Anwendung von Imatinib in der Therapie der Philadelphia-Chromosom-positiven CML wurde über die Wirksamkeit einer Reihe weiterer kleinmolekularer Inhibitoren berichtet, die insbesondere auf das in der AML sehr vielversprechende Target FLT3 abzielen sollten. Mindestens vier davon befinden sich bereits in Phase-I- oder Phase-II-Studien, PKC412, CEP-701, die Indolinone SU11248 und SU5416 sowie MLN518 (Übersicht bei: Stirewalt und Radich, 2003; Wadleigh, 2005). Das Benzoylstaurosporin PKC412, welches neben FLT3 und KIT auch VEGF-Rezeptor und Proteinkinase C (PKC) hemmt, zeigte beispielsweise bei 14 von 20 ausgiebig vorbehandelten AML-Patienten eine Blastenreduktion um 50%, und es wurde demonstriert, dass die Autophosphorylierung von FLT3 in repräsentativen Patienten wirkungsvoll inhibiert werden konnte (Stone, 2005). Die Aktivität von PKC412 bei AML-Patienten geht dabei aber nicht über jene von Imatinib hinaus, die bei CML-Patienten in der Blastenkrise erzielt werden kann.

## Einführung

Eine Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten kleinmolekularen Inhibitoren mit Alternativnamen und Strukturformel zeigt Abbildung 2. Das Spektrum des Indolinons SU5614 umfasst FLT3, KIT und VEGFR2 (Spiekermann, 2003; Spiekermann, 2002b).

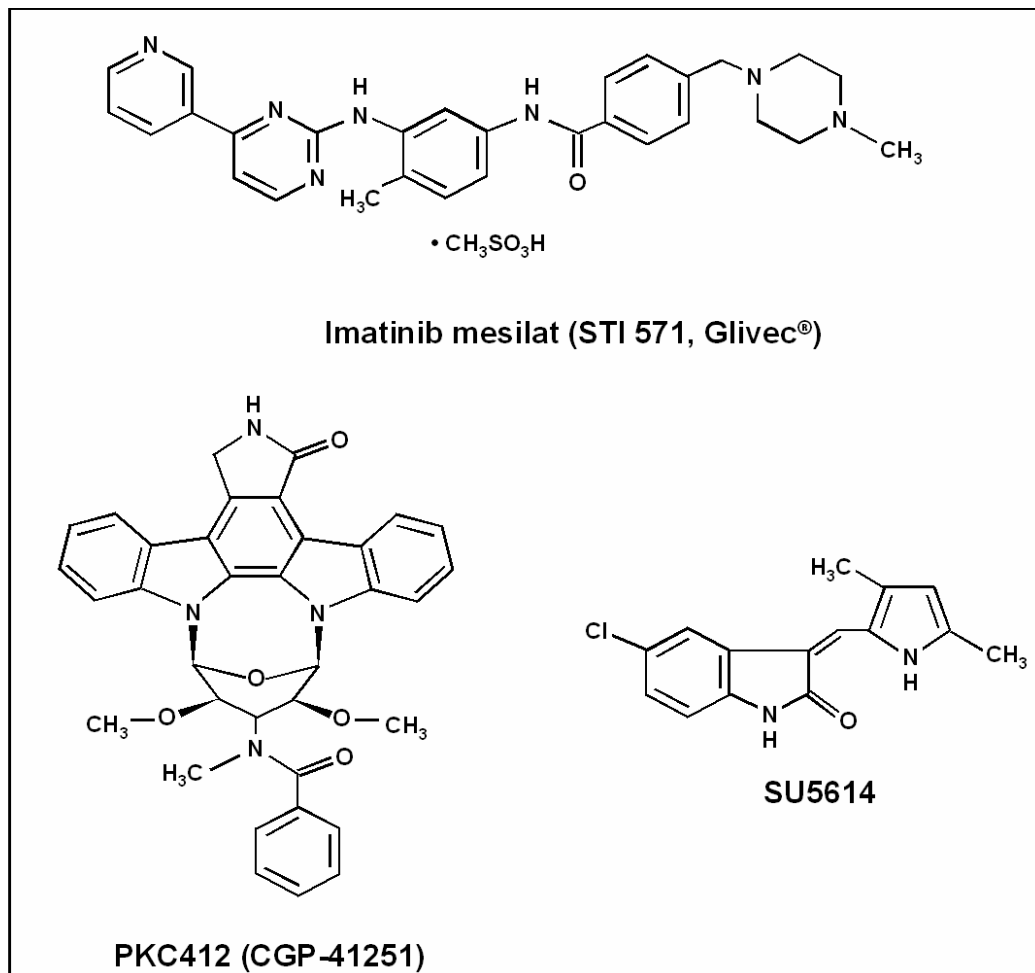


Abbildung 2: Strukturformeln von verwendeten selektiven PTK-Inhibitoren

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Eine große Anzahl von aktivierenden Mutationen in Genen, die für Rezeptortyrosinkinasen kodieren, ist bereits identifiziert und ihre Rolle in der Pathogenese von malignen Neoplasien aufgezeigt worden. Daneben existiert jedoch eine Reihe weiterer Mutationen, die seit ihrem Bekanntwerden nicht näher untersucht wurden, und deren Stellenwert für die Krankheitsentstehung beispielsweise der akuten myeloischen Leukämie noch unbekannt ist. Hierzu zählen z.B. die vorwiegend in CBF-Leukämien auftretenden Exon-8-Mutationen des Protoonkogens *c-KIT* und die FLT3-D324N-Variante. Diese beiden extrazellulär gelegenen Mutationen treten verhältnismäßig häufig in der AML auf - Exon-8-Mutationen zu etwa 2-3% und FLT3-D324N, wie hier ermittelt, zu 6.4% - , so dass eine nähere Untersuchung als lohnenswert erschien. Überdies sollte auch das Ansprechen der charakterisierten Mutationen auf selektive PTK-Inhibitoren wie Imatinib oder PKC412 getestet werden. Während die durch KIT-WT nach Ligandenstimulation ausgelöste Signaltransduktion durch Imatinib unterbunden werden kann, sprechen Mutationen in der Aktivierungsschleife von KIT (D816-Mutationen in Exon 17) nicht darauf an. Es sollte überprüft werden, ob sich strukturell nicht-verwandte PTK-Inhibitoren zur Hemmung dieses mutierten Rezeptors eignen, da ein Vorliegen dieser Mutationen – wie hier gezeigt – die Prognose von Patienten mit günstigem Karyotyp verschlechtert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wie Lösungsmittel, Protease-Inhibitoren und sonstige Reagenzien wurden von Merck KG (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Enzyme wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. Main) bzw. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) gekauft.

#### 3.1.2 Lösungen und Puffer

Zellkulturmedien wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

Selbst hergestellte Lösungen:

<b>Crosslinking-Puffer</b>	Na <sub>2</sub> (HPO <sub>4</sub> )	0.36g
	KCl	0.05g
	NaCl	2.0g
	<hr/>	
	Aqua dest.	ad 250ml
	pH ad 7.6 mit HCl	
<b>Elektrophorese-Puffer, 10x</b>	Tris	151.4g
	Glycin	720.65g
	Natriumdodecylsulfat	50.0g
	<hr/>	
	Aqua purificata	ad 5000ml
	pH 8,3 mit HCl	
<b>G-NET</b>	Gelatine	2.5g
	NET, 10x	100ml
	<hr/>	
	aufkochen, bis zur Transparenz der Lösung rühren	
	Aqua purificata	ad 1000ml
<b>HBS-Lösung</b>	Hepes	5.96g
	Natriumchlorid	8.18g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0.133g
	<hr/>	
	Aqua purificata	ad 50ml
	versch. pH-Werte (6.9, 7.2, 7.5) einstellen und autoklavieren	

## Material und Methoden

<b>KCM, 5x</b>	3M KCl	5,0ml
	1M CaCl <sub>2</sub>	4.5ml
	1M MgCl <sub>2</sub>	7.5ml
	Aqua dest.	13.0ml
<b>Lysis-Puffer für PI-Färbung</b>	Natriumcitrat	100mg
	Triton X-100	100µl
	Propidiumiodid	2mg
	(zugesetzt als Lösung)	
	Aqua purificata	ad 100ml
	pH 8.0 mit HCl	
<b>Lysispuffer für Western- Blot</b>	1 M Hepes pH 7.5	25ml
	5 M Natriumchlorid	15ml
	200 mM EGTA	2.5ml
	Glycerol 50%	100ml
	Triton X-100	5ml
	Natriumfluorid	2.1g
	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	2.23g
	Aqua purificata	ad 500ml
<b>Natriumacetat-Lösung, 3 M</b>	Natriumacetat	18.46g
	Aqua purificata	ad 75ml
	pH 5.5 mit Eisessig (>8ml) und autoklavieren	
<b>NET, 10x</b>	NaCl	438.3g
	Na <sub>2</sub> EDTA	93.6g
	Tris	302.85g
	Triton X-100	25.0g
	Aqua purificata	ad 5000ml
	pH 7.7 mit HCl	
<b>Ponceau-Lösung</b>	Ponceau S	0.5g
	Eisessig	1ml
	Aqua purificata	100ml
<b>Proben-Auftrags- Puffer</b>	Tris	0.227g
	Natriumdodecylsulfat	0.600g
	Dithiothreitol	2.4g
	Glycerin	3ml
	Bromphenolblau	2µg
	Aqua purificata	7ml
<b>Stripping-Lösung (S0078)</b>	2-Mercaptoethanol	7.0ml
	Tris	7.56g
	Natriumdodecylsulfat	20.0g
	Aqua purificata	ad 1000ml
	pH 6.7 mit HCl	
<b>TBE, 5x</b>	Tris	54.0g
	Borsäure	27.5g



## Material und Methoden

	0,5M EDTA-Lösung	20.0 ml	
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
<b>TBS, 10x</b>	Tris	12.11g	
	NaCl	87.66g	
	Aqua purificata	ad 1000ml	
	pH 8.8 mit HCl		
<b>TBST</b>	TBS, 10x	100ml	
	Tween 20	5ml	
	Aqua purificata	ad 1000ml	
<b>Tfbl</b>	KOAc	30mM	1.47g
	KCl	100mM	3.72g
	MnCl <sub>2</sub>	50mM	4.95g
	CaCl <sub>2</sub>	10mM	0.55g
	Glycerin	15% v/v	75ml
	Aqua dest.		ad 500ml
	Steril-Filtration, Lagerung bei 4°C		
<b>Tfbll</b>	NaMOPS	1M NaMOPS (7.0)	5ml
	1M CaCl <sub>2</sub>	75mM	4.16g
	KCl	10mM	0.37g
	Glycerin	15% v/v	75ml
	Aqua dest		ad 500ml
	Steril-Filtration, Lagerung bei 4°C		
<b>Transblot ohne Methanol</b>	Tris	72.75g	
	Glycin	36.63g	
	Natriumdodecylsulfat	0.475g	
	Aqua purificata	ad 1000ml	
<b>Transblot-Puffer</b>	Transblot o. Methanol	80ml	
	Methanol	200ml	
	Aqua purificata	ad 1000ml	
<b>Tris-HCl-Puffer 1.5 M (pH 6.8 bzw. 8.8)</b>	Tris	908.5g	
	Aqua purificata	ad 5000ml	
	pH 6.8 bzw. 8.8 mit HCl		

### 3.1.3 Liste der Ausgangs-DNA-Konstrukte

MIY-FLT3-ITD-w51	ursprüngliches Konstrukt von D. G. Gilliland (Harvard Medical School, Boston, MA, USA)
MIY-FLT3-WT	ursprüngliches Konstrukt pcDNA6-FLT3-WT von O. Rosnet (Molecular Oncology Unit, Institut National de la

## Material und Methoden

	Santé et de la Recherche Médicale [INSERM], Marseille, Frankreich)
MIY-KIT-D816V	ursprüngliches Konstrukt pRUFneo-KIT-D816V von L. K. Ashman (University of Adelaide, Australien)
pMSCV-EGFP-IRES (MIG)	Christian Buske, Med. III, Klinikum Grosshadern, ursprünglich von R. K. Humphries (University of British Columbia, Vancouver, Kanada)
pMSCV-EYFP-IRES (MIY)	Christian Buske, Med. III, Klinikum Grosshadern, ursprünglich von R. K. Humphries (University of British Columbia, Vancouver, Kanada)

### 3.1.4 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Primer zur Mutagenese von *c-KIT* (die Stelle der eingefügten Mutation ist hervorgehoben):

c-KIT WT-FW (aus D816V)	5'-GGTCTAGCCAGAG <b>A</b> CATCAAGAATGATTC-3'
c-KIT WT-RV (aus D816V)	5'-GAATCATTCTTGAT <b>G</b> TCTCTGGCTAGACC-3'
c-KIT Δ419-FW	5'-CCTGACTTAC__AGGCTCGTGAATGGC-3'
c-KIT Δ419-RV	5'-GCCATTCACGAGCCT__GTAAGTCAGG-3'
c-KIT Δ418_419-FW	5'-CAGAAATCCTGACT__ __AGGCTCGTGAATGGC-3'
c-KIT Δ418_419-RV	5'-GCCATTCACGAGCCT__ __AGTCAGGATTTCTG-3'
c-KIT T417I/Δ418_419-FW	5'-CAGAAATCCTG <b>ATT</b> __ __AGGCTCGTGAATGGC-3'
c-KIT T417I/Δ418_419-RV	5'-GCCATTCACGAGCCT__ __ <b>AAT</b> CAGGATTTCTG-3'

Primer zur Sequenzierung von *c-KIT*:

MIY FW 1362seq	5'-CGATCCTCCCTTTATCCAG-3'	ab 1362 v. pMSCV
c-kit FW Pr1	5'-ATGAGAGGCGCTCGCGG-3'	22-39 Bp von <i>c-KIT</i>
c-kit FW Pr2	5'-CAACGACACGCTGGTCCG-3'	408-425 Bp
c-kit FW Pr3	5'-CAACGTTGACTATCAGTTCAG-3'	839-859 Bp
c-kit FW Pr3a	5'-CACCGAAGAGGCACTTAC-3'	1173-1191 Bp
c-kit FW Pr4	5'-GCTTACAACGATGTGGGC-3'	1498-1515 Bp
c-kit FW Pr5	5'-GTCTGAACTCAAAGTCCTG-3'	1935-1953 Bp
c-kit FW Pr6	5'-CAAAGGGCATGGCTTTCC-3'	2351-2378 Bp

## Material und Methoden

c-kit FW Pr7                      5'-CAAGATGATCAAGGAAGGC-3'                      2661-2679 Bp

Primer zur Mutagenese von FLT3:

FLT3 D324N-FW                      5'-CAGTGGCAAGAAACAACACCCGGATACTACACTTG-3'

FLT3 D324N-RV                      5'-CAAGTGTAGTATCCGGTGTTGTTTCTTGCCACTG-3'

Primer zur Sequenzierung von *FLT3*:

pMSCVkurz                      5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTCG-3'                      1-260 Bp v. FLT3

pFLT3-2                      5'-AAGACCTCGGGTGTGCGTTG-3'                      260-600 Bp

pFLT3-3                      5'-ACGCCCTGGTCTGCATATC-3'                      600-940 Bp

pFLT3-4 (843F)                      5'-CGGGCTCACCTGGGAATTAG-3'                      940-1280 Bp

pFLT3-5                      5'-TTTGCAATCATAAGCACCAGC-3'                      1280-1620 Bp

pFLT3-6                      5'-ATACAATTCCCTTGGCACATC-3'                      1620-1960 Bp

pFLT3-7                      5'-AACAGGAGTCTCAATCCAGG-3'                      1960-2300 Bp

pFLT3-8 (2205F)                      5'-CAGCATGCCTGGTTCAAGAG-3'                      2300-2640 Bp

pFLT3-9                      5'-AGGCATCTACACCATTAAGAG-3'                      2640-2980 Bp

### 3.1.5 Liste der verwendeten Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<b>AKT</b>	rabbit polyklonal	#9272 (CST)
<b>β-Actin (AC-15)</b>	mouse monoklonal	A5441 (Sigma)
<b>c-KIT (C-19)</b>	rabbit polyklonal	sc-168
<b>FLT3/FLK-2 (C-20)</b>	rabbit polyklonal	sc-479
<b>FLT3/FLK-2 (S-18)</b>	rabbit polyklonal	sc-480
<b>p44/42 MAP-Kinase</b>	rabbit polyklonal	#9102
<b>phospho-AKT (Ser-473)</b>	rabbit polyklonal	#9271
<b>p-c-KIT (Tyr-719)</b>	rabbit polyklonal	#3391
<b>phospho p44/p42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204)</b>	rabbit polyklonal	#9101
<b>phospho-STAT3 (Tyr-705)</b>	rabbit polyklonal	#9131

## Material und Methoden

<b>phospho-STAT5 (Tyr-694)</b>	rabbit polyklonal	#9351
<b>p-Tyr (PY99)</b>	mouse monoklonal	sc-7020
<b>STAT3 (C-20)</b>	rabbit polyklonal	sc-482
<b>STAT5 (C-17)</b>	rabbit polyklonal	sc-835
<b>anti-maus IgG-HRP</b>	goat (sekundär)	sc-2005
<b>anti-rabbit IgG-HRP</b>	goat (sekundär)	A0545
<b>CD117-PE IgG1</b>	mouse	IM1360 (Beckmann Coulter)
<b>CD135-PE IgG1</b>	mouse	IM2234
<b>IgG1-PE Kontrolle</b>	mouse	IM0571-75AA

### 3.1.6 Verwendete Zytokine und Inhibitoren

FLT3-Ligand, rekombinant human	PromoCell (Heidelberg)	[C-67110]
IL-3, rekombinant murin	Biosource (Camarillo, CA, USA)	[PMC0034]
SCF, rekombinant human	PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA)	[300-07]

Imatinib (STI 571)	Dr. Elisabeth Buchdunger (Novartis, Basel, Schweiz)
LY294002	Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden)
PKC412 (CGP 41251)	Dr. Thomas Meyer (Novartis, Basel, Schweiz)
PD98059	Calbiochem-Novabiochem
SU5614	Calbiochem-Novabiochem

### 3.1.7 Verwendete PCR-Programme

#### PCR-Programm für Mutagenese:

Heated lid:	105°C
Hot start:	off
Initial denaturation:	95°C 2min.

#### Loop 1:

1 Zyklus	→	68°C 5min.
----------	---	------------

## Material und Methoden

### Loop 2:

4 Zyklen → 95°C 1min.  
53°C 1min. 30sek.  
68°C 16min.

### Loop 3:

14 Zyklen → 95°C 1min.  
61°C 1min.  
65°C 16min.

### Loop 4 (finale Verlängerung):

1 Zyklus → 68°C 7min.

### Final:

∞ → 4°C

### PCR-Programm für Sequenzierreaktion:

Heated lid: 105°C  
Hot start: off  
Initial denaturation: 94°C 2min.

### Loop 1:

35 Zyklen → 94°C 1min.  
58°C 1min.  
72°C 1min.

### Loop 4 (finale Verlängerung):

1 Zyklus → 68°C 7min.

### Final:

∞ → 4°C

### **3.1.8 Verwendete Software**

Adobe Illustrator, Photoshop	Adobe Systems GmbH (Unterschleißheim)
BioEdit 7.0	ISIS Pharmaceuticals (Carlsbad, CA, USA)
CalcuSyn 2.0	Biosoft (Cambridge, UK)
Cellquest	Bekton Dickenson (Mountain View, CA, USA)

# Material und Methoden

EndNote 6.0.2	Thompson ISI Researchsoft (Carlsbad, CA, USA)
MS-Office 2002	Microsoft (Redmond, WA, USA)
SigmaPlot 6.0 for Windows	SPSS Incorporated (Chicago, IL, USA)
SPSS 12.0 for Windows	SPSS Incorporated (Chicago, IL, USA)
TINA 2.0	raytest GmbH (Straubenhardt)
WinMDI 2.8	Joseph Trotter

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen oder Deletionen wurde das QuickChange<sup>®</sup>-Kit von Stratagene (La Jolla, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet, wobei zur Optimierung der PCR-Reaktion verschiedene Programme getestet wurden. Meist führte das unter 3.1.7 angegebene Programm zu einem befriedigenden Ergebnis. Die erhaltenen Produkte wurden auf einem Agarosegel detektiert und sollten eine definierte Bande auf der Höhe des zu erwartenden Konstruktes ergeben. Um die Spezifität des Primer-Annealings zu erhöhen, wurde das Programm dergestalt modifiziert, dass in Loop 1 bzw. Loop 2 die „Annealing“-Temperatur auf 68 bzw. 55°C erhöht und in Loop 3 auf 63°C verringert wurde. Die „Extension“-Temperatur wurde dann auf 60°C verringert. Ein Gesamtansatz von 50µl enthielt 100ng Template-DNA und Primer im Überschuss. Empfindliche Komponenten wie die dNTP-Lösung (10mM) und die Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (2,5U) wurden erst nach der initialen Denaturierung zugesetzt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde vor der Transformation von kompetenten Bakterien zum Verdau von vorhandenem Wildtyp-Template mit 10U DpnI-Enzym behandelt. Generell wurde die Gesamtsequenz jeder durch PCR oder Mutagenese veränderten Plasmid-DNA durch Sequenzierung auf das Vorhandensein von ungewollten Sekundärmutationen überprüft.

#### 3.1.1 Herstellung von kompetenten Bakterien

Es wurde entweder der E. coli-Stamm epicurian XL-1 blue oder E. coli XL-10 Gold verwendet, welcher keine Resistenz gegen Kanamycin aufweist, so dass dieser Stamm auch

## Material und Methoden

für Plasmide, die ausschließlich für eine Kanamycin-Resistenz codieren, eingesetzt werden konnte (beide ursprünglich Stratagene, Heidelberg). Zur Expandierung und Kompetenzmachung von Bakterien wurden 10µl kompetente Zellen in 10ml LB-Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur 1:10 mit LB-Medium verdünnt und weiter bis zu einer OD<sub>580</sub> von 0,5 bis 0,9 unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Die Bakterien wurden etwa 15 min. auf Eis abgekühlt und anschließend bei 1000g für 5 min. sedimentiert. Zur Kompetenzmachung wurden die Bakterien in 50ml eiskaltem, sterilem TfbI-Puffer resuspendiert und 10-15 min. auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung des Puffers wurde erneut sedimentiert und das erhaltene Pellet je nach Ausbeute in 4-8ml TfbII-Puffer aufgenommen. Um Aliquots von 100-105µl zu erhalten, wurden die Bakterien in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt, sofort auf Trockeneis oder flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.1.2 Transformation von kompetenten Bakterien

Zur Amplifikation von DNA wurden die Zellmembranen der kompetent gemachten Bakterien chemisch kurzzeitig durchlässig gemacht, so dass Plasmidvektoren, die über Selektionsmarker verfügten, aufgenommen wurden. Die erfolgreich transformierten Zellen können damit das in den Vektoren enthaltene Resistenzgen exprimieren. In dieser Arbeit wurde die Selektion vorrangig mittels Ampicillin durchgeführt, da die meisten verwendeten Vektoren für β-Lactamase als Resistenzmarker kodierten.

Je Ansatz von 50µl wurden 5µl 5x KCM, 1µg DNA und 25µl Stock kompetente Bakterien mit Aqua dest. aufgefüllt und 20 min. auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min. bei Raumtemperatur, wurde die Bakterien-Suspension mit 250µl LB-Medium ohne Antibiotika-Zusatz zur Expression des Resistenzgens für 1h bei 37°C im Bakterien-Schüttler kultiviert. Vom Transformationsansatz wurden 150µl auf eine vorher angewärmte Agarplatte, die den Resistenzmarker enthielt, mittels abgeflamtem Drygalski-Spatel ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und entstandene Kolonien zur Gewinnung der DNA weiterexpandiert.

### 3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mittels eines Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.1.4 Präparation von mRNA aus Zelllinien

Die Präparation von mRNA wurde nach Herstellerangaben mittels des RNeasy<sup>®</sup> Mini-Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

### 3.1.5 Restriktionsanalyse von DNA-Konstrukten

Um die erhaltenen DNA-Konstrukte auf Identität und Orientierung zu testen, wurde ein diagnostischer Restriktionsverdau durchgeführt, wobei maximal 1µg DNA eingesetzt wurde. Doppel- und sequentielle Restriktionsanalysen wurden hinsichtlich des zu verwendenden Puffers und der Bedingungen gemäß Angaben der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. Main) durchgeführt. Der Verdau wurde anschließend auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Anfärben mit Ethidiumbromid unter der UV-Lampe detektiert.

### 3.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

Zur Ligation in Vektor-DNA wurden DNA-Fragmente verwendet, die durch einen Restriktionsverdau in größerem Maßstab erhalten worden waren (bis zu 5µg). Im Falle eines unvollständigen Restriktionsverdaus, wie beispielsweise für die Umklonierung der KIT-WT cDNA in den MIG-Vektor benötigt, wurde die enzymatische Reaktion an verschiedenen Zeitpunkten (z.B. 15, 30, 45 min.) durch Zugabe von 1µl 0.5M EDTA-Lösung und Erhitzen bei 65°C für 10min. abgestoppt. Das Fragment des unverdauten, aber aus dem Vektor ausgeschnittenen Inserts (3.1 kb) wurde durch den ebenfalls aufgetrennten DNA-Ladder identifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten.

Um Vektor-Religationen zu begrenzen, was bei Verdau des Vektors beispielsweise mit nur einem einzigen Restriktionsenzym notwendig war, wurde die Vektor-DNA nach dem Verdau mit dem Enzym alkalische Phosphatase (*'calf intestinal phosphatase'*, CIP) be-



## Material und Methoden

handelt (nach Verdau mit Restriktionsenzymen und nach Zugabe von CIP 10 min. bei 37°C inkubieren und zur Inaktivierung des Enzyms mit 1µl 0.5 M EDTA-Lösung versetzen und bei 65°C für 10min. erhitzen). Die Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „Gel extraction Kits“ von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Um das Konzentrationsverhältnis von geschnittener Vektor-DNA und DNA-Fragmenten abzuschätzen, wurde von beiden ein Aliquot auf einem Agarosegel aufgetrennt und detektiert. Nach dieser Abschätzung richtete sich die Zusammensetzung des Ligationsansatzes (einzuklonierende DNA zu Vektor-DNA im Verhältnis 5-10:1). Für die Ligation von Fragmenten mit Überhang (*'sticky ends'*) wurde die T4-DNA-Ligase von Roche (418002), für die Ligation von glatten Enden (*'blunt ends'*) die Ligase von MBI Fermentas (#EL0017) verwendet. Für die Ligation von Fragmenten mit Überhang wurde der Ansatz, direkt nachdem alle Komponenten bis auf Ligase-Puffer und Ligase zugesetzt worden waren, für 5 min. bei 45°C erhitzt. Die eigentliche Ligation wurde daraufhin für mindestens 4h bei 16°C durchgeführt. Für die Ligation von Fragmenten mit glattem Ende wurde der Ansatz mit allen Komponenten (5 U T4-DNA-Ligase) zunächst über Nacht bei Raumtemperatur und am folgenden Tag bis zur Transformation der DNA bei 16°C inkubiert. Vor der Transformation wurde der Ansatz für 10 min. bei 65°C erhitzt, um die Ausbeute an transformierten Bakterien zu erhöhen.

### 3.1.7 Sequenzierung von DNA-Proben

Die notwendige PCR-Reaktion vor der eigentlichen Sequenzierreaktion der DNA-Proben wurde mittels BigDye Terminator Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) durchgeführt (siehe auch PCR-Programme). Zur Reinigung der erhaltenen PCR-Produkte wurde mit einer 24:1-Mischung aus Ethanol und 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.5) gefällt und einmal mit 100µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde bei 50°C getrocknet, in 10µl Aqua dest. gelöst und mittels ABI Prism 310 Genetic Analyzer sequenziert.

## 3.2 Methoden der Zellkultur

### 3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden – falls nicht anders angegeben – bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Suspensionszellen wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) in RPMI-1640 Medium kultiviert, das mit 10% FCS und einer Antibiotika-Kombination (50U/ml Penicillin + 50µg/ml Streptomycin) versetzt wurde. Vor der ersten Verwendung wurde das FCS nach dem Auftauen und Erreichen der Raumtemperatur bei 56°C im Wasserbad inaktiviert, um hitzeempfindliche Komponenten des Komplement-Systems im Serum zu zerstören. Hitzeinaktiviertes FCS wurde daraufhin in 50ml Röhrchen aliquotiert. Zusätzlich erhielten native und transduzierte Ba/F3-Zelllinien noch 10% wehi-konditioniertes Medium als Quelle für Interleukin-3. Ba/F3-Zellen wurden in der Regel alle zwei Tage gesplittet, d.h. ein geringes Volumen der konfluenten Population in frisches Nährmedium überführt. Generell wurde darauf geachtet, den pH-Wert im physiologischen Bereich zu halten, was durch Inaugenscheinnahme des dem Medium zugesetzten pH-Indikators erreicht wurde.

Adhärenz Zelllinien wie HEK-293T-Zellen wurden in 10cm Kulturschalen für adhärenz Zellen (Corning, Acton, MA, USA) in DMEM-Medium, dem der Penicillin-Streptomycin-Cocktail und 10% FCS zugesetzt worden war, kultiviert. Für das Replattieren und Aussäen dieser Zellen wurden sie mittels Trypsin-EDTA (1x) nach einmaligem Waschen mit DPBS von der Platte gelöst, wobei das Trypsin 5-10min. im Inkubator auf die Zellen einwirkte, um sie möglichst vollständig und ohne die Bildung von Clustern abzulösen. Um die Reaktion abzustoppen, wurde die Zellsuspension mit etwa der 5fachen Menge an oben beschriebenen DMEM-Medium versetzt und die Zellen vorsichtig auf dem Vortexer gemischt. Die erhaltene Suspension diente zum weiteren In-Kultur-Halten, wobei sie nochmals um den Faktor 10 mit angewärmtem Medium, das in der Kulturschale vorgelegt wurde, verdünnt wurde.

IL-3-produzierende wehi-3B-Zellen, die teilweise adhärenz, teilweise in Suspension wachsen, wurden, wie für 293T-Zellen beschrieben, kultiviert. Zum Umsetzen in neues Medium wurden diese Zellen aber nicht mit Trypsin behandelt, sondern für etwa 10min. mit DPBS ohne Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Zusatz inkubiert. Zum Ablösen wurde die Kulturflasche stark

geschüttelt und die Zellen mittels Zellschaber geerntet. Das von den wehi-Zellen konditionierte RPMI-1640-Medium wurde nach Abnahme steril filtriert (0,22 $\mu$ m) und bei -20°C gelagert.

### 3.2.2 Verwendung von retroviralen Vektoren

Für den retroviralen Gentransfer zur Gewinnung stabiler Zelllinien wurde die zu exprimierende cDNA in die *'multiple cloning site'* (MCS) eines modifizierten pMSCV-Vektors kloniert. Dieser enthält strangabwärts zur MCS die sogenannte IRES-Sequenz und die codierende Sequenz für EYFP oder EGFP (*'enhanced yellow'* bzw. *'green fluorescence protein'*). Mittels der IRES-Sequenz ist eine konzertierte Expression des *'gene of interest'* zusammen mit dem YFP- oder GFP-Reporter gen möglich, indem von der entstandenen bicistronischen mRNA beide ORFs an den Ribosomen abgelesen werden können. Anschließend können die positiven Klone durch GFP-Expressionsanalyse detektiert und sortiert werden. MCS, IRES-Sequenz und GFP-Reporter gen werden von den LTRs (*'long terminal repeats'*) flankiert, wobei der 5'-LTR Promoterfunktion besitzt und der 3'-LTR den Transkriptionsterminator darstellt. Strangabwärts des 5'-LTR liegt die sogenannte Verpackungssignalsequenz ' $\Psi$ '. Diese ist notwendig, um die gewünschte RNA in die Viruskapside zu verpacken. Da die entsprechenden Sequenzen, die für diese Verpackungsproteine kodieren, im verwendeten Expressionsvektor durch die MCS bzw. das *gene of interest* ersetzt wurden, ist die Verpackungszelllinie auch mit DNA, die für diese kodiert, zu transfizieren. Hierzu wurde das kommerziell erhältliche EcoPack<sup>®</sup> von Clontech (Heidelberg) verwendet, das die gag-, pol- und env-Sequenzen enthält, um die RNA zu verpacken. Die Strategie der Doppeltransfektion ist notwendig, um die Bildung replikationskompetenter Retroviren zu verhindern, da das Helferplasmid kein Verpackungssignal, der Vektor mit dem *gene of interest* aber keine codierende Sequenz für die viralen Kapside enthält. In den hier beschriebenen Versuchen wurde als Verpackungszelllinie die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK) 293T verwendet, die sich als gut transfizierbar erwies. Die von dieser Zelllinie produzierten viralen Überstände werden nicht durch humanes Serum inaktiviert, und überdies ist die Wahrscheinlichkeit von homologen Rekombinationen sehr gering, da nur sehr wenig endogene Retrovirussequenzen vorhanden sind.

## 3.2.3 Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion von adhären wachsenden Zellen wurde entweder die Methode der  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Kopräzipitation oder das Polyfect<sup>®</sup>-Reagenz von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Mittels transfizierter 293T-Zellen wurde entweder konditioniertes, virusenthaltendes Medium zur stabilen Transduktion hergestellt oder die korrekte Expression von Genen überprüft. Zur Transfektion mittels  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation wurden etwa  $5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung auf einer 6-Well-Platte ausgesät und bis zur Konfluenz von etwa 70-80% kultiviert. Für den Transfektionsansatz wurden in einem 50ml-Röhrchen 54 $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (250mM) sowie 3 $\mu$ g EcoPack-DNA und 5 $\mu$ g der zu transfizierenden DNA vorgelegt. Tropfenweise, unter gleichzeitigem Durchmischen mittels Vortexer wurden 54 $\mu$ l HBS-Lösung zugesetzt. Diese Mischung wurde nach 3min. vorsichtig zu den Zellen gegeben, wobei abschließend leicht geschwenkt wurde. Am nächsten Tag wurde möglichst früh das Medium der Zellen gewechselt.

## 3.2.4 Stabile Transduktion

Zur stabilen Transfektion wurde in drei oder mehr Wells jeweils 200 $\mu$ l einer auf eine Zelldichte von  $0.25 \times 10^6$ /ml eingestellten Zellsuspension der betreffenden Suspensions-Zelllinie ausgesät und mit 200 $\mu$ l viral-konditioniertem Überstand unter Zusatz von Polybrene-Lösung (Hexadimethrinbromid, Endkonzentration 8 $\mu$ g/ml) versetzt. Nach etwa 12h wurden die Wells mit Medium aufgefüllt. 48h nach der Transduktion wurden die Zellen gepoolt und nach GFP bzw. YFP-Fluoreszenz sortiert.

## 3.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zelllinien wurden nach Abzentrifugieren (soweit nicht anders angegeben wurden Zellen stets mit 1000rpm für 5min. bei 24°C zentrifugiert) in 90% FCS und 10% DMSO (vorgekühlt) aufgenommen und sofort bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Es wurde auf die Verwendung von so genannten 1°-Freezing-Containern verzichtet, da der Einsatz dieser Hilfsmittel zum langsamen Herunterkühlen der Zellen erfahrungsgemäß zu einem weit schlechteren Zustand der Zellen nach Wiederauftauen führte. Nach einigen Tagen bei -80°C wurden die tiefgefrorenen Zellvorräte über flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert.

## Material und Methoden

Zum Auftauen der Zellen wurde die Suspension schnell erwärmt, in 20-25ml Medium aufgenommen und sofort abzentrifugiert, um Reste an zelltoxischem DMSO zu entfernen. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurde der Überstand des Zentrifugates abgegossen und frisches Medium zugesetzt, worin die Zellen für 24h während der ersten Passage verblieben.

### **3.2.6 Rekonstitution von Zytokinen und Inhibitoren und Lagerung**

Angekaufte lyophilisierte Zytokine wurden nach vorsichtigem Zentrifugieren des Behältnisses in 0,1%iger BSA-Lösung zur Stabilisierung der Proteine rekonstituiert und bei -20°C gelagert. Angebrochene Aliquots wurden bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

Die eingesetzten Inhibitoren wurden – falls nicht anders angegeben – in DMSO aufgelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Zur Verwendung der Inhibitoren wurde in der Regel eine Verdünnungsreihe mit PBS erstellt. Es wurde darauf geachtet, die Grenze von 0.25% DMSO im Medium, unterhalb derer in Kontrollversuchen keine Toxizität für die behandelten Zellen zu beobachten war, nicht zu überschreiten.

### **3.2.7 Bestimmung der Viabilität von Zellen mittels Trypanblau-Ausschluß-Test**

Die Zelldichte viabler Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau zum Ausschluss toter Zellen im Durchlichtmikroskop bestimmt.

### **3.2.8 MTT-Viabilitätstest**

Zur Bestimmung der Viabilität einer Zellpopulation wurde neben dem Ausschlusstest mittels Trypan-Blau-Färbung auch der sogenannte MTT-Test verwendet, der auf der Metabolisierung des Tetrazoliumsalses 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zum ringoffenen Formazan-Salz beruht, wobei ein Farbumschlag beobachtet wird, der kolorimetrisch ausgewertet werden kann. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei in den sichtbaren Bereich (~ 600nm), so dass die Reaktion als ausreichend spezi-

fisch bezeichnet werden kann. Weitere Spezifität kommt dadurch zustande, dass das Formazan nur von metabolisch aktiven Zellen gebildet werden kann. Nachteilig wirkt sich aus, dass die Formazan-Bildung natürlich auch spontan im Rahmen des Massenwirkungsgesetzes abläuft, so dass beispielsweise bei Inhibitor-Behandlung faktisch nie eine OD von 0 erreicht wird. Dieser Fehler kann jedoch teilweise durch Normalisierung der erhaltenen Messwerte auf einen Blank-Wert beseitigt werden, der nur Medium und zugesetzte Reagenzien enthält. Der MTT-Viabilitätstest wurde mit Hilfe des Kits von Roche Diagnostics (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die Zellen, wie für Proliferationsversuche beschrieben, auf die gewünschte Dichte ( $0.05 \times 10^6/\text{ml}$ ) eingestellt und in 96-Well-Platten mit flachem Boden ausgesät ( $100\mu\text{l}$  der eingestellten Zellsuspension), wobei jeder Wert als Triplet angelegt und vermessen wurde. Die an den Rand der Platte grenzenden Wells wurden nicht beladen, um eine möglichst gleichmäßige Temperatur und Feuchtigkeitsverteilung für alle Wells zu gewährleisten. Nach der Inkubation, die in der Regel 72h dauerte, wurden die Zellen mit MTT-Reagenz versetzt und nach vierstündiger Inkubation lysiert. Um das ausgefallene Formazan-Salz zu lösen verblieb die Platte erneut über Nacht im Inkubator. Die Messung der OD erfolgte am ELISA-Reader, wobei ein Programm gewählt wurde, das die Platte vor der eigentlichen Messung schüttelte, um letzte Reste an nicht gelösten Formazan-Kristallen zu beseitigen.

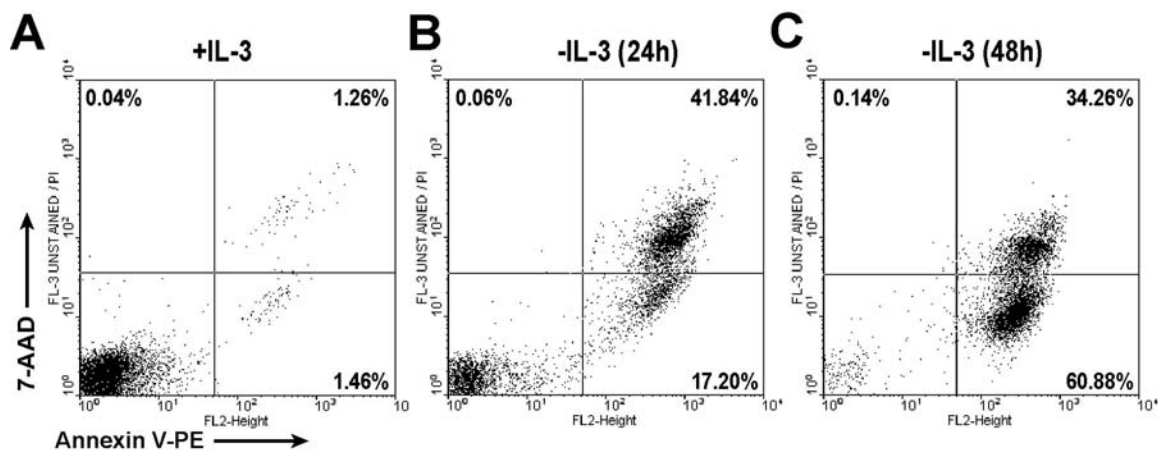
Aus den drei erhaltenen Messwerten wurde der Mittelwert gebildet, hiervon der Mittelwert der Blank-Werte abgezogen und die sich daraus ergebenden Werte auf den Kontrollwert bezogen.

### **3.2.9 Apoptose-Test mit Annexin- und 7-AAD-Färbung**

Für die Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen in einer Kultur wurde das „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit“ von BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Dieser Test beruht auf der Doppelfärbung von apoptotischen/ toten Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V und dem rötlich gefärbten 7-AAD. Ein erstes Anzeichen für das Einsetzen apoptotischer Prozesse ist der Zusammenbruch der Membran-Asymmetrie der Zellen, so dass es zur Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) auch auf der äußeren Lage der Zellmembran kommt. Dieser Prozess tritt neben dem Verlust des Membranpotentials  $\Delta\psi_M$  und der verstärkten Produktion

## Material und Methoden

von Superoxid-Anion-Radikalen lange vor nukleärer Apoptose mit Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung auf (Castedo, 1996). Mittels Phycoerythrin(PE) – markiertem Annexin V, welches mit hoher Affinität  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an PS bindet, können bereits Zellen, die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden, markiert werden. 7-Aminoactinomycin (7-AAD) ist ein sogenannter Avitalfarbstoff, der zwischen Cytosin und Guanin interkalieren kann und dann seine Fluoreszenzeigenschaften verändert (Castedo, 1996). 7-AAD kann nur in Zellen mit nicht mehr intakter Membranintegrität eindringen. Mittels Doppel-Färbung kann zwischen intakten Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ), frühapoptotischen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ) und spätapoptotischen/toten Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv) unterschieden werden. Vollkommen nekrotische Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD positiv) gingen nicht in die Auswertung mit ein. Für jede Analyse wurden die korrekten Settings des Durchflusszytometers anhand von nicht- bzw. einfachgefärbten Proben ermittelt. Annexin V-PE wurde in Fluoreszenzkanal FL-2 und 7-AAD in Fluoreszenzkanal FL-3 detektiert. Der Test wurde für native Ba/F3-Zellen hinsichtlich Durchführung und Zeitpunkt der Messung optimiert. Einen repräsentativen Dotplot zeigt Abbildung 3:



**Abbildung 3: Apoptoseinduktion in Ba/F3-Zellen nach IL-3-Entzug über 48h**

Ba/F3-Zellen wurde über 48h IL-3 entzogen und nach 0h (A), 24h (B) und 48h (C) der Anteil an apoptotischen Zellen in der Kultur bestimmt. Die Abbildung zeigt repräsentative Dot-Plots mit Angabe der Prozentzahlen in den jeweiligen Quadranten.

### 3.2.10 Zellzyklus-Analyse durch Färbung mit Propidiumiodid

Zur Durchführung von Zellzyklusanalysen, wurden  $0.2 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät und für 24h in 24-Wellplatten kultiviert, wobei die jeweils angegebenen Zytokine oder Inhibitoren zu Beginn der Kultur zugesetzt wurden. Vor der Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen gezählt und auf 200 000 pro FACS-Röhrchen eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze einmal mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis mit 350 $\mu$ l Lysis-Puffer für PI-Färbung versetzt und 5 min. unter Lichtausschluss lysiert. Sofort nach der Lyse wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Es wurden mindestens 10 000 Zellen gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe von WinMDI<sup>®</sup> ausgewertet. Hierbei wurde eine Histogramm-Darstellung gewählt, bei der auf der X-Achse die Fluoreszenz-Intensität von Kanal FL-3 und auf der Y-Achse die Anzahl der detektierten Ereignisse aufgetragen wurde, wobei die Werte auf der X-Achse logarithmisch und auf der Y-Achse linear dargestellt wurden, um auch Ereignisse im Sub-G<sub>1</sub>-Bereich darzustellen. Der sich ergebende erste Peak wurde als Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase aufgefasst, der zweite Peak, der im Maximum ungefähr die doppelte Intensität des ersten Peaks aufweisen sollte, als Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase und der Bereich dazwischen als Zellen in der S-Phase. Zellen, die DNA-Fragmentationen aufwiesen und daher eine Fluoreszenz im Sub-G<sub>1</sub>-Bereich zeigten, wurden als apoptotisch angesehen und für eine weitere Auswertung der Zellzyklusverteilung nicht berücksichtigt.

Das Verfahren wurde anhand von IL-3 stimulierten Zellen validiert, die nur eine sehr geringe Anzahl von apoptotischen und toten Zellen aufwiesen.

### 3.2.11 Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflußzytometrie

Oberflächenantigene wie FLT3- oder KIT-Rezeptor (CD135 bzw. CD117) wurden mittels Durchflußzytometrie unter Einsatz von Farbstoff-konjugierten Antikörpern detektiert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit PBS gewaschen und in PBS für 15min. unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Als Isotyp-Kontrolle zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung wurde murines IgG1-PE verwendet. Die Proben wurden erneut mit PBS gewaschen und unverzüglich im FACS analysiert.



### 3.2.12 Hungern von Zellen und Lysatpräparation

Zur Analyse von aktivierten Signalwegen in Zelllinien wurden diese für die angegebenen Zeiträume in Hungermedium (Zusatz von nur 0.3% FCS, keine IL-3-Quelle) inkubiert, um den Hintergrund an phosphorylierten Proteinen zu senken. Nach mehrfachem Waschen mit PBS und ggf. Zytokin-Stimulation sowie Inhibitorbehandlung wurde das erhaltene Zellpellet in Lysis-Puffer für Western-Blot aufgenommen. Vor Verwendung des Lysis-Puffers wurden die Proteaseinhibitoren Aprotinin (Endkonzentration: 5µg/ml) und PMSF (Endkonzentration 1mM) sowie als Tyrosinphosphataseinhibitor  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Endkonzentration 1mM) zugesetzt. Natriumfluorid als Serin- und Threonin-Phosphataseinhibitor und Natrium-EGTA zur Komplexierung von  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  wurden bereits bei der Zubereitung des Lysis-Puffers hinzugefügt.

## 3.3 Immunologische Methoden

### 3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Zelllysaten wurde die Methode nach Bradford angewandt (Bradford, 1976). Sie beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Blau. Dieser ist in stark saurer Lösung zweifach protoniert ( $A = 470\text{nm}$ ), während an Protein gebundener Farbstoff unprotoniert vorliegt ( $A = 590\text{nm}$ ).

Die entsprechenden Lysate wurden 1:10 verdünnt und hiervon 20µl mit 1:5 verdünntem BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, München) versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Absorption bei 595nm gegen reine Farbstoff-Lösung als Blank-Kontrolle gemessen. Um die absolute in den Proben vorhandene Proteinmenge aus den erhaltenen Werten bestimmen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe an BSA-Protein mitgeführt (100/200/300/400/500/600/800 µg/ml). Von diesen Konzentrationen wurden ebenfalls 20µl für die Messung verwendet.

### 3.3.2 Chemisches Crosslinking für Rezeptordimerisierung

Zur Bestimmung des Anteils von spontan und ligandeninduziert dimerisiertem Rezeptor wurde eine Reihe von Versuchen zur Optimierung der Dimerisierungsbedingungen durchgeführt. Wie beschrieben, wurden 293T-Zellen unter Standardbedingungen mit den angegebenen Konstrukten in 6-Well-Platten transfiziert. Nach 48stündiger Kultur im Inkubator wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 1h auf Eis und im Kühlraum mit den angegebenen SCF-Konzentrationen stimuliert, wobei die 6-Well-Platten in regelmäßigen Abständen (alle 10 min.) vorsichtig geschwenkt wurden. Nach dem Waschen wurden die Zellen vorsichtig in Crosslinking-Puffer (PBS ohne Zusatz von Mg-Salzen, die zwar den Nukleus während der Lyse stabilisieren, aber auch als Kofaktoren für eine Reihe von Proteasen dienen (Coico, 1994)) aufgenommen. Zum Verlinken von Rezeptordimer und Rezeptordimer-Ligand wurde der nicht-membrangängige Crosslinker BS<sup>3</sup> verwendet. Dieser ist sehr hygroskopisch und hydrolyseempfindlich, so dass die Substanz zusammen mit Trockenmittel luftdicht verschlossen gelagert wurde und alle hergestellten Verdünnungen unverzüglich und nur einmal verwendet wurden. BS<sup>3</sup> wurde in einer Endkonzentration von 2mM eingesetzt (6mg BS<sup>3</sup> in 500µl PBS oder Aqua dest. als 20mM-Stock gelöst und im letzten Schritt 1:10 verdünnt) und die Zellen damit für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 20µl Quenching-Lösung (Tris-HCl-Puffer, 1.5M auf pH 6.8 eingestellt) zugefügt und erneut für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie beschrieben lysiert und die gewonnenen Lysate anschließend durch Western-Blotting analysiert. Der Einsatz des membrangängigen Crosslinkers DSS und die Zugabe von BS<sup>3</sup> erst nach der Lyse der Zellen im Lysis-Puffer (enthält kein primäres oder sekundäres Amin), wie von Carlberg et al. (Carlberg und Rohrschneider, 1994) beschrieben, brachten kein zufriedenstellendes Ergebnis. Höhere Konzentrationen von BS<sup>3</sup> als 2mM und an SCF als 100ng/ml hatten keinen Einfluss auf den Grad der erreichbaren Dimerisierung.

### 3.3.3 Immunopräzipitation

Zur Einstellung der gewonnenen Zelllysate auf eine einheitliche Konzentration wurde zuerst eine UV-Bestimmung mit Bradford-Lösung durchgeführt. Nach Einstellung der Lysate mit Lysis-Puffer wurde jeweils ein Aliquot, das etwa 300µg Protein oder  $1 \times 10^9$  Zellen

## Material und Methoden

entsprach, über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C mit 5µl Antikörper-Stocklösung inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Lysate mit 15µl Protein-A-Agarose für polyklonale Antikörper bzw. Protein-G-Sepharose (Roche, Mannheim) für monoklonale Antikörper versetzt, wobei eine abgeschnittene Spitze verwendet wurde, um immer exakt das gleiche Volumen an Agarose oder Sepharose zu pipettieren. Die Ansätze wurden erneut bei 4°C auf dem Drehrad für mindestens eine Stunde inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine vollständig zu entfernen, wurde daraufhin dreimal mit Lysis-Puffer ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren gewaschen (in kühlbarer Zentrifuge). Nach dem Entfernen des Überstandes nach dem letzten Waschschrift wurden die erhaltenen Pellets in DTT-haltigem Probenauftragspuffer aufgenommen und für 5min. bei 95°C gekocht, bevor sie auf das SDS-PAGE-Gel geladen wurden.

### 3.3.4 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dabei wurde in der Regel mittels Gradientenmischer ein 7.5% -12.5%iges Gradientengel gegossen, das wie folgt zusammengesetzt war:

#### Trenngel 12.5%:

Aqua purificata	2.9ml
Sucrose	~2g
Tris-Puffer, pH 8.8	5.65ml
Polyacrylamid-Lösung	6.25ml
SDS-Lösung (10%)	150µl
APS-Lösung (10%)	50µl
TEMED	1.5µl

#### Trenngel 7.5%:

Aqua purificata	5.4ml
Tris-Puffer, pH 8.8	5.65ml
Polyacrylamid-Lösung	3.75ml
SDS-Lösung (10%)	150µl

## Material und Methoden

APS-Lösung (10%)	50µl
TEMED	1,5µl

### Sammelgel 4%:

Aqua purificata	6.1ml
Tris-Puffer, pH 6,8	2.5ml
Polyacrylamid-Lösung	1.3ml
SDS-Lösung (10%)	100µl
APS-Lösung (10%)	50µl
TEMED	10µl

Die angegebenen Lösungen wurden auf Eis pipettiert. TEMED wurde erst kurz vor dem Ausgießen des Gels zugesetzt, um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern. Nach der vollständigen Polymerisation des Gradienten-Trenngels, das direkt nach dem Ausgießen mit Wasser überschichtet worden war, um die Verdunstung zu begrenzen, wurde darauf das Sammelgel gegossen und der entsprechende Kamm eingesteckt. Für die Auftrennung von größeren Proteinen aus Crosslinking-Ansätzen wurde ein 7.5%iges Gel gegossen. Nach Beladen des Gels wurde die Auftrennung der Proteine in der Gelkammer (Biorad) über Nacht bei 24V für ein Gel bzw. bei 38V für zwei Gele durchgeführt.

### **3.3.5 Immunoblotting**

Zum Transfer der eindimensional aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Porengröße 0,45µm, Schleicher & Schüll, Dassel) wurde das sogenannte „Semi-Dry“-Blot-Verfahren angewandt. Die Nitrocellulosemembran (15x16 cm) wurde zusammen mit sechs gleich großen Stücken Filterpapier in Transfer-Puffer äquilibriert. Das „Transfer-Sandwich“ wurde in der Semi-Dry-Elektrophorese-Transferkammer (Trans-Blot SD, BioRad, München) wie folgt zusammengesetzt: 3 Filterpapiere/ Membran/ SDS-PAGE-Gel/ 3 Filterpapiere. Der Transfer erfolgte bei 250mA für mindestens 3h. Die Membran wurde nach dem Blotten kurz abgespült und zur Detektion von Marker sowie zur semiquantitativen Bestimmung der Protein-Beladung mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Bis zur vollständigen Entfärbung der Membran wurde sie in Blockierungslösung (G-

Net) geschwenkt und über Nacht bei 4°C mit der entsprechenden Verdünnung des Primär-Antikörpers (in der Regel 1:1000 in G-NET) inkubiert. Anschließend wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten mit TBST gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:20 000 in G-NET verdünntes HRP (*horse radish peroxidase*)-gekoppeltes anti-rabbit- oder anti-mouse-Immunglobulin) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten in TBST gewaschen. Für die Detektion wurde ein ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Kit von Amersham (Freiburg) verwendet. Der Blot wurde für eine Minute simultan in beiden Lösungen inkubiert (1-2ml) und zur Vermeidung des Austrocknens der Membran in eine Klarsichtfolie verpackt. Auf dem Blot wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) in einer Filmkassette (Hypercassette, Amersham) bis zu einer Stunde exponiert.

### **3.3.6 Strippen von Western Blots**

Western Blots, die schon einmal entwickelt worden waren, mussten, auch wenn der nächste verwendete Antikörper von einer anderen Spezies stammte, gestrippt werden, um ein Durchscheinen des alten Signals zu verhindern. Die entsprechenden Membranen wurden nach dem Entwickeln einmalig mit TBST gewaschen, anschließend für etwa 30sec. in absolutem Methanol geschwenkt und einmal mit Wasser abgewaschen. Die Inkubation mit Methanol durfte nicht zu lange erfolgen, um das durch rasches Abkühlen erfolgte Zusammenziehen der Membran zu begrenzen. Die mit Stripping-Lösung bedeckten Membranen wurden in einem Ofen dann für 30min. bei 60°C erhitzt und nach der Inkubation mit TBST unter dem Abzug gewaschen, bis kein Geruch von  $\beta$ -Mercaptoethanol mehr vorhanden war. Vor der Zugabe des neuen Primärantikörpers wurde mit G-NET 1-2h geblockt.

## **3.4 Sonstige Methoden**

### **3.4.1 Statistische Auswertung von Patientendaten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Patientendaten, die im Zeitraum von 1998 bis 2004 im Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums Grosshadern der LMU München erho-

ben worden waren, ausgewertet. Dabei lag eine Einverständniserklärung nach angemessener ärztlicher Aufklärung von jedem Patienten vor. Die entsprechenden Blut- und Knochenmarkproben waren im Labor für Leukämiediagnostik hinsichtlich Zytomorphologie, Zytochemie, Immunophänotypisierung, Zytogenetik und anderer Parameter wie zuvor beschrieben (Schnittger, 2002) charakterisiert worden. Die statistische Bewertung von Unterschieden in der Verteilung von dichotomen Variablen wurde durch  $\chi^2$ - bzw. Fisher's Exakt-Test (SPSS) durchgeführt. Mittelwerte wurden mittels t-Test (zweiseitig gepaart) verglichen (Excel, Microsoft). Ab einem p-Wert von  $< 0.05$  wurden Unterschiede als statistisch signifikant bewertet.

### 3.4.2 Bestimmung von kombinatorischen Indizes nach Chou und Talalay

Zur Bewertung der Effekte zweier kombinierter Substanzen im Zellkulturmodell wurde die Methode nach Chou und Talalay herangezogen, die auf der Bestimmung des so genannten kombinatorischen Indexes  $C_i$  beruht (Chou und Talalay, 1984). Dieser lässt sich nach Gleichung 1 berechnen:

$$\text{(Gleichung 1)} \quad C_i = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1(D)_2 / (D_x)_1(D_x)_2$$

Hierbei gibt  $(D)_1$  und  $(D)_2$  die Dosis der Inhibitoren 1 und 2 an, die in Kombination zu einem Effekt von  $x\%$  führen, während  $(D_x)_1$  und  $(D_x)_2$  die jeweilige Dosis des Inhibitors nach Einzelgabe darstellen. Der Term der Gleichung  $(D)_1(D)_2 / (D_x)_1(D_x)_2$  geht nur für Inhibitoren in die Gleichung ein, deren jeweiliger Wirkmechanismus von dem des anderen unabhängig ist (*mutually exclusive*). Im Falle von Inhibitoren, die beide um die ATP-Bindungsstelle eines Enzyms konkurrieren, geht der Term daher nicht in die Gleichung mit ein. Ein nicht-unabhängiger Wirkmechanismus lässt sich u.a. aus dem parallelen Kurvenverlauf zweier Inhibitoren im Median-Effekt-Plot ansehen (Chou und Talalay, 1981). Ein  $C_i$  von 0.9-1.1 zeigt Additivität der Wirkung zweier Inhibitoren,  $< 0.9$  Synergismus und  $> 1.1$  Antagonismus.

Gleichung 1 besitzt unendlich viele Lösungen, die vom jeweiligen Wert  $x$  bestimmt werden, also in welchem Dosisbereich der Inhibitoren  $C_i$  errechnet wird. In der Literatur wird häufig ein  $C_i$  für die  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  und  $IC_{90}$  angegeben. Um diese  $C_i$ -Werte zu berechnen,

müssen allerdings (**D**) und (**D<sub>x</sub>**) genau bestimmt werden. Grundlegend hierfür ist die allgemeine Gleichung nach Chou, die den Zusammenhang zwischen „Dosis“ und „Effekt“ im kinetischen Modell einer Enzym-Inhibition beschreibt:

(Gleichung 2) 
$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

wobei **D** die Dosis eines Inhibitors, **D<sub>m</sub>** den Schnittpunkt der Median-Effekt-Gerade mit der x-Achse, **f<sub>a</sub>** den Anteil an inhibiertem Enzym, **f<sub>u</sub>** den Anteil nicht-inhibierten Enzyms und **m** die Steigung der Median-Effekt-Gerade angibt.

Gleichung 2 lässt sich umformen, so dass sich die Form einer einfachen Gerade (**y = m\*x+b**) ergibt,

(Gleichung 3) 
$$\log (f_a/f_u) = m \log (D) - m \log (D_m)$$

Trägt man also im so genannten „Median-Effekt-Plot“ **log (f<sub>a</sub>/f<sub>u</sub>)** gegen **log (D)** auf, so erhält man nach Anlegen einer Regressionsgerade (automatisiert in SigmaPlot 2000) die Steigung der Gerade **m** sowie **D<sub>m</sub>** als Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse. Auf diese Weise lassen sich für unterschiedliche **f<sub>a</sub>/f<sub>u</sub>**-Quotienten, also unterschiedliche Dosisbereiche der Inhibition, die jeweiligen Dosen des verwendeten Inhibitors errechnen.

### 3.4.3 Recherche in Online-Datenbanken

Die cDNA-Sequenz von *c-KIT* und *FLT3* wurde anhand von Datenbankeinträgen des „National Center for Biology Information“ (NCBI, Bethesda, MD, USA) ermittelt (→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Für *c-KIT* wurde der Eintrag mit der Accession-Nr. **NM\_000222** bzw. **X06182**, für *FLT3* **NM\_004119** bzw. **U02687** verwendet.

Um Homologien zu anderen Rezeptortyrosinkinasen zu finden, wurden Intraspezies-Vergleiche mittels der Datenbank des „GENATLAS“ der Université René Descartes in Paris durchgeführt (→ <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>).

Für *c-KIT* (→ <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?n=303>) bzw. *FLT3* (→ <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?n=2893>) wurden dann anhand dieser Datenbank Inter- und Intraspezies-Vergleiche durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktionelle Charakterisierung von extrazellulären Mutationen des Protoonkogens *c-KIT* in Exon 8

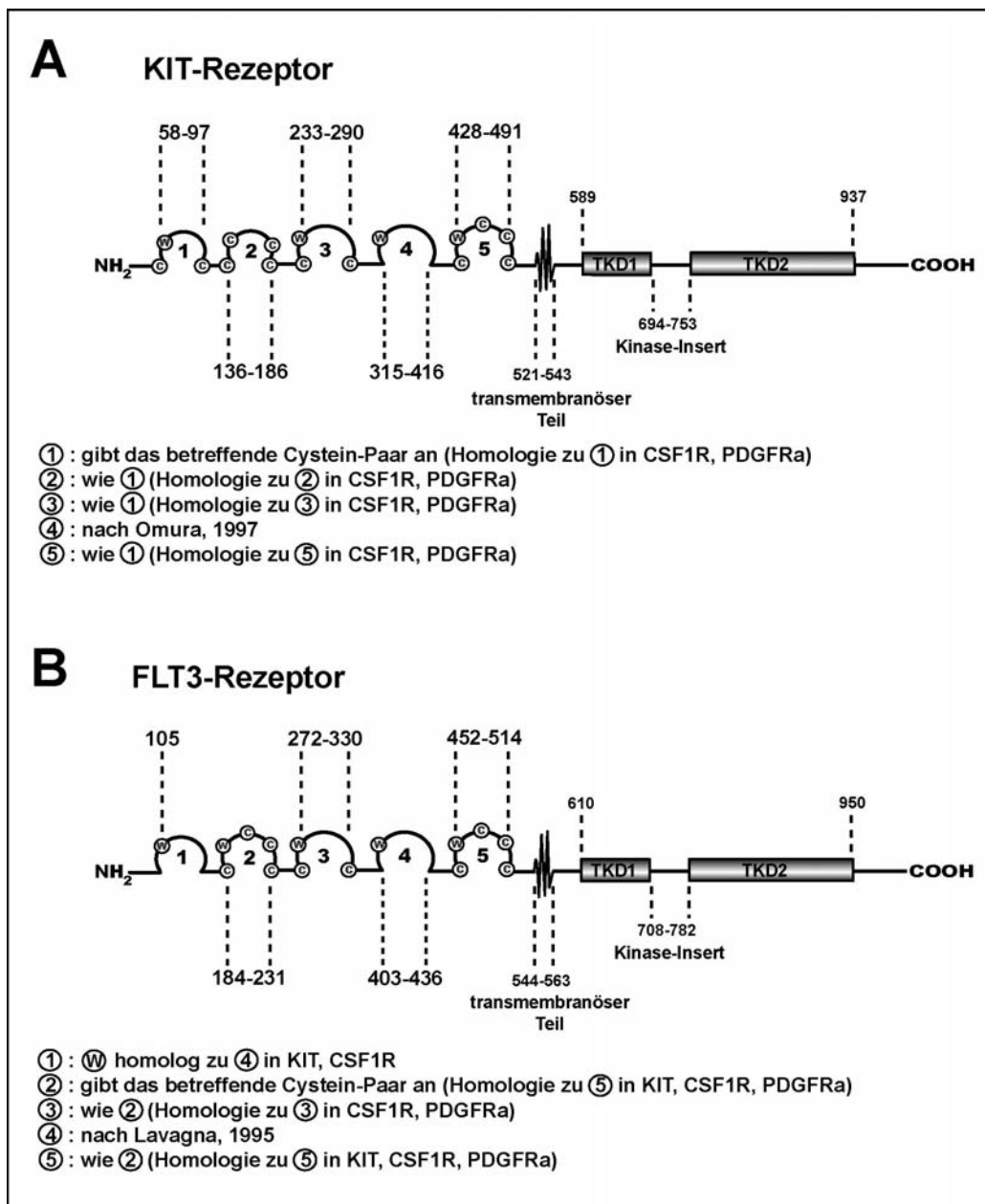
#### 4.1.1 Genaue Zuordnung der Mutationen zu den jeweiligen Ig-ähnlichen Domänen der Rezeptoren

Die genaue Zuordnung der in Exon 8 des *c-KIT*-Gens gelegenen Mutationen zu den funktionellen Einheiten des KIT-Proteins ist in der Literatur uneinheitlich, wobei es Autoren gibt, die sie wie Gari der immunglobulin-ähnlichen Domäne 5 zuordnen (⑤) (Gari, 1999), während andere eine Zuordnung zu ④ vorschlagen (Heinrich, 2002). Diese Zuordnung ist aber insofern wichtig, da den einzelnen Ig-ähnlichen Domänen unterschiedliche Aufgaben bei der Rezeptoraktivierung zukommen und sich eine Mutation innerhalb dieser Domänen je nach deren Tertiärstruktur unterschiedlich stark auswirken würde. Die ersten drei Ig-ähnlichen Domänen von KIT sind für die Ligandenbindung zuständig, Domäne 4 für die Dimerisierung des Rezeptors und Domäne 5 wird mit der Abspaltung des Rezeptors in Verbindung gebracht (Blechman, 1993; Blechman, 1995; Broudy, 2001).

Bei der Zuordnung wurden zuerst die Cystin-Reste ermittelt, die Anfangs- und Endpunkt der Aminosäure-Schleifen bestimmen und sich durch sehr hohe Homologie innerhalb der Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasen auszeichnen. Dabei wurde für den KIT-Rezeptor auf Blechman et al. zurückgegriffen (Blechman, 1993), während die Zuordnung für den FLT3-Rezeptor auf Basis der Homologie zu KIT, CSF1R und PDGFRA erfolgte. Für Ig-ähnliche Domänen, die sich nicht durch eine schleifenbildende Disulfid-Brücke definieren lassen, wurde in der Literatur nach Übersichtsartikeln gesucht, die Anfang und Ende der entsprechenden Bereiche angeben (Omura, 1997; Lavagna, 1995). Für die Definition des transmembranösen und zytoplasmatischen Anteils des Rezeptors wurde der jeweilige Swiss-Prot-Eintrag herangezogen (P10721 für KIT und P36888 für FLT3).

Abbildung 4 zeigt eine Zusammenfassung für KIT (Abb. 4A) und FLT3 (Abb. 4B):





**Abbildung 4: Schematische Darstellung von KIT und FLT3 mit Grenzen der Ig-ähnliche Domänen**

(A) und (B) Die Grenzen der Ig-ähnlichen Domänen wurden über Homologie und Zitate in Original-Arbeiten bestimmt. FLT3 weicht im N-terminalen Bereich – wie schon beschrieben (Rosnet und Birnbaum, 1993) – stark von der Struktur von KIT und CSF1R ab.

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von KIT zu weiteren Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasen, wie insbesondere CSF1R und PDGFRA, und anhand der Originalarbeit von Blechman et al. (Blechman, 1993) konnten Anfang und Ende der Ig-ähnlichen Domänen verhältnismäßig genau bestimmt werden. Das C-terminale Ende von ④ liegt nach Omura et al. bei Leu416 (Omura, 1997). Damit konnten die mit T417 beginn-

## Ergebnisse

nenden Exon-8-Mutationen dem Bereich zwischen ④ und dem durch die Cystin-Brücke definierten Bereich von ⑤ zugeordnet werden. Diese Zuordnung wird durch die Arbeit von Gokkel et al. zum murinen KIT-Rezeptor gestützt, wonach für die ersten beiden Ig-ähnlichen Domänen ausschließlich Exon 2 bzw. Exon 3 kodieren, während den übrigen drei Domänen jeweils zwei aufeinander folgende Exone, also beispielsweise Exon 4 und 5 für Ig-ähnliche Domäne 3, zugeordnet werden sollen (Gokkel, 1992). Demnach würden die Mutationen in Exon 8, welches für den ersten Teil von ⑤ codiert, am N-terminalen, nicht durch eine Disulfid-Brücke umschlossenen Teil von ⑤ liegen. Der Bereich von T417 bis L421 ist zwar im Interspezies-Vergleich hochkonserviert (Gari, 1999), nicht aber im Vergleich zu humanem FLT3, CSFR1 und PDGFRA (Abb. 5A).

Während für KIT eine Reihe von Arbeiten existiert, die sich mit den Funktionen der einzelnen Ig-ähnlichen Domänen befassen (Gokkel, 1992; Blechman, 1993; Lev, 1993; Blechman, 1995; Broudy, 2001), wird auf die Aufgaben dieser Domänen für den FLT3-Rezeptor weitgehend durch Homologie zu den verwandten Klasse-III-Rezeptoren geschlossen. Allerdings scheint der Aufbau des extrazellulären Bereichs von FLT3 Besonderheiten am N-Terminus aufzuweisen. Domäne ① zeigt Verwandtschaft zu ④ von KIT und CSF1R, und ② gleicht vom Aufbau Domäne ⑤ von KIT, CSF1R und PDGFRA. ③, ④, ⑤ sind im Aufbau den korrespondierenden Ig-ähnlichen Schleifen der anderen untersuchten Klasse-III-RTK homolog, N- und C-Terminus von ④ wurde im Rahmen einer Arbeit zu einer murinen FLT3-Isoform veröffentlicht (Lavagna, 1995). Dieser Aufbau der extrazellulären Region von FLT3 wurde auch von Rosnet et al. beschrieben (Rosnet, 1993). In dieser Publikation wurde daraufhin gewiesen, dass die dort identifizierten acht konservierten Cystein-Reste nur für die Faltung von ②, ③ und ⑤ verantwortlich seien. ① und ④ zeigen demnach einen anderen Aufbau ohne Cystin-Brücken.

Die in der vorliegenden Arbeit näher untersuchte Mutation an D324 (Ley, 2003) liegt in Domäne ③ des FLT3-Rezeptors. D324 ist in humanem KIT und PDGFRA, nicht aber in CSF1R konserviert (Abbildung 5B).

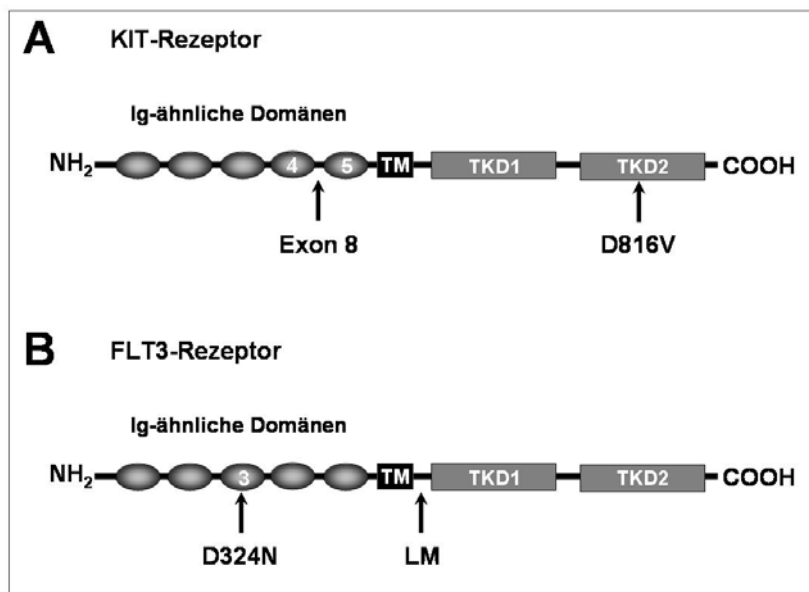
# Ergebnisse

A					B						
<b>KIT</b>	411	TKPEIL	<b>TYDR</b>	LVNGM-	425	<b>FLT3</b>	319	SVARN	<b>D</b>	TGYTT	329
		PE+		+NG				S	N	<b>D</b>	+G +
<b>CSF1R</b>	400	YPPEVS	<b>VIWT</b>	FINGSG	415	<b>KIT</b>	279	SARVN	<b>D</b>	SGVFM	289
<b>KIT</b>	411	TKPEIL	<b>TYDR</b>	LVNGM-	425	<b>FLT3</b>	319	SVARN	<b>D</b>	TGYTT	329
		IL		+G				V		G	Y+
<b>PDGFRA</b>	413	VPSSIL	<b>DLVD</b>	DHHGST	428	<b>CSF1R</b>	267	LVDFQ	<b>H</b>	AGNYS	277
<b>KIT</b>	411	TKPEIL	<b>TYDR</b>	LVNGML	426	<b>FLT3</b>	319	SVARN	<b>D</b>	TGYTT	329
		KP++L								<b>D</b>	+G Y
<b>FLT3</b>	437	RKPQVL	<b>A--E</b>	ASASQA	450	<b>PDGFRA</b>	279	EATVK	<b>D</b>	SGDYE	289

**Abbildung 5: Intraspezies-Vergleich von KIT und FLT3 im extrazellulären Bereich**

(A) und B. Der Bereich der jeweiligen Mutation in Exon 8 im humanen *KIT* bzw. *FLT3*-Gen wurde mittels „BLAST“-Recherche hinsichtlich übereinstimmender Regionen in den codierenden Sequenzen von *FLT3* bzw. *KIT*, *CSF1R* und *PDGFRA* untersucht. Aminosäuren werden im Ein-Buchstaben-Code dargestellt, die durch die jeweilige Mutation betroffenen Bereiche erscheinen **fett** gedruckt.

Die Lokalisation der *c-KIT*-Exon-8- bzw. *FLT3*-D324N-Mutation ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt, die auch die Position aktivierender Mutationen in der Aktivierungsschleife (D816V) bzw. im juxtamembranösen Bereich von *FLT3*-ITD (LM) enthält.



**Abbildung 6:**  
**Struktur von KIT und FLT3 mit untersuchten Mutationen**

TM = transmembranöse Region  
TKD = Tyrosinkinase-Domäne

### 4.1.2 C-KIT-Exon-8-Mutationen in Patienten weisen gemeinsame Muster auf

Mutationen in Exon 8 des *c-KIT*-Gens definieren sowohl hinsichtlich der genauen Position der mutierten Sequenz als auch der Art der Mutation eine äußerst heterogene Mutationsklasse. Kleinere Deletionen meist in Verbindung mit Punktmutationen oder Insertionen sind beschrieben (Gari, 1999; Care, 2003; Beghini, 2004; Kohl, 2005). Um dennoch eine funktionelle Charakterisierung dieser Mutationsklasse durchführen zu können, wurde versucht, aus den vorliegenden und aus Veröffentlichungen zugänglichen Patientendaten ein gemeinsames Muster herauszuarbeiten, das einen möglichst großen Anteil der Patientenproben umfasste. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der veröffentlichten Patientensequenzen:

Wildtyp	416	417	418	419	420	421	422
	Leu	Thr	Tyr	Asp	Arg	Leu	Val
<b>Patient 1</b>	Leu	Thr	Tyr	-	Arg	Leu	Val
<b>Patient 2</b>	Leu	Thr	Tyr	-	<b>Trp</b>	<b>Gly</b>	Val
<b>Patient 3</b>	Leu	Thr	<b>Arg</b>	-	<b>Trp</b>	Leu	Val
<b>Patient 4</b>	Leu	Thr	<b>Ala</b>	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 5</u>	Leu	<b>Ile</b>	-	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 6</u>	Leu	Thr	Tyr	-	-	<b>Phe</b>	Val
<u>Patient 7</u>	Leu	<b>Val</b>	-	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 8</u>	Leu	<b>Arg</b>	<b>Gly</b>	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 9</u>	Leu	<b>Ile</b>	-	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 10</u>	Leu	<b>Asn</b>	-	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 11</u>	Leu	Thr	Tyr <sup>§</sup>	Asp	<b>Gly</b>	Leu	Val
<u>Patient 12</u>	Leu	<b>Asn</b>	-	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 13</u>	Leu	<b>Lys</b>	<b>Ser</b>	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 14*</u>	Leu	<b>Phe</b>	<b>Arg</b> <sup>§§</sup>	Asp	Arg	Leu	Val
<u>Patient 15</u>	Leu	Thr	Tyr <sup>§§§</sup>	Asp	Arg	Leu	Val
<u>Patient 16</u>	Leu	<b>Arg</b>	<b>Ala</b>	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 17</u>	Leu	Thr	Tyr	-	Arg	Leu	Val
<u>Patient 18</u>	Leu	<b>Phe</b>	-	-	Arg	Leu	Val
<b>Exon8-1</b>	Leu	Thr	Tyr	-	Arg	Leu	Val
<b>Exon8-2</b>	Leu	Thr	-	-	Arg	Leu	Val
<b>Exon8-3</b>	Leu	<b>Ile</b>	-	-	Arg	Leu	Val

**Tabelle 1: Übersicht über die veröffentlichten Patientensequenzen mit Exon-8-Mutationen in c-KIT**

Patienten 1-4 wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenziert und veröffentlicht (Kohl, 2005). Patienten 5-11 und 12-18 entstammen anderen Publikationen (Gari, 1999; Beghini, 2004). Unterschiede zur im oberen Teil dargestellten KIT-Wildtyp-Sequenz wurden schwarz unterlegt, Insertionen werden durch (§) dargestellt und sind unter der Tabelle angegeben. Die Aminosäuresequenz von Patient 14 wurde aus der Nukleotidsequenz rekonstruiert, da diese bei Beghini et al. falsch übersetzt worden war. Der untere Teil der Tabelle (**Exon8-1** bis **Exon8-3**) gibt die durch ortsgerichtete Mutagenese *in vitro* hergestellten und in Ba/F3-Zellen transduzierten Mutanten wieder.

§ ins Phe Phe \* Aminosäuresequenz nach Nukleotiden  
 §§ ins Thr  
 §§§ ins Phe Phe

In etwa 83% der Fälle ist Codon D419 deletiert, so dass diese Einzelmutation in die Analysen miteinbezogen wurde (Mutante Exon8-1, Tabelle 1), obwohl sie in unserem eigenen Patientenscreening isoliert nur einmal gefunden wurde (Patient 1) (Kohl, 2005). In einer parallel durchgeführten Studie wurde ebenfalls in nur einem Patienten eine isolierte D419-

## Ergebnisse

Deletion festgestellt (Patient 17) (Beghini, 2004). Als weiteres mögliches Schema konnte eine kombinierte Deletion von Y418 und D419 identifiziert werden (Mutante Exon8-2), die zwar nicht isoliert auftrat, aber in sechs von 18 Fällen (33%) in Kombination mit einer Punktmutation an T417 festgestellt wurde (Patienten 5, 7, 9, 10, 12, 18). Für die In-vitro-Analysen wurde desweiteren die genaue Mutationssequenz der Patienten 5 und 9 herangezogen (Mutante Exon8-3), da die Kombination einer Punktmutation an T417 in Verbindung mit der kombinierten Deletion von Y418 und D419 mit 33% das häufigste Mutationsmuster in den vorliegenden Patientendaten darstellte. Andere Muster wie z.B. die Insertion von Aminosäuren nach Y418 wurden nur in zwei Patienten (11 und 15), also in 11% identifiziert.

Die drei Mutationen Exon8-1 bis Exon8-3 (Tabelle 1) wurden per Mutagenese in die KIT-Wildtyp-Sequenz eingeführt, welche zuerst in einen modifizierten pMSCV-IRES-EYFP-Vektor (MIY) umkloniert worden war. Diese cDNA, die freundlicherweise von Leonie K. Ashman (University of Adelaide, Australien) zur Verfügung gestellt wurde, kodiert für die lange Version von KIT (GNNK+, Ser+, vergleiche „Einleitung“).

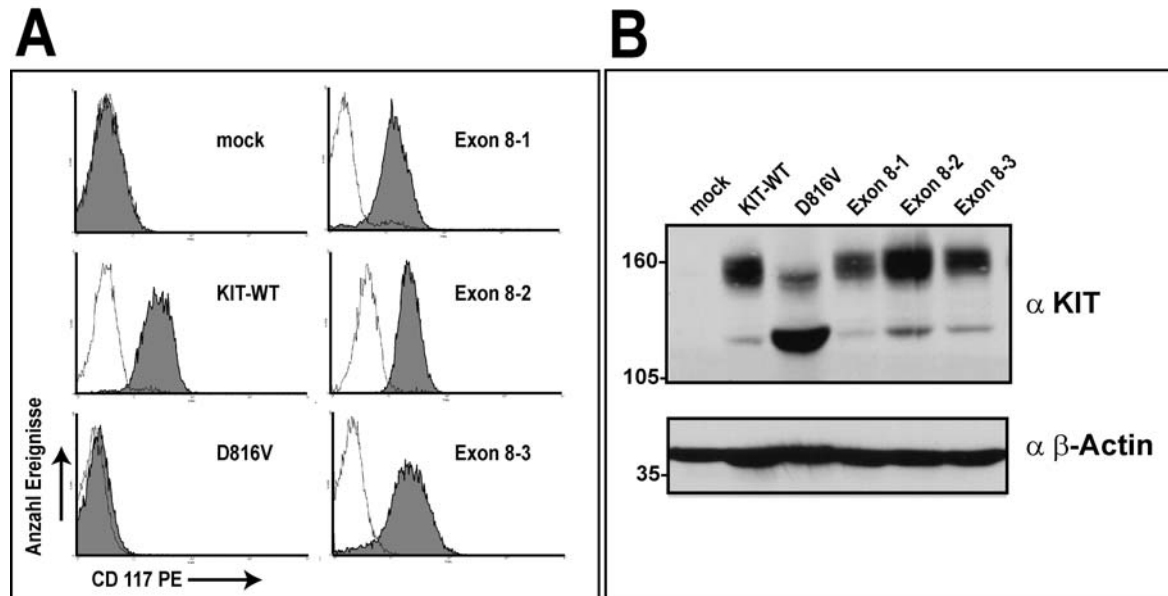
### **4.1.3 C-KIT-Exon-8-Mutanten wurden stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert**

Die generierten und mittels vollständiger Nukleotidsequenzierung überprüften Konstrukte wurden stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert. Dabei handelt es sich um murine lymphatische Pro-B-Zellen (Palacios, 1984), die sich insbesondere für das Studium von Protoonkogenen eignen (Hayakawa, 2000). Die Zelllinie zeigt über mehrere Passagen stabile IL-3-Abhängigkeit, so dass eine beobachtete Transformation im Gegensatz zu beispielsweise humanen AML-Zelllinien ausschließlich auf das eingebrachte Protoonkogen zurückzuführen ist.

Abbildung 7 zeigt sowohl die einheitliche Oberflächenexpression (Abb. 7A) des CD117-(KIT-)Antigens als auch die Expression der KIT-Konstrukte aus Ganzzelllysaten im Western Blot (Abb. 7B), wobei der Reblot mit einem Antikörper gegen das Strukturprotein  $\beta$ -Actin die gleichmäßige Proteinbeladung aller Bahnen zeigt.

## Ergebnisse

Die Rezeptorexpression auf der Oberfläche wurde in drei unabhängigen Versuchen mittels der 'mean channel fluorescence' (Gmean) überprüft und keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Ergebnisse ohne Abbildung).



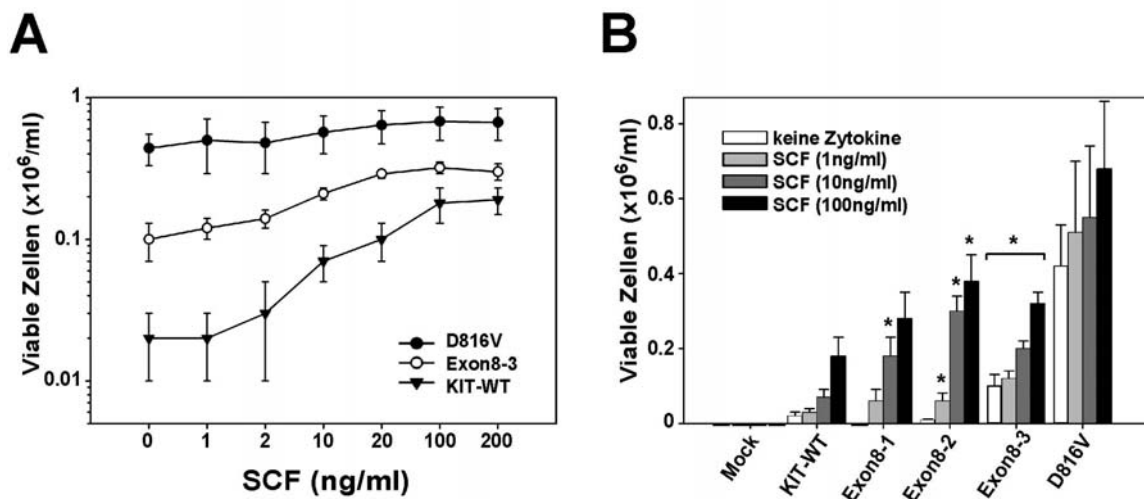
**Abbildung 7: Expression von KIT-Konstrukten in Ba/F3-Zellen**

Ba/F3-Zellen wurden im FACS (A) bzw. durch Western-Blotting (B) auf die Expression der generierten KIT-Konstrukte untersucht. Zu (A): Der sich ergebende Peak nach Färbung mit CD117-Antikörper ist grau gefüllt dargestellt, der Peak für die Isotyp-Kontrolle weiß.

Wie bereits erläutert, erscheinen KIT und FLT3 im Western Blot als Doppelbande, wobei die intrazelluläre, also nicht-glykosilierte Form des Rezeptors bei allen Konstrukten sichtbar war (Abb. 7B). Besonders prominent trat sie im Falle des KIT-Rezeptors mit der transformierenden Punktmutation D816V in der Aktivierungsschleife auf, der als Positivkontrolle in allen Versuchen mitgeführt wurde. Diese Tatsache scheint auf den verstärkten *turn-over* dieses Rezeptors zurückzuführen zu sein, der nach Auto-Aktivierung sofort internalisiert wird und deshalb überwiegend in der intrazellulären Form vorliegt, wie auch schon an anderer Stelle gezeigt (Longley, 1999). KIT-D816V ist daher auch auf der Oberfläche der Zellen nur schwach exprimiert (Abb. 7B). Vektor-transfizierte Zellen (mock) zeigten weder im FACS noch im Western Blot KIT-Expression.

#### 4.1.4 Exon-8-Mutationen in *c-KIT* führen im Ba/F3-Modell zu erhöhter Viabilität und Ansprechbarkeit auf Liganden

Um die Mutanten in Exon 8 des *c-KIT*-Protoonkogens in den Ba/F3-Zellen auf transformierendes Potential zu testen, wurden Proliferationsversuche durchgeführt, bei denen den Zellen das im Medium enthaltene IL-3 aus konditioniertem wehi-Überstand entzogen wurde. Aufgrund der Tatsache, dass die beschriebenen Mutationen im extrazellulären Teil des Rezeptors liegen und dort – wie gezeigt – die immunglobulin-ähnlichen Domänen 4 und 5 betreffen, wurden die generierten Ba/F3-Zelllinien zu Beginn des Proliferationsversuchs mit steigenden Konzentrationen des rekombinant-humanen KIT-Liganden Stammzellfaktor (SCF) inkubiert (Abb. 8). Dabei wurde darauf geachtet, durch die SCF-Dosen insbesondere den physiologischen und pathophysiologischen Bereich der SCF-Serumkonzentration bei Vorliegen einer AML abzudecken. Dieser liegt beim Gesunden ebenso wie bei Patienten mit hämatologischen Störungen zwischen 2 und 5ng/ml (Lyman und Jacobsen, 1998; Testa, 1994).



**Abbildung 8: Proliferationsversuche von KIT-transduzierten Ba/F3-Zellen**

Ba/F3-Zellen, die stabil die angegebenen Konstrukte exprimierten, wurden 72h in Abwesenheit von IL-3 kultiviert und zu Beginn der Kultur mit den angegebenen Dosen an SCF versetzt. (A) zeigt einen weit aufgespreizten Dosisbereich von SCF, mit welchem Exon8-3-exprimierende Zellen, KIT-WT- und KIT-D816V-Zellen versetzt wurden. (B) zeigt die Ergebnisse für alle untersuchten Exon-8-Mutanten. Dargestellt ist jeweils die Absolutzahl an lebenden Zellen pro ml nach 72h in Kultur. Es sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung gezeigt. Signifikante Unterschiede zu KIT-WT (bestimmt durch zweiseitigen gepaarten t-test) sind durch einen Stern gekennzeichnet (\*)

## Ergebnisse

KIT-D816V-transduzierte Zellen zeigten IL-3-unabhängiges Wachstum, allerdings nicht in solchem Maße wie beispielsweise Zellen mit FLT3-Längenmutationen, die unter diesen Bedingungen eine um den Faktor 1,5-2 erhöhte Zellzahl im Vergleich zu Zellen mit KIT-D816V erreichen (eigene Beobachtung). Dagegen zeigten Vektor-transduzierte Zellen (mock) kein IL-3-unabhängiges Wachstum. Zellen mit KIT-WT-Rezeptor waren zwar SCF-stimulierbar, wuchsen aber nicht ohne Zytokine. In allen SCF-Dosisbereichen führten die untersuchten Exon-8-Mutanten zu erhöhter Proliferation, allerdings war dies für den KIT-Rezeptor mit der einzelnen Deletion von D419 nur für 10ng/ml SCF signifikant im Vergleich zu KIT-WT ( $p < 0.05$ , zweiseitiger gepaarter t-test), während dies im Falle von Exon8-2, Exon8-3 und KIT-D816V für alle Dosisbereiche galt (für Exon8-3 war  $p < 0.01$  von 1 bis 20ng/ml SCF). Nur die Exon8-Mutante mit dem T417I-Austausch und der kombinierten Deletion der Codons 418 und 419 (Exon8-3) führte zu IL-3 unabhängigem Wachstum, allerdings nicht im Maße wie KIT-D816V.

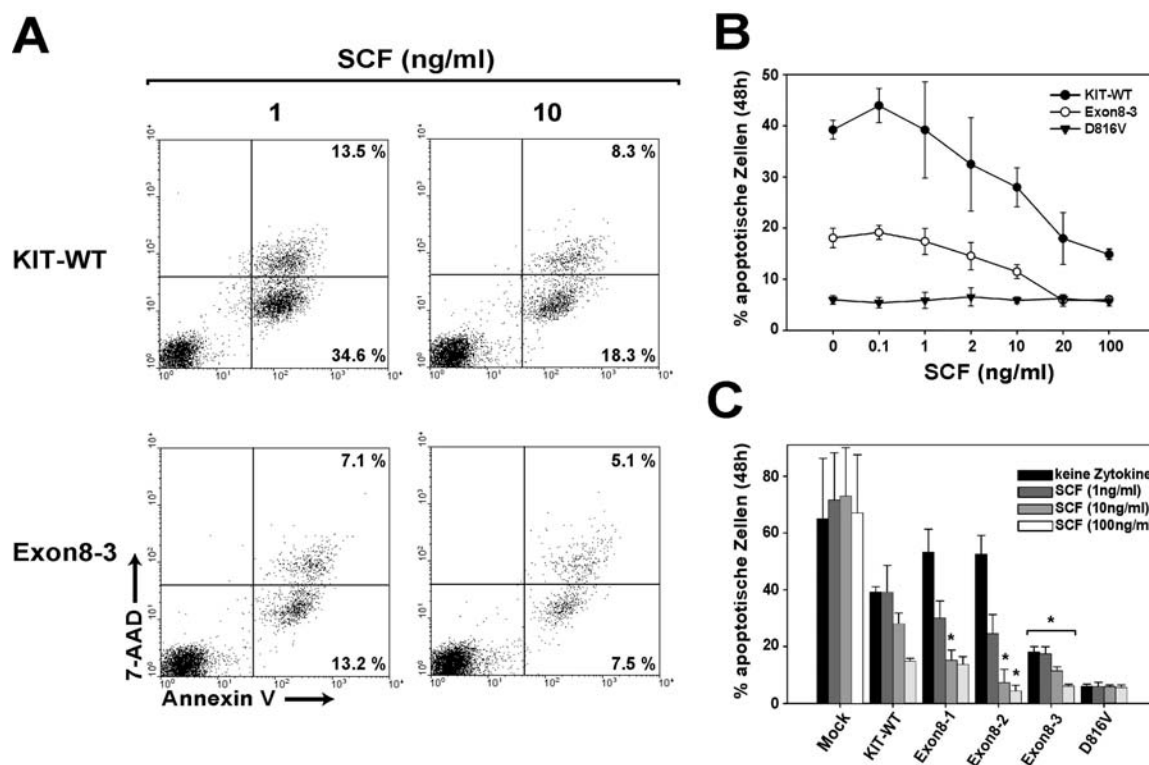
### **4.1.5 Exon-8-Mutationen führen zu erhöhter Apoptoseresistenz von transduzierten Ba/F3-Zellen im Vergleich zu Wildtyp**

Rezeptortyrosinkinasen mit *gain-of-function*-Mutationen führen im In-vitro-Modell häufig einerseits zu erhöhter Proliferation, andererseits zu antiapoptotischen Effekten, die auf der Aktivierung der nachgeordneten Signalwege des Rezeptors beruhen (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Vogelstein und Kinzler, 2004; Sridhar, 2000). Um den Grad der Resistenz gegen apoptotischen Zelltod zu bestimmen, den die Expression der Exon-8-Mutanten im Zellkulturmodell hervorruft, wurden die Ba/F3-Zellen nach IL-3-Entzug für 48h mit steigenden SCF-Konzentrationen kultiviert und der Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt (Abb. 9). Anhand der Doppelfärbung mit Annexin-V-PE und 7-AAD konnte in den Versuchen zwischen den Populationen von früh- und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden (Abb. 9A, vergleiche auch Material-und-Methoden-Teil). In die Auswertung miteinbezogen wurde allerdings nur der Gesamtprozentsatz an apoptotischen Zellen (Abb. 9 B und C). Mock-Zellen wiesen nach IL-3-Entzug etwa 70-80% apoptotische Zellen auf, während Zellen mit KIT-D816V nur einen geringen Prozentsatz aufwiesen (etwa 5-10%), der von der eingesetzten SCF-Dosis unabhängig war. Demgegenüber führte KIT-WT zu einer Abnahme der apoptotischen Zellzahl von etwa 40% ohne Zytokine auf 15% mit



## Ergebnisse

100ng/ml SCF. Bei den Zellen mit KIT-Exon8-3 reduzierte sich dieser Anteil von ein- gangs 20 auf 5%. Auch hier waren alle Werte signifikant unterschiedlich zu KIT-WT, während für Exon8-1 und Exon8-2 nur eine Stimulation mit höheren SCF- Konzentrationen signifikante Unterschiede zeigte.



**Abbildung 9: Messung des Anteils an apoptotischen Ba/F3-Zellen nach Inkubation für 48h**

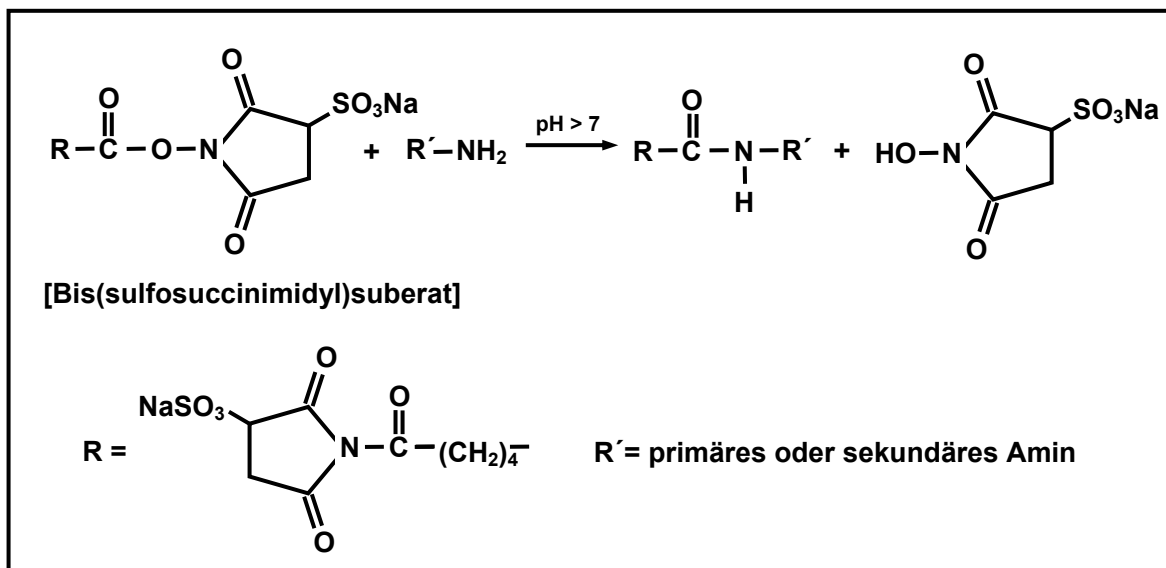
(A) zeigt repräsentative Dotplots. (B) und (C) zeigen die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung, wobei der Anteil der apoptotischen Zellen jeweils auf die mitgeführte IL-3-stimulierte Kontrolle bezogen ist.

### 4.1.6 KIT-Mutante Exon8-3 zeigt spontane und erhöhte ligandeninduzierte Rezeptordimerisierung

Da die Exon-8-Mutationen im extrazellulären Bereich des KIT-Rezeptors nahe der Dimerisierungsdomäne (④) liegen, wurde die Hypothese aufgestellt, der in Ba/F3-Zellen beobachtete Phänotyp könnte durch eine erleichterte spontane und/oder ligandeninduzierte Dimerisierung des mutierten KIT-Rezeptors zustande kommen, welche beim Wildtyp der

## Ergebnisse

Cis- und Transphosphorylierung mit nachfolgender Aktivierung von Downstream-Signalwegen vorangeht (Stirewalt und Radich, 2003). Durch Einsatz eines Crosslinkers ist es möglich, gebildete Rezeptor-Dimere oder Rezeptor-Ligand-Komplexe mit hoher Ausbeute kovalent zu verbinden und sie dann durch Western-Blotting zu analysieren. Um nur den Rezeptor auf der Zelloberfläche durch die Reaktion zu erfassen, wurde der Crosslinker BS<sup>3</sup> verwendet, der aufgrund der Sulfo-Gruppe an beiden Succinimid-Resten wasserlöslich und damit im Gegensatz zu DSS, dem diese Gruppen fehlen, nicht membranpermeabel ist (Coico, 1994). Beide Substanzen sind homobifunktionelle N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester), die einen Spacer-Arm von 11,4 Å besitzen und damit nur extrem nah beieinander liegende Substrate verlinken. Ziel des Crosslinkings sind α-Aminogruppen am Endterminus oder ε-Aminogruppen der Seitenkette von Lysin-Resten (Abb. 10).



**Abbildung 10: Chemisches Crosslinking mit BS<sup>3</sup>**

R' bezeichnet die zu verlinkenden Amine des Zielproteins

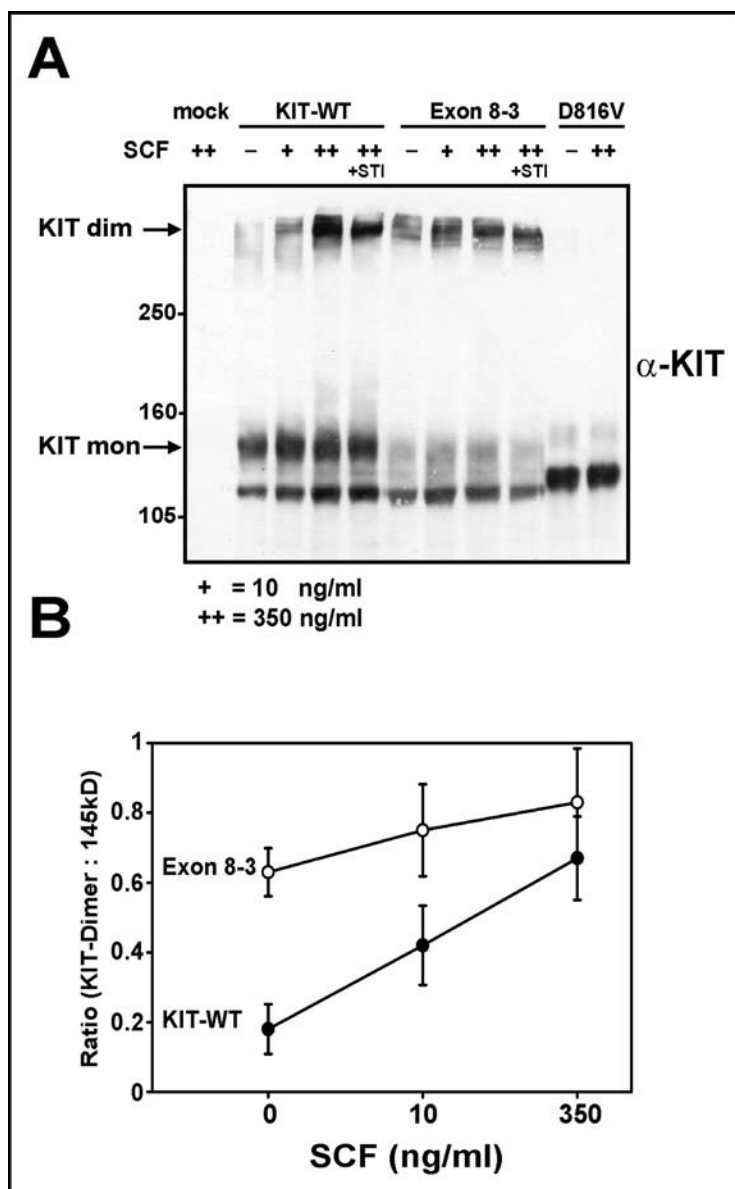
Im Gegensatz zu Arylazid- oder Nitren-basiertem Crosslinking ist die ablaufende Acylierung der Amine langsam und eine Gleichgewichtsreaktion, so dass damit die Spezifität der Reaktion erhöht wird. Einmal gebildete kovalente Brücken können nur unter extrem reduzierenden Bedingungen oder unter Einsatz eines reversiblen Crosslinkers wie DTSSP aufgespaltet werden (Carlberg und Rohrschneider, 1994).

## Ergebnisse

Abbildung 11 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit den unverlinkten (**KIT mon**) und durch BS<sup>3</sup>-Behandlung verlinkten KIT-Proteinen (**KIT dim**). Da ein denaturierendes SDS-Gel verwendet wurde, wurde ohne den Einsatz eines Crosslinkers kein dimeres KIT-Protein, das z.B. durch den Austausch von Disulfidbrücken zustande kommen könnte, detektiert (Ergebnisse ohne Abbildung). Unstimulierter KIT-WT-Rezeptor zeigte nur einen sehr geringen Grad an Dimerisation, der jedoch durch SCF-Stimulation dosisabhängig gesteigert werden konnte, während der Exon8-3-Rezeptor auch ohne SCF schon zu einem großen Anteil dimerisiert vorlag. Der Dimerisierungsgrad dieses Rezeptors konnte durch den Zusatz von SCF ebenfalls noch weiter gesteigert werden (Abb. 11A). Der Anteil von intrazellulärem, nicht-glykosiliertem KIT-Exon8-3-Rezeptor wurde durch das Crosslinking mit dem membranimpermeablen BS<sup>3</sup> nicht erfasst und blieb konstant (Bande bei etwa 110-115 kDa). Abbildung 11B zeigt das Verhältnis von KIT-Dimer zu Monomer aus drei unabhängigen Versuchen, wobei sich für den unteren Dosisbereich von SCF (0 und 10ng/ml) ein signifikanter Unterschied zeigte. Desweiteren konnte für den konstitutiv aktivierten KIT-D816V-Rezeptor gezeigt werden, dass er auch unter maximaler Ligandenstimulation (100ng/ml) nicht als Dimer vorliegt. Dies könnte beispielsweise durch die höhere Affinität dieses Rezeptors für ATP erklärt werden, der somit als Monomer konstitutiv aktiviert ist (Heinrich, 2002). Demgegenüber liegen beispielsweise transformierende FLT3-Rezeptoren mit einer Längenmutation in der juxtamembranösen Region auch ohne Ligand konstitutiv als Dimere vor, und trunkierte, damit kinase-tote FLT3-LM sind in der Lage, FLT3-WT ligandenunabhängig zu aktivieren (Kiyoi, 2002).

Um die Auswirkung des spezifischen PTK-Inhibitors Imatinib (STI 571) auf die Rezeptordimerisierung zu zeigen, wurde dieser den angegebenen Zellproben zusätzlich zu Crosslinker und SCF verabreicht, wobei sich keine vollständige Hemmung der Dimerisierbarkeit ergab (Abb. 11A). Dies ist dadurch zu erklären, dass der Tyrosin-Phosphorylierung von RTK, die durch den kompetitiven ATP-Antagonisten Imatinib gehemmt wird, die Rezeptordimerisierung vorangeht und diese somit nicht der Inhibition unterliegt. In Kontrollversuchen mit anti-phospho-Tyrosin-Antikörper wurde einerseits die Phosphorylierung der erhaltenen Rezeptordimere sichtbar, andererseits war die Phosphorylierung der Rezeptoren durch Imatinib zu einem hohen Grad hemmbar (Ergebnisse ohne Abbildung).

## Ergebnisse



**Abbildung 11: Crosslinking-Versuche mit transient transfizierten 293T-Zellen**

HEK-293T-Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und chemischem Crosslinking mit BS<sup>3</sup> unterzogen. Die Zellen wurden vor der Prozedur 2h auf Eis mit den angegebenen SCF-Konzentrationen bzw. mit 10µM Imatinib (STI) behandelt.

(A) KIT dim und KIT mon zeigen die Position der jeweiligen Proteine auf dem dargestellten repräsentativen Blot. (B) zeigt das Verhältnis von dimerisiertem zu nicht-dimerisiertem KIT-Protein aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mit Standardabweichung.

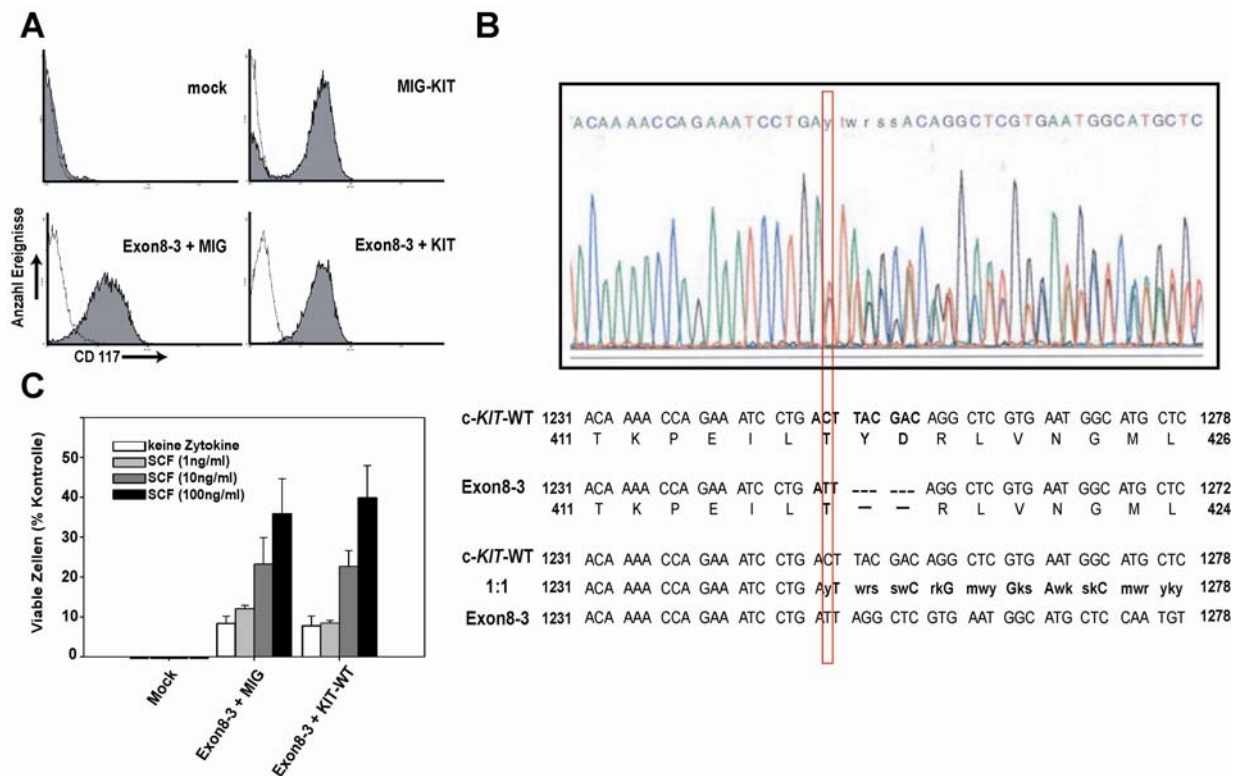
Die Spezifität der Crosslinking-Reaktion konnte durch Einsatz eines speziellen Markers demonstriert werden (Sigma), der auf der Detektion von verlinkter Phosphorylase b beruht. Die zu detektierenden Banden reichen vom Monomer (97,4 kDa) bis zum Hexamer (584,0 kDa), wobei die Stärke der Banden aber mit zunehmender Größe des Polymers abnimmt, so dass mit den hier verwendeten Methoden nur das Tetra- bzw. Pentamer (389,6kDa und 487,0 kDa) der Phosphorylase b detektiert werden konnte. Die entstandenen Produkte aus der Crosslinking-Reaktion erschienen etwa auf Höhe des Tetramers des Markers bei ~390 kDa. Dies passt gut zum rechnerischen Dimer des KIT-Rezeptors von etwa 290-310 kDa, an das nach Crosslinking kovalent SCF als Dimer gebunden ist. Im

Gegensatz zu M-CSF, welches über eine ungepaarte Disulfid-Brücke kovalent als Dimer vorliegt, sind SCF-Dimere über nicht-kovalente Wechselwirkungen verlinkt (Lyman, 1993). Die prozessierte Form von SCF, die aus einem 35-kDa-großen Vorläufer-Protein hervorgeht, weist ein Molekulargewicht von 45 kDa auf.

### **4.1.7 Kotransduktion des Wildtyp-Rezeptors mit Exon8-3-Mutante führt nicht zu erhöhter Transformation**

Exon-8-Mutationen im *c-KIT*-Protoonkogen sind – wie berichtet – somatisch und bei Patienten in klinischer Remission nicht mehr detektierbar (Gari, 1999). Bei betroffenen Patienten koexistieren daher theoretisch sowohl Wildtyp- als auch mutierter Rezeptor. Um die Interaktion der beiden Proteine zu studieren, wurde cDNA für KIT-WT in MIG-Vektor umklont und dieses Konstrukt zusammen mit MIY-Exon8-3 in Ba/F3-Zellen exprimiert (Abbildung 12). Der Expressionsnachweis wurde sowohl im FACS (Abb. 12A) als auch auf Ebene der mRNA geführt, die in cDNA umgeschrieben und sequenziert wurde (Abb. 12B). Es ergab sich das Elektropherogramm eines „heterozygoten“ Patienten: ab der eingeführten Punktmutation mit Deletion von sechs bp überschneiden sich beide Sequenzen (Abb. 12B). Diese Zellen wurden in Proliferationsversuchen untersucht, wobei allerdings bezüglich Zellwachstums nach SCF-Stimulation kein Unterschied zwischen Exon8-3-mock-transduzierten und Exon8-3-KIT-WT-transduzierten Zellen festgestellt werden konnte (Abb. 12C). Im verwendeten Ba/F3-Modell scheint daher der WT-Rezeptor weder einen hemmenden/dominant-negativen Effekt noch einen steigernden Einfluss auf die Transformation von Exon8-3-Zellen auszuüben.

## Ergebnisse



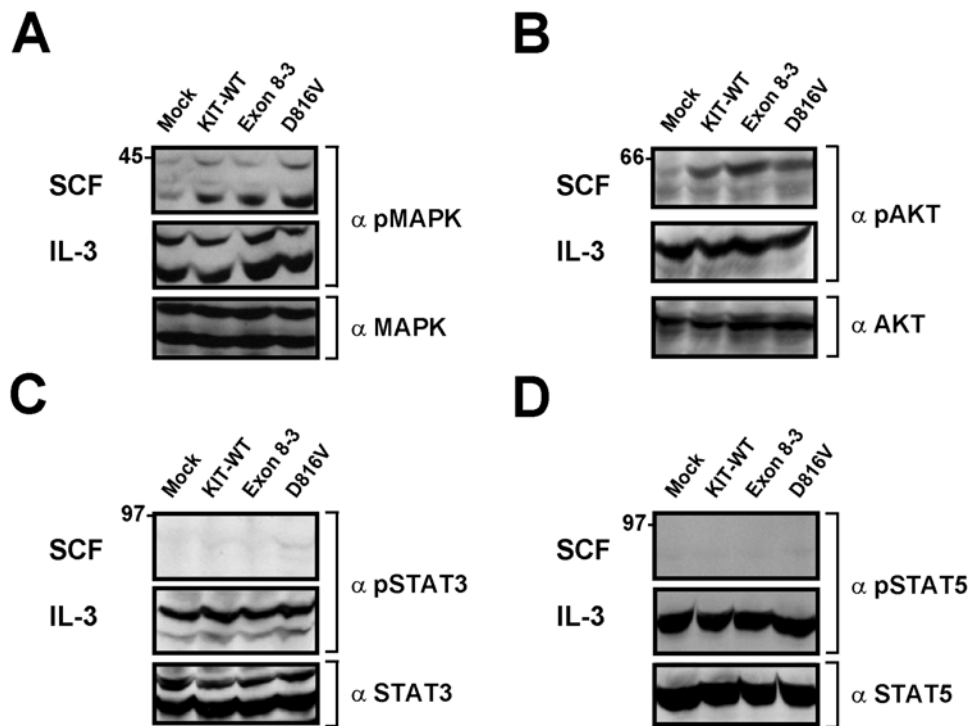
**Abbildung 12: Doppeltransduktion von Ba/F3-Zellen mit MIY-Exon8-3 und MIG-KIT-WT**

(A) Ba/F3-Zellen wurden mit MIY-Exon8-3 und MIG-Vektor oder mit MIY-Exon8-3 und MIG-KIT-WT transduziert und die Expression von KIT im FACS detektiert. (B) mRNA aus beiden Zelllinien wurden extrahiert, in cDNA umgeschrieben und in Exon 8 sequenziert. Die Abbildung zeigt das Elektropherogramm von Exon8-3-KIT-WT-Zellen und die entsprechend aufgeschlüsselten Sequenzen. Ab der Punktmutation in Codon 417 (ACT -> ATT) wird die Sequenz uneinheitlich. Die 1:1-Sequenz ist im Ein-Letter-Code nach den Empfehlungen des Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) dargestellt. (C) Ergebnisse aus Proliferationsversuchen über 72h.

### 4.1.8 Stimulation des KIT-Rezeptors bewirkt die Aktivierung der nachgeordneten Signalwege MAPK und AKT in Ba/F3-Zellen

Für die Untersuchung der nachgeordneten Signalwege, die sowohl durch mutierten als auch WT-Rezeptor im verwendeten In-vitro-Modell nach SCF-Stimulation aktiviert wurden, wurden Ganzzelllysate aus gehungerten Ba/F3-Zellen verwendet, die zuvor – wie beschrieben – mit unterschiedlichen Dosen SCF bzw. IL-3 stimuliert worden waren. Für die Analysen wurde der Exon8-3-Rezeptor verwendet, der - wie gezeigt – repräsentativ für ein verbreitetes Muster in allen KIT-Exon-8-Mutationen stehen könnte (Abbildung 13):

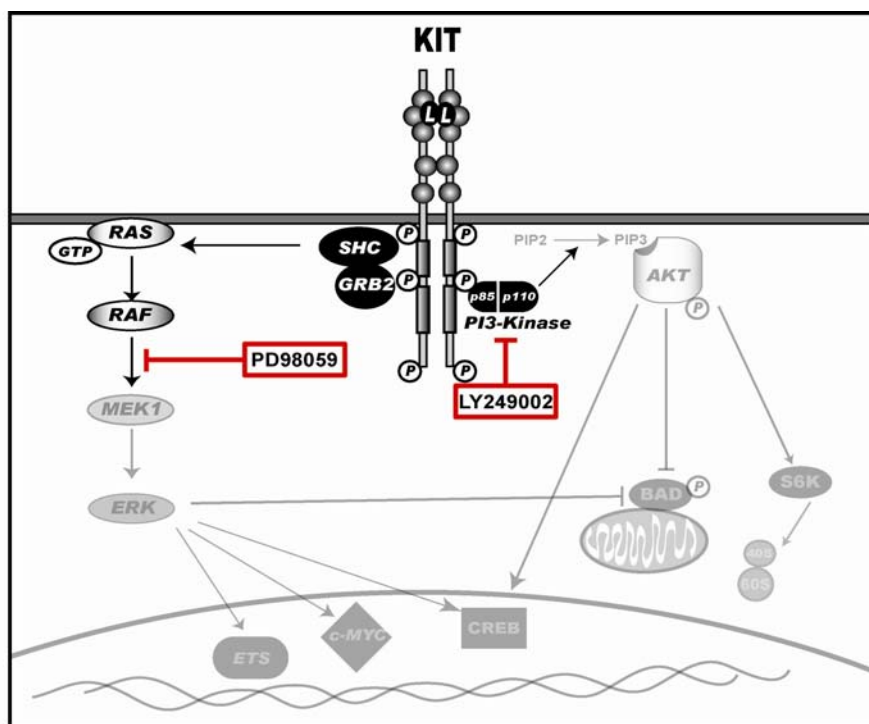
## Ergebnisse



**Abbildung 13: Nach Ligandenstimulation durch KIT aktivierte Signalwege**

Für 12h gehungerte Ba/F3-Zellen wurden mit den angegebenen Zytokinen stimuliert und lysiert. Äquivalente Proben der Ganzzelllysate wurden durch Western-Blotting mit den angegebenen phosphospezifischen Antikörpern gegen MAPK (ERK 1/2), AKT, STAT3 und STAT5 analysiert. Für die abgebildeten Reblots, die der Ladungskontrolle dienten, wurde das Ganzzelllysate der SCF-stimulierten Proben (100ng/ml) eingesetzt.

Im verwendeten Modell konnte nach SCF-Stimulation mit 100ng/ml eine deutliche Phosphorylierung von Erk 1/2 (MAPK) an T202 und Y204 sowie von AKT an S473 in allen KIT-transduzierten Zelllinien gezeigt werden (Abb. 13 A und B), wobei Zellen mit KIT-D816V bereits ohne Stimulation eine signifikante Phosphorylierung beider Signalmoleküle zeigte. Überdies wurde auch versucht, den Grad der Phosphorylierung der Signalmoleküle STAT3 (Y705) und STAT5 (Y694) zu zeigen. Im Falle von STAT3 konnte nur für KIT-D816V ein schwaches Signal detektiert werden (Abb. 13C), während für STAT5 keine der untersuchten Zelllinien ein Signal lieferten (Abb. 13D). Der Stellenwert der Signalwege MAPK und AKT für die SCF-abhängige Proliferation von KIT-transduzierten Ba/F3-Zellen wurde neben diesen Versuchen noch durch die Verwendung zweier spezifischer Inhibitoren, PD98059, eines MEK1-Inhibitors, und LY249002, eines PI3-Kinase-Inhibitors, gezeigt (eine schematische Übersicht der Angriffspunkte der Inhibitoren ist in Abbildung 14 dargestellt).



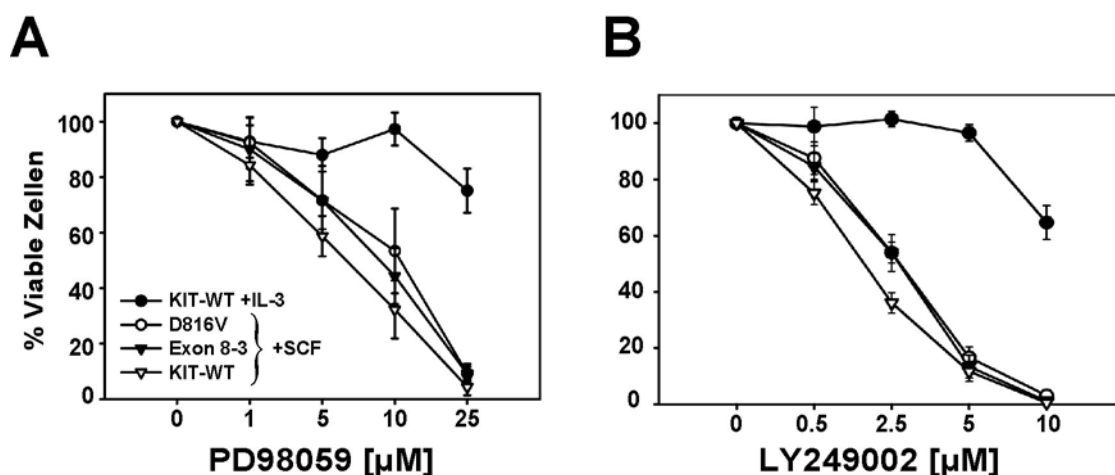
**Abbildung 14:**  
**Durch Ligan-**  
**denstimulation**  
**von KIT akti-**  
**vierte Signal-**  
**wege und**  
**Hemmung**  
**durch spezifi-**  
**sche Inhibito-**  
**ren**

Nach Liganden-Bindung (L) dimerisiert KIT und wird transphosphoryliert (P). Nach Bindung von Adaptorproteinen (SHC = SH2-containing sequence proteins, GRB2 = growth factor receptor-bound protein 2) werden nachfolgende Signalwege wie der MAPK-Signalweg (links) oder durch Bindung der regulatorischen p85-Untereinheit von PI3-Kinase der AKT-Signalweg (rechts) aktiviert. Diese führen über Signalkaskaden (RAS-RAF-MEK1-ERK) zur Phosphorylierung und DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren (ETS, c-MYC, CREB) an die jeweiligen DNA-response elements. AKT aktiviert direkt die für die Translation benötigte S6-Kinase (S6K), ERK und AKT inhibieren durch Phosphorylierung das proapoptische Protein BAD (BCL-2 antagonist of cell death). Die nach den Angriffspunkten der Substanzen PD98059 (Aktivierung von MEK1) und LY249002 (Aktivierung von PI3-Kinase) folgenden Signalkaskaden sind transparent dargestellt (Abbildung modifiziert nach Lee und McCubrey, 2002; Sattler und Salgia, 2004; Stirewalt und Radich, 2003).

Alle KIT-transduzierten Zellen zeigten selektives Ansprechen auf beide Inhibitoren (Abb. 15), wobei diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zwischen den Linien, wohl aber eine tendenzielle Abstufung des  $IC_{50}$ -Wertes, also der 50%igen Hemmdosis, für PD98059 gefunden wurde (siehe Tabelle 2). Hierbei war die KIT-D816V-Zelllinie mit einer  $IC_{50}$  von 10.0  $\mu$ M am unempfindlichsten, während sich für Zellen mit KIT-WT eine  $IC_{50}$  von 6.0 und mit KIT-Exon8-3 von 8.5 $\mu$ M ergab.



## Ergebnisse



**Abbildung 15: Effekte der spezifischen Inhibitoren PD98059 und LY249002 auf die Proliferation von KIT-transduzierten Ba/F3-Zellen**

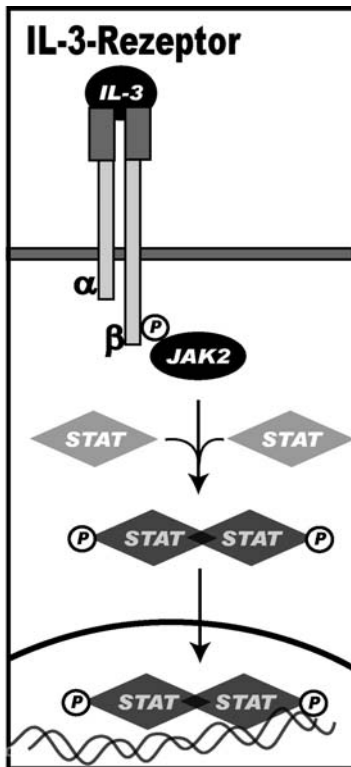
Ba/F3-Zellen wurden mit IL-3 (10ng/ml) und SCF (100ng/ml) kultiviert. Diese Zellen wurden jeweils mit steigenden Dosen eines MEK1-Inhibitors (PD98059) und eines PI3-Kinase-Inhibitors (LY249002) behandelt. Es ist der Prozentsatz an viable Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt.

	IC <sub>50</sub> [µM]		
	Imatinib	PD98059	LY294002
KIT-WT	0.07	6.0	1.5
Exon8-3	0.05	8.5	2.5
D816V	3.0*	10.0	2.5
KIT-WT + IL-3	7.0*	>25	>10

**Tabelle 2: Darstellung der IC<sub>50</sub>-Werte für unterschiedlich stimulierte KIT-transduzierte Zellen**

Mittels Stimulation des IL-3-Rezeptors in den Ba/F3-Zellen war es möglich, die Effekte beider Inhibitoren nahezu vollständig aufzuheben, wobei mit den angewandten Konzentrationen keine IC<sub>50</sub> bestimmbar war (Abb. 15, Tabelle 2). Das Schema dieses „rescue“-Signalweges zeigt Abbildung 16.

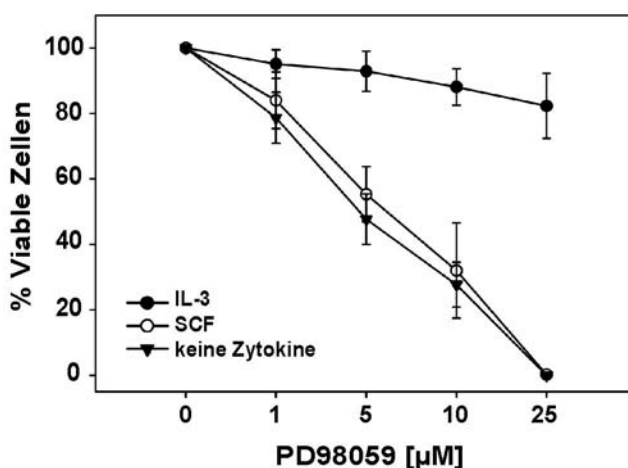
## Ergebnisse



**Abbildung 16 : Rescue von Ba/F3-Zellen durch Aktivierung des IL-3-Rezeptors**

Neben der Aktivierung des MAPK-Signalweges und der direkten Bindung der p85-Untereinheit der PI3-Kinase (hier nicht gezeigt) kann der IL-3-Rezeptor nach Ligandenbindung über die  $\beta$ -Kette zytosolische Kinasen wie **JAK2** (just another kinase 2) rekrutieren, während er selbst über keine intrinsische Kinase-Aktivität verfügt. Gebundenes JAK2 rekrutiert daraufhin **STAT**-Monomere (*signal transducers and activators of transcription*), die nach Phosphorylierung in den Zellkern translokieren und die Transkription von Zielgenen initiieren. (Abbildung modifiziert nach Lee und McCubrey, 2002). Durch die starke Aktivierung von STAT-Signalwegen nach IL-3-Stimulation sind Ba/F3-Zellen in der Lage, die Inhibition mit PD98059 oder LY249002 zu überleben.

Auch die spontane Proliferation der Exon8-3-Zelllinie zeigte sich gegenüber PD98059 empfindlich (Abb. 17):



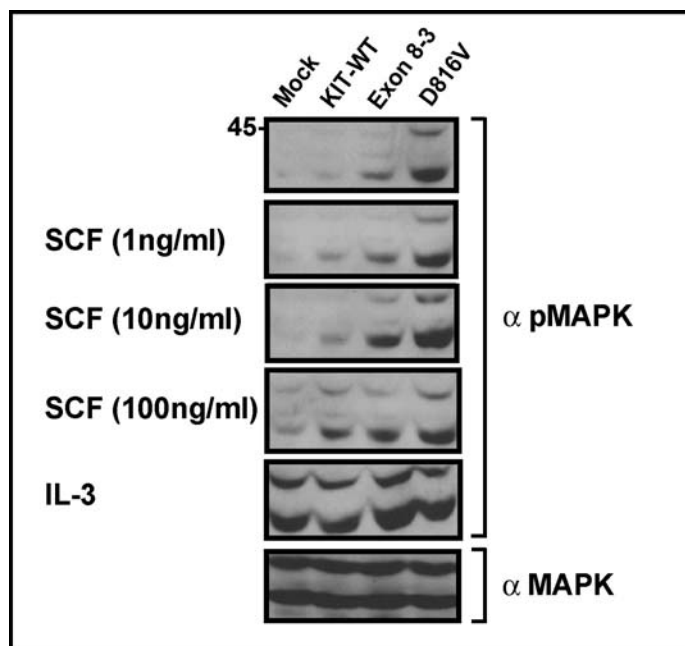
**Abbildung 17: Effekte des MEK1-Inhibitors PD98059 auf die Proliferation von Ba/F3-Zellen mit KIT-Exon8-3**

Ba/F3-Exon8-3-Zellen wurden mit IL-3, SCF oder ohne Zytokine kultiviert. Es ist der Prozentsatz an viable Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt.

Für die repräsentative KIT-Exon-8-3-Mutante konnte demnach in unserem In-vitro-Modell gezeigt werden, dass die Aktivierung des MAPK-Signalweges sowohl für die ligandenabhängige als auch ligandenunabhängige Proliferation essentiell ist.

#### 4.1.9 Exon8-3-Mutante zeigt spontane und erhöhte liganden-induzierte Aktivierung von MAPK im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor

In einer Reihe von Experimenten wurde versucht, auch quantitative Unterschiede zwischen KIT-transduzierten Zelllinien hinsichtlich Aktivierung von MAPK und AKT zu zeigen. Während signifikante Unterschiede in der Phosphorylierung von MAPK demonstriert wurden, konnten die in einzelnen Western-Blots gezeigten Unterschiede hinsichtlich AKT-Phosphorylierung nicht immer reproduziert werden (Ergebnisse ohne Abbildung). Abbildung 18 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit Proben von mit ansteigenden Konzentrationen an SCF oder IL-3 stimulierten Ba/F3-Zellen.



**Abbildung 18: Erhöhte ligandeninduzierte Phosphorylierung von MAPK in Exon8-3 exprimierenden Ba/F3-Zellen**

Transduzierte Ba/F3-Zellen wurden für 24h gehungert (0.3% FBS) und mit den angegebenen Konzentrationen von SCF oder IL-3 (50ng/ml) für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Ganzzelllysate aus den Zellen wurden durch Western-Blotting mit einem polyklonalen phosphospezifischen Antikörper gegen MAPK ( $\alpha$ -pMAPK) analysiert. Gleiche Level an MAPK in den Lysaten wurden durch Immunoblotting mit einem Antikörper gegen MAPK ( $\alpha$ -MAPK) nachgewiesen, nur der Reblot für die Konzentration von 10ng/ml ist gezeigt.

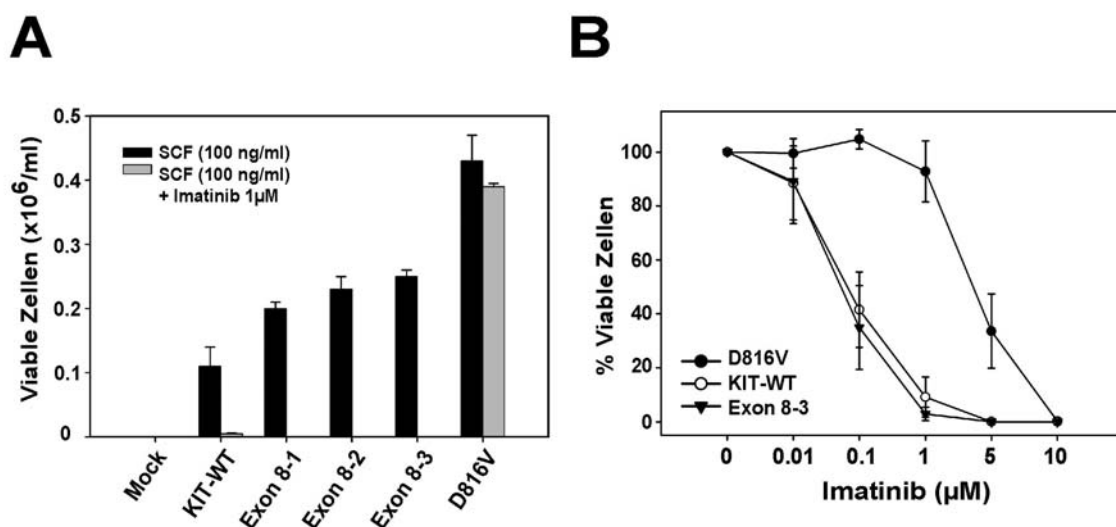
Während Mock-Zellen nur nach IL-3-Stimulation MAPK-Phosphorylierung aufwiesen, war dieses Signalmolekül in KIT-D816V-Zellen konstitutiv phosphoryliert. Phosphorylie-

## Ergebnisse

Die Aktivierung von MAPK zeigte auch unstimulierte Exon8-3-Zellen, wobei diese durch Stimulation mit SCF verstärkt werden konnte. In allen SCF-Konzentrationsbereichen mit Ausnahme der Maximaldosis war das Signal stärker als in KIT-WT-Zellen. IL-3 führte zu nachhaltiger Aktivierung von MAPK in allen Zelllinien.

### 4.1.10 Alle getesteten Exon-8-Mutanten sprechen auf den selektiven PTK-Inhibitor Imatinib an

Um die Ansprechbarkeit von Exon-8-Mutationen auf den für die Therapie der CML zugelassenen PTK-Inhibitor Imatinib (Glivec<sup>®</sup>) zu testen, wurden Proliferationsversuche mit allen Exon-8-Mutanten durchgeführt (Abbildung 19). KIT-D816V war – wie beschrieben – bis zu 1  $\mu$ M Imatinib resistent, alle anderen Exon-8-Mutationen zeigten einen IC<sub>50</sub>-Wert von ungefähr 50nM. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse mit spezifischen Inhibitoren zeigt Tabelle 2.



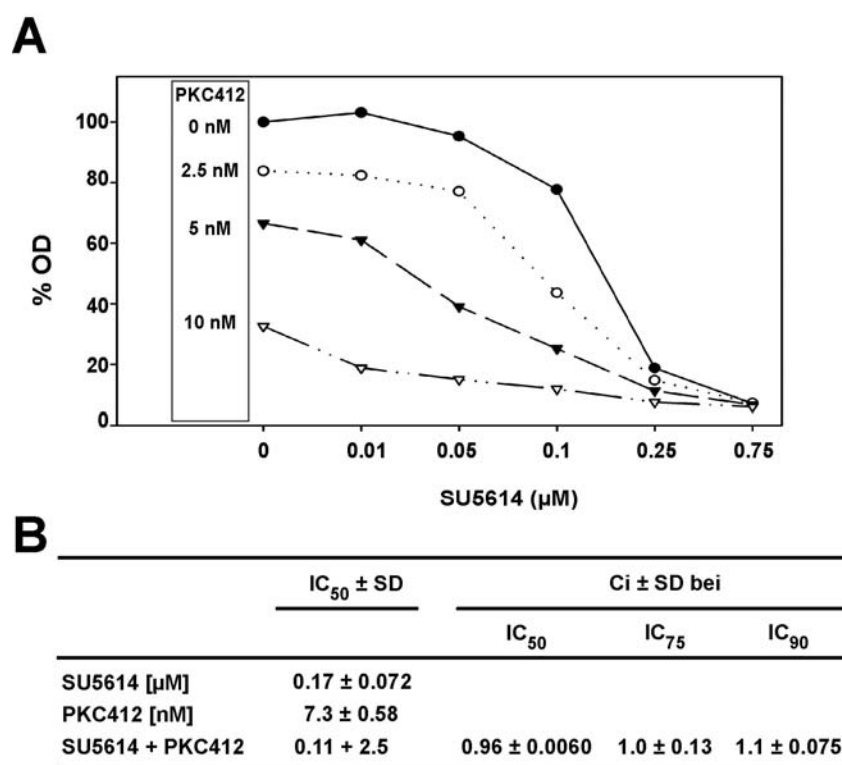
**Abbildung 19: Proliferationsversuche mit KIT-transduzierten Ba/F3-Zellen und Imatinib**

(A und B) KIT-transduzierte Zellen wurden – wie beschrieben – in An- und Abwesenheit von Imatinib ausgesät, alle Zelllinien wurden dabei mit 100ng/ml SCF stimuliert.

## 4.2 Kombinationen von PTK-Inhibitoren und konventioneller Chemotherapie

### 4.2.1 Die Kombination der ATP-Antagonisten PKC412 und SU5614 zeigt keinen Synergismus in Zellen mit FLT3-Längenmutationen

Die Standard-Therapie der AML besteht derzeit aus einer Kombination von Zytostatika, die durch Anwendung von FLT3- oder KIT-Inhibitoren, allein oder in Kombination, ergänzt werden könnte. Anhand des Ba/F3-Modells sollte gezeigt werden, in wieweit die Kombination aus strukturell unterschiedlichen RTK-Inhibitoren *in vitro* einen Vorteil gegenüber der Anwendung von Einzelsubstanzen darstellen könnte. Zu diesem Zweck wurden Ba/F3-Zellen, die mit FLT3-Längenmutation (w51) transduziert worden waren, mit Einzeldosen oder Kombinationen von PKC412 und SU5614 behandelt, wobei ein nicht-fixes Verhältnis der Inhibitoren gewählt wurde. Eine Inhibitor-Dosis wurde hierbei jeweils konstant gehalten, die jeweilig andere variierte (Abb. 20).



## **Abbildung 20: Kombination aus den PTK-Inhibitoren PKC412 und SU5614 führt zur Hemmung der Proliferation von Ba/F3-FLT3-LM-Zellen**

(A) Darstellung der erhaltenen Kurvenscharen aus einem repräsentativen MTT-Versuch (B) Zusammenstellung der nach graphischer Auswertung erhaltenen kombinatorischen Indizes ( $C_i$ ) für die verschiedenen Dosisbereiche und die entsprechenden  $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichung.

Eine repräsentative Kurvenschar ist in Abbildung 20A dargestellt. Die Berechnung erfolgte nach graphischer Auswertung der Kurvenscharen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (Abb. 20B). In allen drei untersuchten Dosisbereichen waren die beobachteten Effekte rein additiv, d.h. die  $C_i$ -Werte bewegten sich im Bereich von 0.9-1.1.

Neben diesen Ergebnissen konnte im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit auch gezeigt werden, dass das Wachstum von Ba/F3-FLT3-LM-Zellen, die eine Resistenz gegenüber SU5614 aufwiesen, durch Anwendung eines strukturell unverwandten Inhibitors wie PKC412 inhibiert werden konnte (Ergebnisse ohne Abbildung, siehe auch: Bagrintseva, 2004).

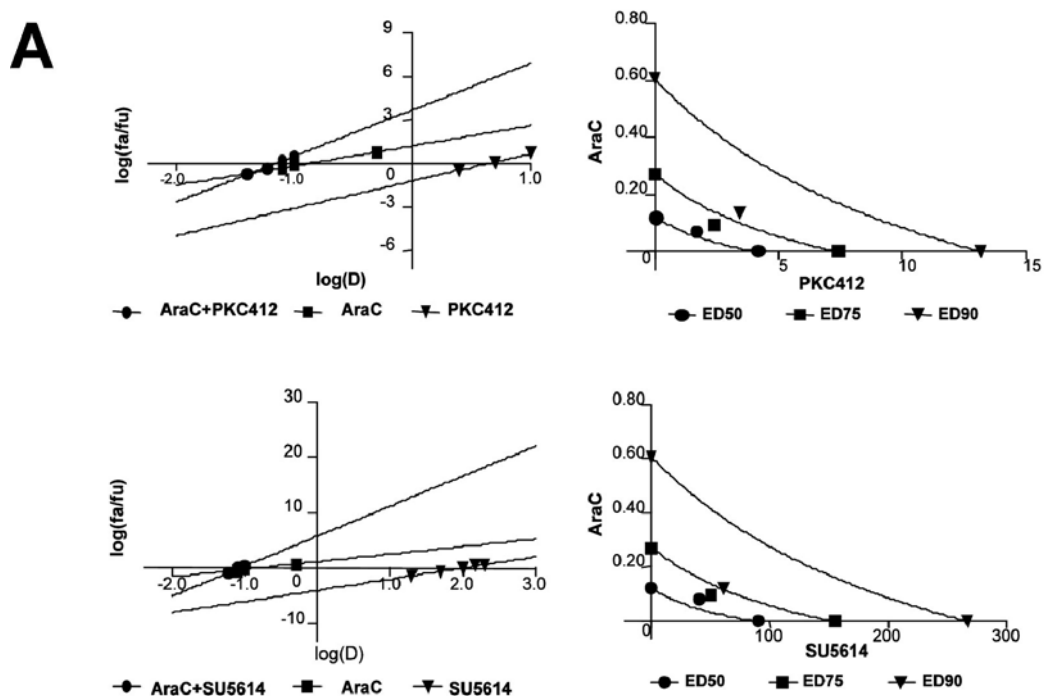
### **4.2.2 Die Kombination aus PKC412 bzw. SU5614 und Cytosin-Arabinosid zeigt Synergismus-Effekte**

Um auch eine Kombination aus einem Zytostatikum und einem PTK-Inhibitor zu evaluieren, wurden die Ba/F3-FLT3-LM-Zellen mit einer fixen Kombination aus PKC412 und Cytosin-Arabinosid (AraC) bzw. SU5614 und AraC für 72h inkubiert. Im Gegensatz zur Kombination aus zwei PTK-Inhibitoren wurde für diese Versuche ein sich wechselseitig nicht-ausschließender Wirkmechanismus (*'mutually non-exclusive'*) postuliert, so dass der in Gleichung 1 angegebene Term  $(D)_1(D)_2/(D_x)_1(D_x)_2$  bestehen bleibt. Abbildung 21 zeigt die erhaltenen  $C_i$ -Werte aus drei unabhängigen Versuchen, wobei bei beiden Kombinationen ein leichter Synergismus im oberen Dosisbereich gefunden wurde ( $C_i$  für  $IC_{90} = 0.78$  bzw. 0.72). Dies ist kongruent mit einer Studie von Levis et al. (Levis, 2004), die für eine simultane Kombination von CEP-701 und AraC für Ba/F3-FLT3-LM-Zellen  $C_i$ -Werte von  $\sim 0.8$  fanden, wobei CEP-701 in sehr hohen Dosen von 10 und 20nM eingesetzt wurde.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der gefundene Synergismus bei hohen Dosen durch eine gegenseitige Verdrängung der Substanzen aus der Proteinbindung zustande kommt, da z.B. PKC412 und AraC zu 80-90% an humanes Serumprotein binden (Slevin,

## Ergebnisse

1983; Propper, 2001). Dieser Effekt wurde beispielsweise für CEP-701 und Daunorubicin für HL-60-Zellen berichtet (Levis, 2004).



	IC <sub>50</sub>	Ratio*	Ci ± SD bei		
			IC <sub>50</sub>	IC <sub>75</sub>	IC <sub>90</sub>
PKC412	6.82 nM	25:1	1.1 ± 0.23	0.90 ± 0.16	0.78 ± 0.23
SU5614	192 µM	500:1	1.3 ± 0.19	0.91 ± 0.11	0.70 ± 0.22

\* gibt das Verhältnis zu AraC [µg/ml] an

**Abbildung 21: Kombination aus den PTK-Inhibitoren PKC412 bzw. SU5614 und Cytosin-Arabinosid**

(A) zeigt die Median-Effect-Plots (links) und die konservativen Isobogramme (rechts) für einen repräsentativen Versuch mit PKC412 und SU5614. Die Median-Effect-Plots zeigen deutlich die unterschiedliche Steigung 'm' der Geraden der Einzelversuche mit jeweiligem PTK-Inhibitor und AraC, was einen sich wechselseitig nicht-ausschließenden Wirkmechanismus der kombinierten Substanzen andeutet. Die Regressionskoeffizienten lagen für alle Versuche  $\geq 0.97$ . (B) Ci-Werte aus drei unabhängigen Versuchen.

### **4.3 Charakterisierung des D324N-Polymorphismus im FLT3-Rezeptor**

#### **4.3.1 Der FLT3-D324N-Polymorphismus tritt gehäuft in Patienten mit myeloischen Leukämien auf**

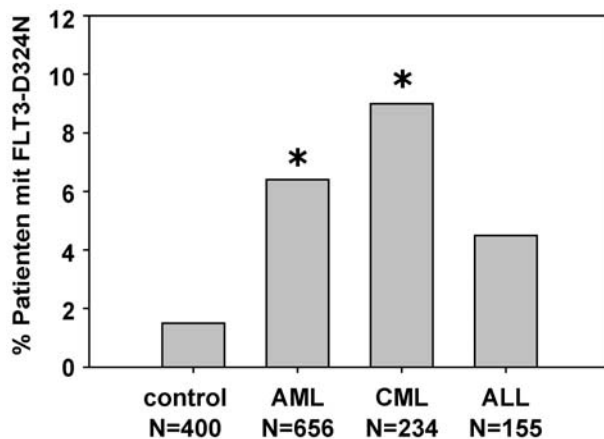
Die im Verlauf eines Hochdurchsatz-Screenings bei AML-Patienten gefundene Mutation FLT3-D324N (Ley, 2003) wurde an einer großen Patientenzahl näher untersucht und auch funktionell charakterisiert. Die Mutation wurde bei 42 von 656 De-novo-AML-Patienten (6.4%) durch eine auf LightCycler-Technik basierenden Analyse der Schmelzkurve (vergleiche: Bagrintseva, 2004) detektiert und sequenziert. Die Verteilung der betreffenden Patienten auf die einzelnen FAB-Untergruppen zeigte weder signifikante Unterschiede zur D324N-negativen Population, noch konnte eine erhöhte Leukozytenzahl festgestellt werden (Ergebnisse ohne Abbildung), wie sie für andere FLT3-Mutationen in der AML beschrieben ist (Munoz, 2003). Auch hinsichtlich ereignisfreiem und Gesamt-Überleben (EFS bzw. OS) konnten keine Unterschiede zur Kohorte ohne die betreffende Mutation festgestellt werden (Ergebnisse ohne Abbildung). Drei Proben von Patienten in kompletter zytogenetischer Remission (CCR) wiesen immer noch die D324N-Mutation auf, was zeigte, dass diese Variante in den Patienten unabhängig vom leukämischen Klon, also somatisch auftrat. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Fr. PD Dr. S. Schnittger, Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik und Poliklinik III des Klinikums Grosshadern, erhoben.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der D324N-Variante um einen *'single nucleotide polymorphism'* (SNP) handelt, wurden insgesamt 400 Kontrollproben gescreent (200 Patienten mit nicht-hämatologischen Erkrankungen aus dem Institut für Klinische Chemie, LMU München und 200 Proben aus der KORA-gen-Studie Augsburg, die mit den Patientenproben hinsichtlich Alter und Geschlecht 1:1 abgeglichen waren). Hier wurde die Mutation nur in sechs Fällen (1.5%) detektiert, was einen signifikanten Unterschied zur AML-Population ergab ( $p < 0.001$ ). Von einer Person aus den Gesundkontrollen konnten Proben der Eltern analysiert werden, wobei auch die Mutter ein FLT3-D324N-positives Allel aufwies.



## Ergebnisse

Um die Inzidenz der Mutation auch in anderen hämatologischen Erkrankungen zu überprüfen, wurden Proben von CML- und ALL-Patienten gescreent. Bei 21 von 234 CML- (9.0%), und 7 von 155 ALL-Patienten (4.5%) wurde die Mutation festgestellt, wobei nur die Inzidenz bei CML-Patienten signifikant erhöht war ( $p < 0.001$ ). Eine Übersicht über das Auftreten der FLT3-D324N-Variante in hämatologischen Erkrankungen zeigt Abbildung 22.



**Abbildung 22: Inzidenz der FLT3-D324N in Leukämien**

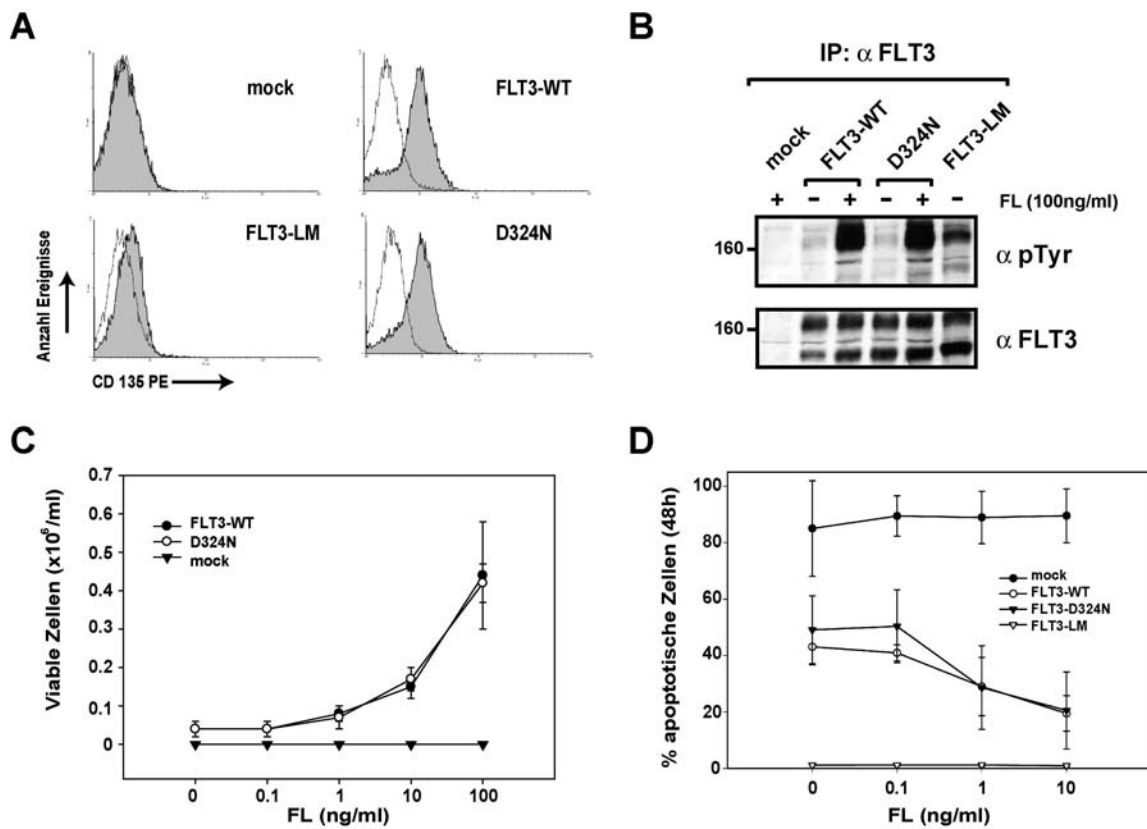
Darstellung der Inzidenz von FLT3-D324N bei Patienten mit AML, CML und ALL. "N" gibt die Zahl der untersuchten Proben an. (\*) zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle nach Fisher's Exakt-Test ( $p < 0.05$ ).

### 4.3.2 FLT3-D324N zeigt keine funktionellen Unterschiede zu Wildtyp-FLT3 im Zellkulturmodell

Neben Exon-8-Mutationen im *c-KIT*-Gen liegt auch die von Ley et al. zuerst beschriebene FLT3-D324N-Variante im extrazellulären Bereich (Abb. 6B) und wurde hinsichtlich ihres transformierenden Potentials im Zellkulturmodell untersucht. Anders als die Exon-8-Mutanten von KIT weist diese Mutation *in vitro* jedoch funktionell keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Protein auf (Abbildung 23). Die durchflusszytometrische Analyse des Konstrukts in Ba/F3-Zellen zeigt im Vergleich zu FLT3-WT ähnliche Expressions-Level, während FLT3-LM aufgrund des hohen Rezeptor-Turn-Overs wie KIT-D816V niedrigere Oberflächenexpression zeigt (Abb. 23A). Die D324N-Mutation führt nicht zur Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors, aber wie bei FLT3-WT tritt starke Tyrosinphosphorylierung nach Ligandenstimulation mit FL auf (Abb. 23B). Auch für diese extrazelluläre Mutation wurde versucht, eine Hyperaktivierung des Rezeptors nach Ligandenstimulation zu zeigen, die sich wie bei den KIT-Exon-8-Mutationen in einer erhöhten

## Ergebnisse

Proliferation und Apoptoseresistenz äußern könnte (Abb. 23C und D) Der physiologische Bereich der FL-Serumkonzentration liegt bei  $14 \pm 39$  pg/ml, während er bei Leukämie-Patienten unter Chemotherapie-Behandlung auf über 2000 pg/ml ansteigen kann (Wodnar-Filipowicz, 1996). In den Proliferationsversuchen wurde der Bereich von 0.1 bis 100ng/ml abgedeckt, aber keine signifikant erhöhte Proliferation im Vergleich zu FLT3-WT festgestellt. Auch Experimente zur Messung der Apoptoseresistenz zeigten keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 23: Funktionelle Charakterisierung von FLT3-D324N in Ba/F3-Zellen**

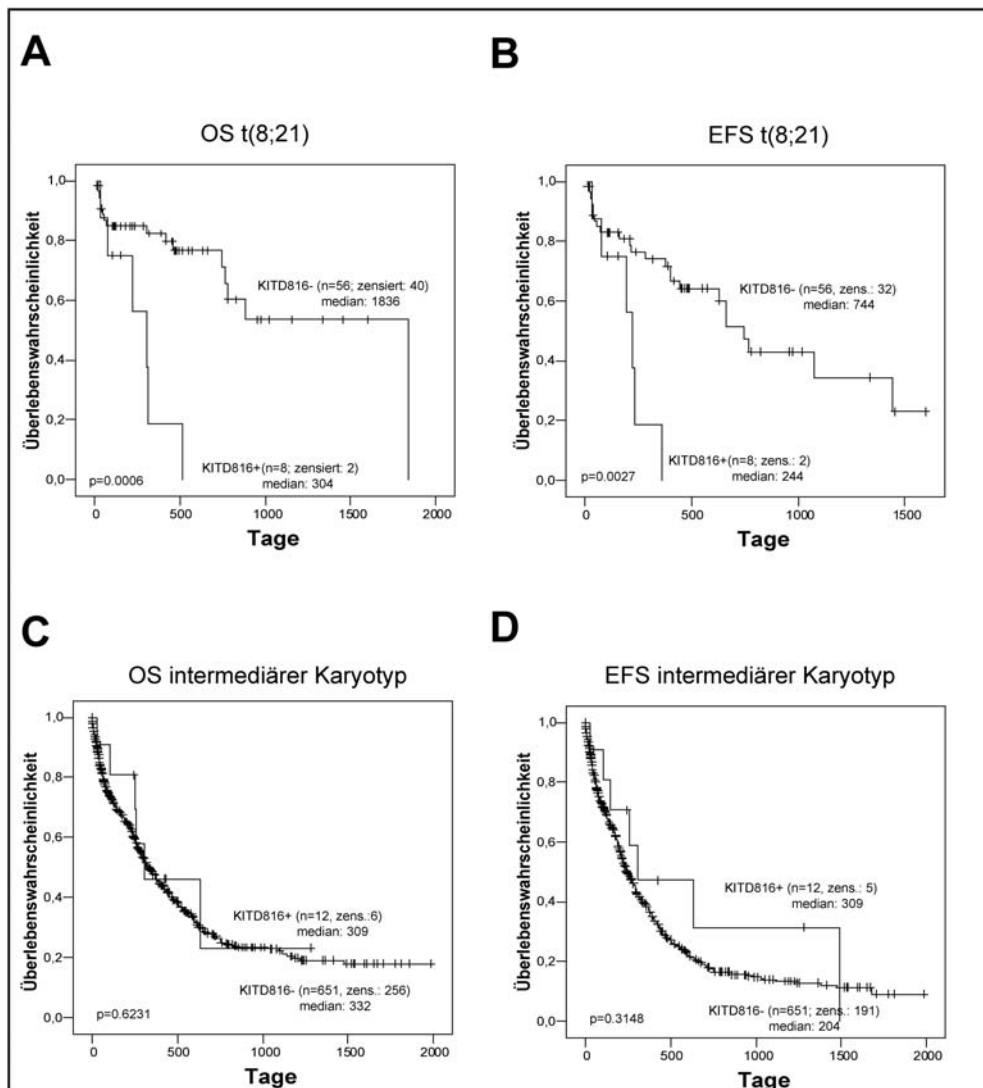
(A) Oberflächenexpression des FLT3-Rezeptors nach FACS-Analyse mit anti-CD135-Antikörper (B) Immunopräzipitation von FLT3 aus Ganzzelllysaten von gehungerten und FL-stimulierten Ba/F3-Zellen sowie Immunoblotting mit anti-phospho-Tyrosin- und nach Stripping des Blots mit anti-FLT3-Antikörper. (C) und (D) FL-Stimulation der Ba/F3-Zellen mit Bestimmung der Proliferation und Apoptoseresistenz.

## 4.4 Punkt-Mutationen von Codon D816 von *c-KIT* in der AML

### 4.4.1 D816-Mutationen treten vorwiegend bei Patienten mit t(8;21) auf und verschlechtern deutlich deren Prognose

Neben den hier beschriebenen Mutationen im extrazellulären Bereich gibt es weitere Mutationsklassen, die in der AML auftreten und den KIT-Rezeptor betreffen. Diese Mutationen wurden meist isoliert vor einem spezifischen genetischen Hintergrund oder an sehr kleinen Patientenzahlen studiert (Wang, 2005; Beghini, 1998; Beghini, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der in der Tyrosinkinasedomäne 2 von KIT auftretenden Mutation an D816 in der Gesamt-AML studiert. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit Fr. PD Dr. S. Schnittger, Labor für Leukämiediagnostik, Medizinische Klinik und Poliklinik III des Klinikums Grosshadern, erhoben. Von 1940 untersuchten AML-Proben (de novo = 1614, s-AML = 201 und t-AML = 125) wiesen 33 Patienten (1.7%) Mutationen an KIT-D816 auf. Diese Mutationen verteilten sich auf die FAB-Subtypen M1 (n=3), M2 (n=22), M4 (n=6) and M4eo (n=2). Zytogenetisch war die Inzidenz von D816-Mutationen nur für Patienten mit einer zusätzlichen t(8;21) signifikant erhöht (n = 8 von 76 Patienten mit t(8;21), dies entspricht 10.5%). Auch waren ein Verlust des Y-Chromosoms und eine Trisomie 4 unabhängig voneinander mit dem Auftreten von D816-Mutationen assoziiert. Zur Analyse der prognostischen Signifikanz von KIT-D816-Mutationen wurden 64 Patienten mit t(8;21) (Abb. 24 A und B) und 663 Patienten mit sog. intermediärem Risiko, d.h. Patienten mit normalem Karyotyp, mit Trisomie 8 bzw. 21 oder Verlust des Y-Chromosoms (Abb. 24 C und D), analysiert, wobei jeweils Patienten mit und ohne die KIT-Mutationen gegenübergestellt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass das Auftreten von KIT-D816-Mutationen bei Patienten mit t(8;21), die an sich eine günstige Prognose besitzen (Grimwade, 1998; Mrozek, 2001), deutlich Gesamt- und ereignisfreies Überleben (OS bzw. EFS) verschlechterte. Bei Patienten mit intermediärem Karyotyp trat jedoch keine signifikante Verschlechterung von OS und EFS auf.

# Ergebnisse



**Abbildung 24: OS bzw. EFS von Patienten mit D816-Mutationen in den Subgruppen mit t(8;21) und intermediärem Risiko**

(A) und (B) Gesamt- und ereignisfreies Überleben (OS bzw. EFS) nach Kaplan-Meier von Patienten mit bzw. ohne D816-Mutation in der Subgruppe mit t(8;21) (Kaplan und Meier, 1958). (C) und (D) für Patienten mit intermediärem Karyotyp. „Median“ steht für die mediane Überlebenszeit in Tagen

## 4.4.2 Der Imatinib-resistente KIT-D816V-Rezeptor spricht auf den PTK-Inhibitor PKC412 an

Aufgrund der - wie gezeigt - signifikanten Verschlechterung der Prognose von Patienten mit an sich günstigem Karyotyp durch das Vorhandensein von KIT-D816-Mutationen stellt KIT ein viel versprechendes Target in der Behandlung von Patienten mit t(8;21) dar.

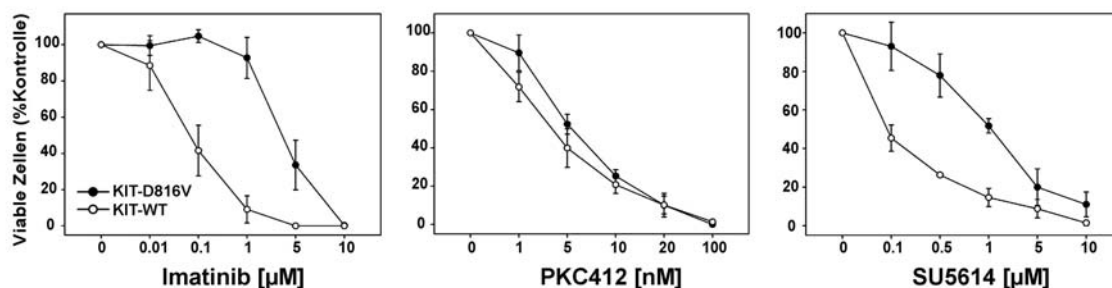
## Ergebnisse

Wie berichtet, ist neben dem signifikant erhöhten Auftreten von KIT-Mutationen auch eine Induktion der KIT-mRNA und damit Überexpression von KIT in Patienten mit t(8;21) zu beobachten (Wang, 2005). Während KIT-WT jedoch auf den bereits zugelassenen Inhibitor Imatinib anspricht, ist KIT-D816V dagegen resistent (Frost, 2002). Dies ist entweder auf den Bindungsmodus von Imatinib zurückzuführen – Imatinib bindet an den Rezeptor nur in der inaktiven Konformation mit geschlossener Aktivierungsschleife (Azam, 2003), welche für den mutierten Rezeptor im Gleichgewicht eine unwahrscheinliche Konformation darstellt (Torrent, 2004) – oder aber auf die 9fach höhere Affinität des Rezeptors zu ATP (Heinrich, 2002). Daher wurden neben Imatinib zwei strukturell nicht-verwandte Inhibitoren, die bekanntlich auch KIT-WT als Ziel besitzen (Fabbro, 2000; Spiekermann, 2002b), hinsichtlich der Hemmbarkeit von KIT-D816V getestet: PKC412 und SU5614 (für Strukturformeln siehe Abbildung 2).

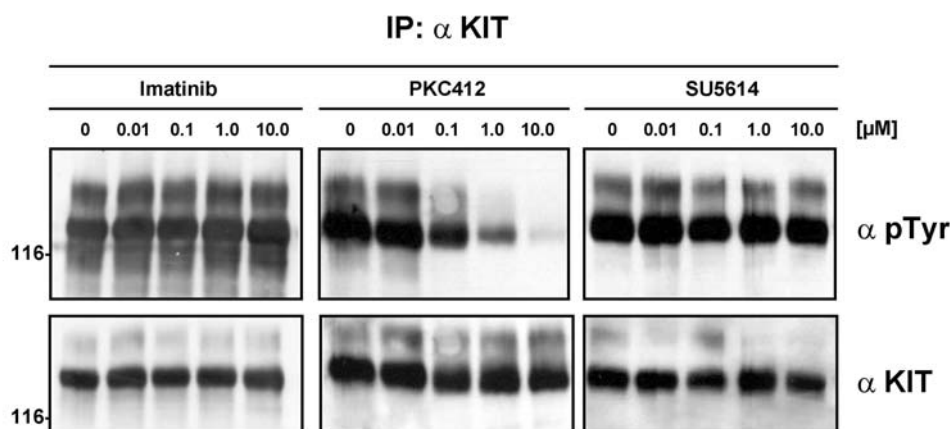
Wie in Abbildung 25A gezeigt, war das IL-3-unabhängige Wachstum von Ba/F3-KIT-D816V-Zellen resistent gegenüber Imatinib ( $IC_{50} = 3\mu M$ ) und SU5614 ( $IC_{50} = 1\mu M$ ) im Vergleich zu KIT-WT ( $IC_{50} = 0.05\mu M$  bzw.  $0.1\mu M$ ). PKC412 hingegen inhibierte sowohl KIT-WT als auch KIT-D816V mit gleicher Effizienz im submikromolaren Bereich ( $IC_{50} = 3$  bzw.  $5$  nM). Dieser Effekt konnte biochemisch auf Rezeptorebene durch Immunopräzipitation in 293T-Zellen bestätigt werden (Abb. 25B), wobei die  $IC_{50}$  der Rezeptor-dephosphorylierung durch PKC412 aus drei unabhängigen Versuchen bei 240nM lag. Ein ähnlicher Wert wurde bereits für die Hemmung der Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors durch PKC412 (528nM) berichtet (Wadleigh, 2005). Mit Konzentrationen bis  $10\mu M$  von Imatinib und SU5614 wurde keine nennenswerte Rezeptor-dephosphorylierung erreicht.

## Ergebnisse

### A



### B



**Abbildung 25: Effekt von spezifischen PTK-Inhibitoren auf Wildtyp- und mutierten KIT-Rezeptor**

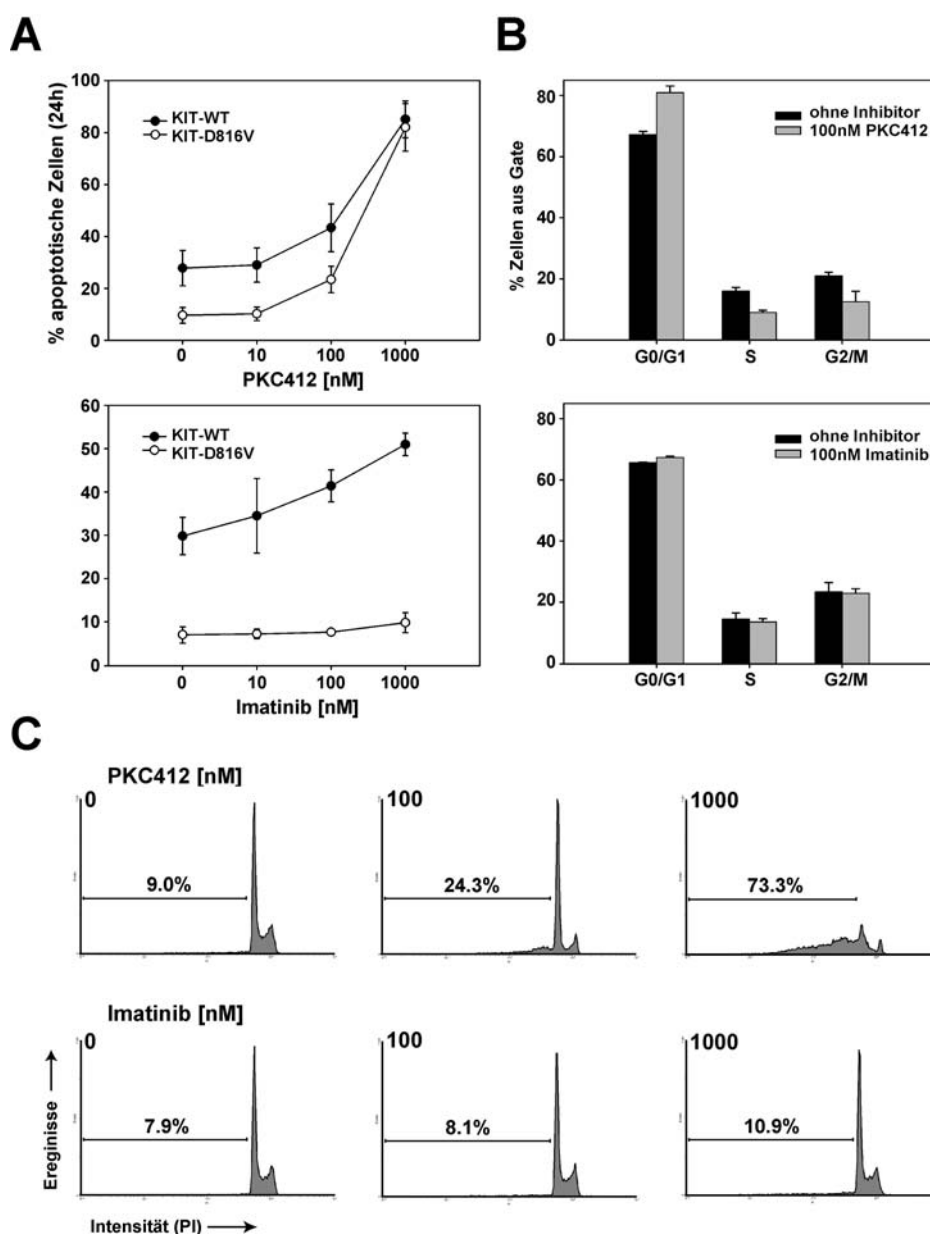
(A) Inhibitorische Aktivität der PTK-Inhibitoren auf das IL-3 unabhängige Wachstum von Ba/F3-Zellen mit KIT-D816V und auf SCF-stimulierte (100ng/ml) Zellen mit KIT-WT. (B) Rezeptordephosphorylierung durch zweistündige Inhibitorbehandlung von gehungerten 293T-Zellen gezeigt durch Immunopräzipitation mit anschließendem Immunoblotting.

### 4.4.3 PKC412 führt zu $G_0/G_1$ -Arrest in KIT-D816V-exprimierenden Ba/F3-Zellen

Um den Mechanismus der spezifischen Zytotoxizität von PKC412 auf KIT-D816V-exprimierende Ba/F3-Zellen weiter zu untersuchen, wurden Zellzyklus-Analysen unter Verwendung von Propidiumiodid (PI) durchgeführt (Abb. 26). Dabei erfuhren sowohl Zellen mit KIT-WT als auch KIT-D816V-Zellen einen dosisabhängigen Anstieg der Zellen im Sub- $G_1$ -Bereich nach 24h, welcher einen Marker für apoptotische Nuclei darstellt (Abb. 26A). Imatinib hingegen führte nur in KIT-WT-Zellen zu einem deutlichen Anstieg. In beiden Zelllinien bewirkte PKC412 einen ausgeprägten  $G_0/G_1$ -Arrest (für D816V in

## Ergebnisse

Abb. 26B und C gezeigt). Dies konnte für KIT-WT nach Imatinib-Behandlung allerdings nicht gezeigt werden, was mit den Ergebnissen von Wang et al. übereinstimmte, die in kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen (SCLC), welche den KIT-Rezeptor exprimieren, keine signifikanten Veränderungen in G1- oder S-Phase nach Imatinib-Zugabe fanden (Wang, 2000).



**Abbildung 26: Zellzyklusanalysen durch PI-Färbung**

(A) Apoptotische Nuclei im Sub-G1-Bereich wurden durch Durchflusszytometrie in transduzierten Ba/F3-Zellen detektiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Analyse des Zellzyklus für Inhibitor-behandelte D816V-Zellen. (C) Repräsentative Histogramme für behandelte D816V-Zellen.

## Ergebnisse

Zusammenfassend verschlechterten Exon-17-Mutationen an Position D816 im *KIT*-Gen, welche insbesondere bei Patienten mit einer Translokation 8;21 detektiert wurden, die Gesamt- und ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Subgruppe. Dagegen konnte zwischen Patienten mit und ohne *KIT*-D816-Mutationen, die einen intermediären Karyotyp hinsichtlich Prognose aufwiesen, kein Unterschied bezüglich der Überlebensrate festgestellt werden. Um dieses vielversprechende Target auszunutzen, wurden verschiedene selektive PTK-Inhibitoren *in vitro* getestet. Dabei führte nur PKC412, nicht aber Imatinib mesilat oder SU5614 zu Proliferationshemmung, Rezeptordepshosphorylierung und Zellzyklus-Arrest in transduzierten Zelllinien.



## **5 Diskussion**

### **5.1 KIT-Exon-8-Mutationen zeigen *in vitro* transformierendes Potential**

#### **5.1.1 Exon-8-Mutationen zeigen transformierendes Potential, vergleichbar mit dem extrazellulärer Mutationen in anderen RTK**

Mutationen im extrazellulären Bereich sind bereits für eine Reihe von unterschiedlichen RTK beschrieben worden, u.a. für KIT, EGFR, RET und TRKA (Hirota, 1998; Lux, 2000; Lorimer und Lavictoire, 2001; Mulligan, 1993; Reuther, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationen in Exon 8 des *c-KIT*-Protoonkogens untersucht, die in Patienten mit AML M4eo und *inv(16)* auftreten. Wir konnten SCF-induzierte Hyperaktivierung von repräsentativen Exon-8-Mutanten zeigen, welche zu erhöhter Viabilität und Apoptoseresistenz von transduzierten Ba/F3-Zellen führte und sich überdies in einer verstärkten Phosphorylierung des MAPK-Signalweges äußerte. Dieses Ergebnis ist insofern von besonderem Interesse, da kürzlich von einem Crosstalk zwischen MAPK-Signalweg und der Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie C/EBP $\alpha$  berichtet wurde (Ross, 2004). Demnach kann aktiviertes ERK1/2 (MAPK) durch Phosphorylierung von C/EBP $\alpha$  an S21 eine Konformationsänderung hervorrufen und so möglicherweise die Differenzierung von myeloiden Blasten zu Granulozyten inhibieren. Danach könnten aktivierende Mutationen im KIT-Rezeptor neben der Proliferation auch zum Differenzierungsblock von AML-Blasten beitragen.

Die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Crosslinking-Experimente zur Bestimmung des Dimerisierungsgrades von mutiertem und WT-Rezeptor zeigen deutlich, dass in 293T-Zellen, die mit der Mutante Exon8-3 transfiziert worden waren, eine spontane, ligandunabhängige Dimerisierung des Rezeptors auftrat, die durch die Zugabe von SCF noch verstärkt werden konnte (Abb. 11). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die entstandenen Dimerisierungsprodukte an Tyrosinresten konstitutiv phosphoryliert und die gefunde-

## D i s k u s s i o n

nen Unterschiede signifikant waren. Clarke und Dirks charakterisierten eine in humanen Glioblastomen gefundene Deletion von Exon 8 und 9 des PDGF-Rezeptors (Clarke und Dirks, 2003), der hohe Strukturverwandtschaft zu KIT aufweist. Diese große Deletion führt zum Verlust von jeweils einer Hälfte der 4. und 5. Ig-ähnlichen Domäne des Rezeptors und bewirkt Transformation, Autophosphorylierung und erhöhten Rezeptor-Turn-Over. Durch diese Ergebnisse wird die Bedeutung dieser extrazellulären Region zwischen den Ig-ähnlichen Domänen 4 und 5 in Klasse-III-Rezeptortyrosinkinasen unterstrichen. Dies ist der Bereich, in welchem auch die hier charakterisierten Exon-8-Mutationen zu Aminosäureaustauschen führen.

Besonders augenfällig in diesem Zusammenhang sind aber die Arbeiten von Carlberg und Rohrschneider sowie Roussel et al., die sich mit transformierenden Mutationen im CSF1-Rezeptor, welcher ebenfalls hohe Homologie zu KIT aufweist, befassten (Carlberg und Rohrschneider, 1994; Roussel, 1988; Roussel, 1990). Carlberg und Rohrschneider untersuchten *in vitro* in einem murinen System die Auswirkungen von Punktmutationen der Codons 301 und 374, die in KIT I313 bzw. G387 entsprechen und vor bzw. in der Ig-ähnlichen Domäne 4 von KIT liegen. In FDCP-1-Zellen führte eine CSF1R-Mutante, die beide Mutationen enthielt, zu sehr schwachem zytokin-unabhängigem Wachstum. Bei Zusatz von M-CSF ergab sich eine Hyperstimulation im Vergleich zu CSF1R-WT und in Rezeptordimerisierungsversuchen zeigte sich eine sehr schwache faktor-unabhängige Autodimerisierung und -phosphorylierung. Erst die Kombination aus beiden Mutationen zusammen mit einer Deletion des C-Terminus des Proteins führte zu ausgeprägter Transformation mit Autophosphorylierung, faktorunabhängigem Wachstum und konstitutiver Internalisierung (Carlberg und Rohrschneider, 1994).

Diese Befunde aus der Literatur sowie die Tatsache, dass keine homologen Aminosäuren zu KIT-D419 und Y418 etwa im FLT3-Rezeptor existieren (vgl. Abb. 5A und Rosnet, 1993) und die homologe Entsprechung zu KIT-T417 beispielsweise im CSF-Rezeptor (V406) ähnlich hydrophob wie die Aminosäure Isoleucin ist, deutet an, dass eine einzelne Punktmutation (oder eine einzelne Deletion) vielleicht nicht ausreichend ist, um dem KIT-Rezeptor transformierendes Potential zu verleihen. Erst eine Kombination von mehreren aminosäureverändernden Basenaustauschen, wie sie in den meisten Exon-8-Mutationen aus Patientenproben vorhanden ist und in KIT-Exon8-3 nachgebildet wurde, verleiht den damit transduzierten Zellen einen deutlichen Phänotyp. In Kombination mit den von ande-

ren Autoren beschriebenen klinischen Fakten, wie etwa einer erhöhten Rückfallquote und einer (begrenzten) Zytostatikaresistenz beispielsweise gegenüber 6-Thioguanin (Goemans, 2003), weisen die hier präsentierten Ergebnisse auf eine aktive Rolle von KIT-Exon-8-Mutationen in der Pathogenese der CBF-AML hin.

### **5.1.2 KIT-Exon-8-Mutanten und KIT-WT unterscheiden sich nicht in der Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden**

Seit der Entdeckung des Rezeptor-Ligandenpaares KIT und SCF wurde eine sehr große Anzahl an Studien durchgeführt, die sich mit dem Mechanismus der Aktivierung dieses Rezeptors nach Ligandenbindung und der daraus folgenden Aktivierung nachgeordneter Signalwege beschäftigt haben. Dabei wurden abhängig von verschiedenen Parametern wie des verwendeten zellulären Kontextes, der Art der durchgeführten Experimente oder auch der Verwendung chimärer Konstrukte z.T. gegenläufige Resultate erzielt (Ronnstrand, 2004; Sattler und Salgia, 2004).

Wie von Chian et al. in murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen gezeigt, ist die p85-Untereinheit der PI3-Kinase nur nach SCF-Stimulation mit KIT-WT, aber konstitutiv mit KIT-D816V an Y721 assoziiert (Chian, 2001). Weitere Studien in unterschiedlichen Zellsystemen konnten weiterhin SCF-abhängige AKT-Phosphorylierung durch KIT-WT und konstitutive durch KIT-D816V demonstrieren, was durch die hier vorgelegte Arbeit bestätigt werden konnte (Frost, 2002; Duensing, 2004; Casteran, 2003). Eine Vielzahl von Arbeiten konnte den Beweis für die Aktivierung von MAPK p42/44 (ERK 1/2) durch KIT-WT erbringen (Ning, 2001; Frost, 2002; Casteran, 2003), während jedoch die Aktivierung dieses Signalmoleküls durch KIT-D816V z.T. nur nach Stimulation mit SCF gezeigt werden konnte (Ning, 2001). Diesbezüglich entsprechen die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Resultate im wesentlichen den Ergebnissen von Duensing et al. (Duensing, 2004), die anhand von primären GIST-Zellen die durch KIT hervorgerufenen Signalwege studierten. Exon-17-Mutanten riefen eine deutliche konstitutive Phosphorylierung von MAPK p42/44, eine schwächere Phosphorylierung von AKT, aber keine Aktivierung von STAT5 hervor. Ähnliche Resultate ergaben sich bei unserem Studium dieser Mutante in Ba/F3-Zellen, wo sie als transformierende Positivkontrolle dienen sollte. Ning et al. konnten den Beweis für die essentielle Rolle der STAT3-Aktivierung in MO7e-Zellen mit KIT-D816-

## D i s k u s s i o n

Mutationen erbringen (Ning, 2001). Auch in unseren Versuchen konnte eine schwache Phosphorylierung von STAT3 an Y705 in KIT-D816V-Zellen detektiert werden (Abb. 13C).

Zum Studium der nachgeordneten Signalwege von KIT-WT und mutiertem KIT-Rezeptor wurden neben Immuno-Blotting mit phosphospezifischen Antikörpern auch zwei selektive Inhibitoren, PD98059 und LY249002, verwendet, die an kritischen Stellen des MAPK- und PI3-Kinase-Signalweges eingreifen (Abb. 14). Mittels Stimulation des murinen IL-3-Rezeptors waren die Zellen jedoch in der Lage, weiter zu proliferieren (Abb. 15-17). Die Tatsache, dass das Ausschalten nur eines dieser Signalwege ausreicht, um die Zellen an der Proliferation zu hindern und ab einer bestimmten Dosis auch Apoptose zu induzieren, zeigt, dass im verwendeten zellulären Kontext alternative Signalwege wie der JAK-STAT-Pathway nicht ausreichend aktiviert sind, um die Zellen weiter zu stimulieren. Weiler et al. konnten zwar zeigen, dass JAK2 konstitutiv mit KIT assoziiert ist (Weiler, 1996), die Datenlage bezüglich STAT-Aktivierung durch KIT wird jedoch umstritten bewertet (Ronnstrand, 2004; Sattler und Salgia, 2004). Desweiteren stellt sich die Frage nach dem Grad der Redundanz von MAPK- und PI3-Kinase-Signalweg im verwendeten In-vitro-System, da die mit einem einzigen Inhibitor behandelten Zellen nicht durch Aktivierung des jeweilig anderen Signalweges weiter proliferieren konnten. Vor kurzem erst konnte von Wandzioch et al. gezeigt werden, dass in SCF-abhängigen murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen LY249002 nicht nur die Phosphorylierung von AKT, sondern auch von ERK hemmt (Wandzioch, 2004). Dieser Effekt war auf undifferenzierte Zellen beschränkt und konnte nicht in Mastzellen demonstriert werden. In den Vorläufer-Zellen kam es durch die jeweilige Anwendung eines der beiden Inhibitoren zu einer Proliferationshemmung bzw. zur Auslösung der Apoptose. Ein ähnlicher Mechanismus ist ebenfalls in den verwendeten Ba/F3-Zelllinien denkbar, die auf die Anwendung von LY249002 in gleicher Weise mit Apoptose, auf PD98059 zwar nicht signifikant, jedoch tendenziell unterschiedlich reagierten (Tabelle 2).

## 5.2 Die Kombination von PTK-Inhibitoren mit anderen Wirkstoffklassen könnte das klinische Ergebnis verbessern

Das schnelle Auftreten von sekundären Resistenzen bei der Monotherapie mit PTK-Inhibitoren stellt ein großes Problem dar, was die Suche nach geeigneten Kombinationspartnern für diese Wirkstoffklasse erfordert. Beispielsweise die von Cools et al. beschriebene G697R-Mutation, welche durch *random*-Mutagenese mit anschließendem Screening in Ba/F3-Zellen identifiziert wurde und dem FLT3-Rezeptor Resistenz gegen vier getestete spezifische Inhibitoren verleiht (Cools, 2004), könnte modellhaft für die Etablierung von neuen Therapieschemata von kleinmolekularen PTK-Inhibitoren unter Einbeziehung von weiteren Wirkstoffklassen dienen. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von SU5614-resistenten Ba/F3-FLT3-LM-Zellen durch Einsatz eines strukturell unverwandten Inhibitors, nämlich PKC412, hemmbar ist (Bagrintseva, 2004), allerdings zeigte die Kombination aus beiden Inhibitoren bei simultaner Zugabe zu den Zellen keine synergistischen Effekte. In allen untersuchten Dosisbereichen ( $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$ ,  $IC_{90}$ ) verhielt sich die verursachte Wachstumshemmung rein additiv. Ob der Einsatz zweier verschiedener PTK-Inhibitoren in der Therapie von AML-Patienten sinnvoll ist, um die Entstehung von Sekundärresistenzen zu verzögern oder ganz zu unterbinden, muss durch weitere In-vitro-Studien abgeklärt werden.

Wie auch von Levis et al. beschrieben (Levis, 2004), zeigte die Kombination eines PTK-Inhibitors – in der vorgelegten Arbeit wurde PKC412 verwendet – und Cytosin-Arabinosid, welches zu den Standard-Arzneistoffen in der Therapie der AML zählt (Buchner, 2002; Braess, 2000; Hiddemann, 1991), insbesondere im Hochdosisbereich synergistische Effekte nach Simultanbehandlung der Zellen mit beiden Wirkstoffen. Dabei ist eine Grundvoraussetzung für eine überadditive Wirkung gegeben, nämlich der Angriff der Wirkstoffe an unterschiedlichen Rezeptor- bzw. Effektorsystemen. Während der PTK-Inhibitor PKC412 spezifisch Rezeptortyrosinkinasen inhibiert und - wie anhand des an D816 mutierten KIT-Rezeptors gezeigt – die Rezeptorautophosphorylierung hemmt, besteht der Wirkmechanismus von AraC in der verringerten Rate von DNA-Replikation, DNA-Strang-Brüchen und Chromatin-Fragmentierung nach Inkorporation des aktiven

## Diskussion

Nukleosidtriphosphats in neusynthetisierte DNA-Stränge (Major, 1981; Woodcock, 1987). Die Kombination eines PTK-Inhibitors mit hochwirksamer Zytostatika-Therapie könnte ein vielversprechendes Vorgehen in der Therapie der AML darstellen, wobei kleinmolekulare Inhibitoren in der Behandlung von Patienten zwar biologische Aktivität zeigen, aber nur wenige Patienten komplette und dauerhafte Remission nach Einzelgabe erreichen (Wadleigh, 2005).

### 5.3 Der FLT3-D324N-Polymorphismus könnte zu einer Prädisposition für myeloische Leukämien führen

Die zuerst von Ley et al. in Proben von AML-Patienten beschriebene Punktmutation D324N des FLT3-Rezeptors (Ley, 2003) wurde im Rahmen unserer Studie an einem großen Patientenkollektiv, das AML-, CML- und ALL-Patienten umfasste, und anhand der beschriebenen In-vitro-Experimente untersucht. Die erhobenen Daten – sowohl klinisch als auch funktionell - weisen darauf hin, dass es sich bei FLT3-D324N um einen SNP handelt. Die FLT3-D324N-Mutante unterscheidet sich funktionell, ätiologisch und prognostisch deutlich von den ebenfalls hier untersuchten KIT-Exon-8- und -D816-Mutationen (Tabelle 3):

	<i>FLT3-D324N</i>	<i>KIT-Exon-8</i>	<i>KIT-D816</i>
Inzidenz in Kontrollproben	1.5%	0	0
Assoziation mit spezifischer genet. Subgruppe	nein	CBF-Leukämien	t(8;21)
Keimbahn-Mutation/ Polymorphismus	ja	nein	nein
Prognostische Bedeutung	nein	Rezidivrate ↑	OS ↓, EFS ↓*
Funktioneller Unterschied zu WT-Rezeptor	nein	Hyperaktivierung nach Ligandenstimulation	Transformation

\* für Patienten mit t(8;21)

**Tabelle 3: Klinische und funktionelle Unterschiede der untersuchten Mutationen in KIT und FLT3**

## D i s k u s s i o n

FLT-D324 liegt in der Ig-ähnlichen Domäne 3, die in ihrer Konformation durch eine Cystin-Brücke fixiert ist (Abbildung 4), so dass ein einzelner Aminosäureaustausch in diesem Bereich die Konformation vielleicht nicht stark genug verändern kann, um *in vitro* einen nachweisbaren Phänotyp hervorzurufen (Carlberg und Rohrschneider, 1994). Polymorphismen, die zwar keine sichtbaren phänotypischen Konsequenzen besitzen, aber mit der Entstehung von Malignomen assoziiert sind, wurden bereits für eine Vielzahl von Genen und Protoonkogenen beschrieben. Beispielsweise für das *RET*-Gen, das an der Pathogenese von medullären Schilddrüsen-Karzinomen (*'medullary thyroid carcinoma'*, MTC) beteiligt ist (Donis-Keller, 1993; Mulligan, 1993), wurden eine Reihe von Polymorphismen beschrieben, die sowohl in MTC-Patienten als auch in der Gesamtbevölkerung zu finden sind. So wurde für die klinisch und pathophysiologisch unauffällige *RET-G691S*-Variante in Exon 11 eine signifikant erhöhte Inzidenz in MTC-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen gefunden (Elisei, 2004). Polymorphismen, die zu einer Prädisposition für eine AML führen, wurden bisher nur für Gene beschrieben, die nicht für RTK kodieren, wie beispielsweise im *FAS* Promoter oder in der Methylentetrahydrofolat-Reduktase (Sibley, 2003; Aplenc, 2005). Im verwendeten Zellkulturmodell wurden keinerlei Unterschiede der *FLT3-D324N*-Variante zu *FLT3-WT* gefunden, so dass es sich hierbei vermutlich um einen SNP handelt, der jedoch eine Prädisposition für myeloische Leukämien bedingen könnte. Diese Prädisposition könnte z.B. sehr leichte Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit des *FLT3*-Rezeptors besitzen, die durch Ligandenbindungsstudien zu identifizieren wären. Außerdem wäre eine Assoziation des SNP mit anderen Polymorphismen möglich, die sich eventuell im *FLT3*-Promoter befinden und eine Überexpression von *FLT3* hervorrufen könnten, da nach dem Prinzip des *'linkage disequilibrium'* SNPs häufig zusammen vorkommen („SNPs travel together“) (Suh und Vijg, 2005).

Eine weitere Möglichkeit bestünde in der unterschiedlichen Expression von Zielgenen oder der Interaktion mit nachgeschalteten Signalmolekülen. Weitere Studien sind geplant, um die Rolle dieses doch sehr häufigen SNPs in der Pathogenese von myeloischen Leukämien weiter aufzuklären.

## 5.4 Patienten mit KIT-Mutationen in Exon 8 und 17 könnten von neuen therapeutischen Optionen profitieren

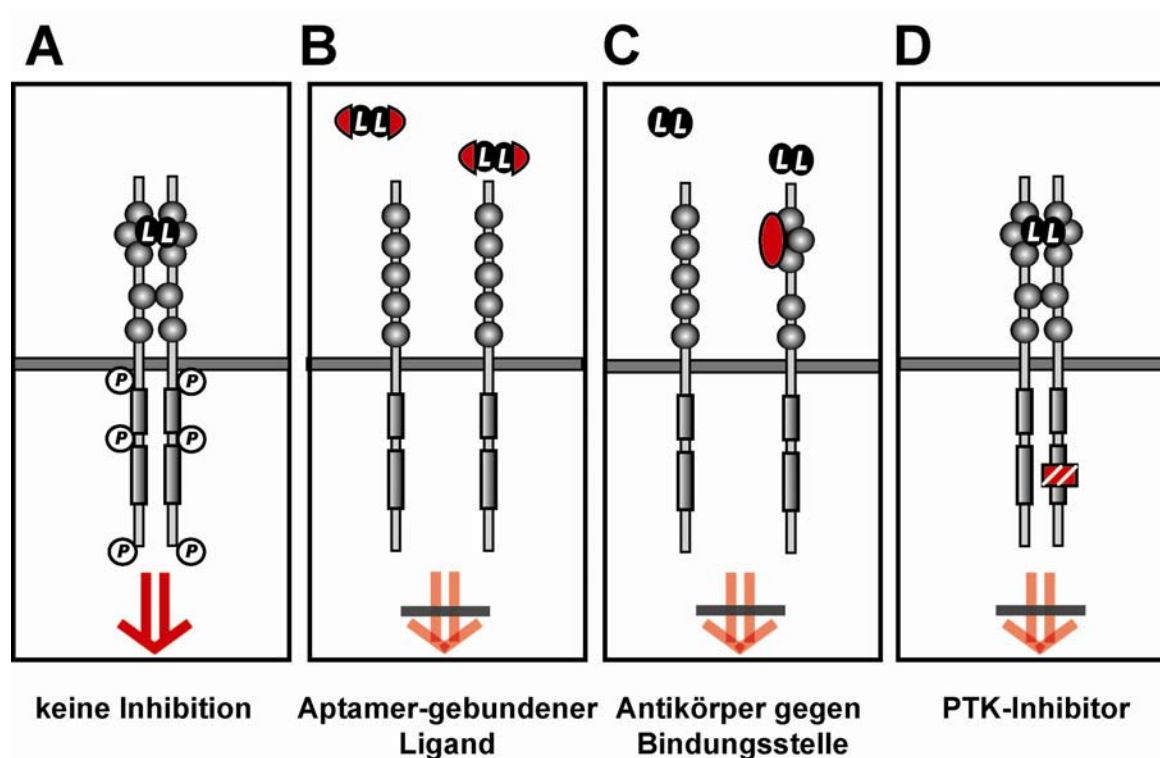
Im Gegensatz zum nicht-transformierenden FLT3-D324-Rezeptor waren die untersuchten KIT-Mutationen in Exon 8 und Exon 17 im Zellkulturmodell transformierend und sprachen auf kleinmolekulare Inhibitoren wie Imatinib oder PKC412 an. Neben der offenkundigen Möglichkeit, Patienten mit KIT-Exon-8-Mutationen mit Imatinib zu behandeln, was in Einzelfällen auch schon durchgeführt wurde (Matsuno, 2004), sollte jedoch auch nach weiteren Optionen für die Therapie gesucht werden, die aufgrund der hohen Proliferations-Aktivität von leukämischen Blasten mit Begünstigung und Selektion von Inhibitor-resistenten Subklonen angezeigt sind (Bagrintseva, 2004). Überdies bietet der hier identifizierte Mechanismus der Transformation, der von KIT-Exon-8-Mutationen ausgelöst wird, besondere Ansatzpunkte für eine gezielte Therapie, welche z.B. für Mutationen in der Aktivierungsschleife nicht in Frage kommen. Wie durch die gezeigten Crosslinking- und Zellkultur-Versuche demonstriert werden konnte, ist die Transformation von Exon-8-Mutanten wohl aufgrund ihrer Lage im extrazellulären Bereich in hohem Maße abhängig vom exogen zugeführten Liganden und der dadurch ausgelösten Dimerisierung. Dies benötigt beispielsweise der KIT-Rezeptor mit D816V-Mutation zur vollen Aktivierung nicht: dessen Autophosphorylierung, die wie gezeigt *cis*, also durch die phosphorylierte Rezeptor-Einheit selbst erfolgt, kann ausschließlich durch kompetitive ATP-Antagonisten oder durch Blockade nachgeordneter Signalwege gehemmt werden. Von den diesbezüglich getesteten PTK-Inhibitoren waren jedoch zwei – Imatinib und SU5614 – nicht effektiv gegen den Rezeptor (gezeigt auf Rezeptorebene und durch Proliferationsversuche). Allein PKC412 konnte Rezeptordephosphorylierung, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Arrest und Zelltod in therapeutischen Konzentrationen hervorrufen, was auf einen künftigen Stellenwert dieser Substanz in der Therapie der AML hinweisen könnte.

Für die Blockade der durch Exon-8-Mutationen ausgelösten Transformation scheint es allerdings möglich, Prozesse in der Rezeptoraktivierung zu erfassen, die vor der eigentlichen Phosphorylierung erfolgen, wie Bindung des Liganden und anschließende Dimerisierung. Für den PDGF-Rezeptor, der nach Fusion mit dem Transkriptionsfaktor TEL konstitutiv aktiviert ist und in der Pathogenese der chronisch myelomonozytären Leukämie



## Diskussion

(CMML) eine Rolle spielt (Carroll, 1996), wurden eine Reihe von Therapieoptionen hinsichtlich der Angriffspunkte Ligandenbindung und Dimerisierung erarbeitet (Übersicht bei Lee und McCubrey, 2002). Eine Übersicht zeigt Abbildung 27.



**Abbildung 27: Mögliche Angriffspunkte bei KIT-Exon-8-Mutationen**

(modifiziert nach Lee und McCubrey, 2002)

Sowohl gegen humanen als auch murinen KIT-Rezeptor existieren monoklonale Antikörper, die SCF kompetitiv von seiner Bindungsstelle verdrängen und die Proliferation der humanen SCF-abhängigen Megakaryozyten-Zelllinie MO7e sowie von murinen Melanozyten-Vorläuferzellen inhibieren (Blechman, 1993; Kimura, 2005). Desweiteren wurde gezeigt, dass sogenannte Aptamere, kleine nucleaseresistente Oligonukleotid-Liganden, die durch komplexe Selektionsprozesse wie z.B. SELEX isoliert werden, spezifisch an Proteine binden können und in der Lage sind, Rezeptortyrosinkinase zu inhibieren (Vassbotn, 1990; Cerchia, 2002; Cerchia, 2005). Denkbar wäre auch der Einsatz von Toxin-konjugiertem Liganden, wie für den GM-CSF-Rezeptor beschrieben (Lee und McCubrey, 2002). Diese Konzepte wurden bislang noch nicht therapeutisch erprobt, könnten aber in der Lage sein, beispielsweise die Therapie mit PTK-Inhibitoren wirkungsvoll zu unterstützen, da insbesondere die Monotherapie aufgrund von Sekundärresistenzen

## D i s k u s s i o n

schnell unwirksam wird. Aptamere, die erst kürzlich auf die extrazellulär gelegene RET-C634Y-Punktmutation angewandt wurden und welche die Dimerisierung von zwei mutierten Rezeptoren inhibieren können (Cerchia, 2005), oder monoklonale Antikörper gegen die Ligandenbindungsstelle könnten in Zukunft auch für die Inhibition von KIT-Rezeptoren mit extrazellulären Mutationen in Frage kommen.

## 6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die in der extrazellulären Region von *c-KIT* und *FLT3* auftretenden Mutationen *in vitro* charakterisiert und eine Einschätzung ihres funktionellen Stellenwertes vorgenommen. Dennoch bleibt nach wie vor eine ganze Reihe von Aspekten ungeklärt:

- Welcher Stellenwert kommt den Mutationen *in vivo* zu?
- Gibt es insbesondere im Falle des FLT3-D324N-SNP weitere SNPs, z.B. im FLT3-Promoter, die die beobachtete erhöhte Frequenz des SNP in myeloischen Leukämien erklären könnten?
- Worin liegt die Ursache für die hohe Spezifität, mit der Exon-8-Mutationen nahezu ausschließlich in AML M4eo, Mutationen in Exon 17 in der AML aber vorwiegend zusammen mit Translokation 8;21 auftreten?
- Nach welchem Mechanismus kommen diese somatischen Mutationen auf genomischer Ebene zustande und wie erfolgt die Selektion in AML-Blasten?

Um diese Fragen zu beantworten, sind mit Sicherheit weiterführende Studien notwendig, die zur näheren Aufklärung der Pathogenese der AML beitragen könnten.

## 7 Zusammenfassung

Aktivierende Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese solider und hämatologischer Neoplasien, wie der akuten myeloischen Leukämie (AML). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bislang nicht-charakterisierte Mutationen der Protoonkogene *c-KIT* und *FLT3*, die in der AML auftreten, in Zellkulturmodellen auf ihr transformierendes Potential hin untersucht. In-frame-Mutationen in Exon 8 des *c-KIT*-Gens, die aus kleinen Deletionen mit oder ohne Insertionen im extrazellulären Bereich bestehen, treten nahezu ausschließlich in Core-binding-Faktor-Leukämien auf und verschlechtern die Prognose der betroffenen Patienten. Drei repräsentative Exon-8-Mutationen wurden stabil in IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen exprimiert. Sie führten zur Hyperaktivierung des Rezeptors nach Ligandenstimulation, was sich in verstärkter Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose äußerte. In Rezeptor-Crosslinking-Experimenten zeigte eine repräsentative Exon-8-Mutante spontane und erhöhte ligandeninduzierte Dimerisierung. Die biologischen Effekte konnten anhand einer erhöhten Phosphorylierung des nachgeordneten Signalmoleküls Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu hatte der FLT3-D324N-Single-Nukleotid-Polymorphismus, der in 6.4% von De-novo-AML-, 9.0% von CML und 4.5% von ALL-Patientenproben detektiert wurde, keinerlei Auswirkungen auf die Prognose von AML-Patienten und wurde auch bei Kontrollpersonen gefunden (1.5%). Er wies keine funktionellen Unterschiede zu Wildtyp-FLT3 hinsichtlich Rezeptorphosphorylierung, Proliferation oder Apoptoseresistenz auf.

Im Gegensatz zu Exon-8-Mutationen besitzen KIT-Mutationen in der Aktivierungsschleife, die – wie hier gezeigt wurde – die Prognose von Patienten mit günstigem Karyotyp verschlechtern, Resistenz gegenüber dem PTK-Inhibitor Imatinib. Zwei dem Imatinib nicht-verwandte Inhibitoren – PKC412 und SU5614 – wurden auf die Ansprechbarkeit von KIT-D816V getestet. Nur PKC412 war in der Lage, das spontane Wachstum von KIT-D816V-transduzierten Ba/F3-Zellen und die Rezeptorautophosphorylierung in HEK 293T-Zellen zu inhibieren. PKC412 führte überdies in den Ba/F3-Zellen zu einem deutlichen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Arrest.

Die beschriebenen In-vitro-Versuche können zwar einen ersten Einblick in die Rolle der untersuchten Mutationen in der AML bieten, tiefergehende Modelle sind jedoch vonnöten, um das Verständnis der Krankheitsentstehung in diesem Kontext zu erhöhen.

### 8 Abstract

Gain-of-function mutations in proto-oncogenes encoding for receptor tyrosine kinases play an important role in the pathogenesis of solid and hematopoietic malignancies, e.g. acute myeloid leukemia. In the course of this study, functionally uncharacterized mutations in the proto-oncogenes *c-KIT* and *FLT3* have been studied for their transforming potential using cell culture models. Small in-frame deletion plus insertion mutations in the extracellular portion of the KIT receptor tyrosine kinase (exon 8 mutations) are strongly associated with core binding factor (CBF) - acute myeloid leukemia (AML) and a worse clinical outcome. Three representative exon 8 mutants were stably expressed in IL-3 dependent Ba/F3 cells. These mutants were characterized by a hypersensitivity to stem cell factor (SCF) stimulation in terms of proliferation and resistance to apoptotic cell death. As assessed by receptor cross-linking experiments, one representative exon 8 mutant showed spontaneous and increased ligand induced receptor dimerization. These biological effects were confirmed by demonstrating increased phosphorylation of the KIT downstream target mitogen-activated protein kinase (MAPK) after SCF stimulation compared to the KIT-WT receptor.

Conversely, the FLT3-D324N single nucleotide polymorphism which was found to be present in 6.4% of de novo AML, 9.0% of CML and 4.5% of ALL did not have any impact on the prognosis of AML patients and was detected in control persons as well (1.5%). No significant functional differences to FLT3-WT could be detected regarding receptor phosphorylation, proliferation or resistance against apoptotic cell death in response to ligand stimulation.

In contrast to KIT exon 8 mutations, KIT-D816 mutants that drastically impaired the overall and event-free survival of AML patients with a favourable karyotype are resistant to the inhibition by imatinib. Two structurally unrelated inhibitors – PKC412 and SU5614 – were tested for inhibition of KIT-D816V. It could be demonstrated that only PKC412 could efficiently inhibit the spontaneous growth of KIT-D816V transduced Ba/F3 cells

## Zusammenfassung

and the receptor autophosphorylation. Furthermore, PKC412 led to a pronounced G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> growth arrest in Ba/F3 cells as assessed by cell cycle analysis.

In summary, these *in vitro* models might provide first insights into the role of the extracellular KIT and FLT3 mutations in AML. More refined *in vivo* model systems will further extend our understanding of the pathogenetic role of extracellular RTK mutations in AML.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Wilson, G. A., Gari, M. A., Peake, I. R., Rees, D. C., Vandenberghe, E. A., Winship, P. R., Reilly, J. T. 2000: 'FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group'. **Br J Haematol** 111: 190-5.
- Adya, N., Stacy, T., Speck, N. A., Liu, P. P. 1998: 'The leukemic protein core binding factor beta (CBFbeta)-smooth-muscle myosin heavy chain sequesters CBFalpha2 into cytoskeletal filaments and aggregates'. **Mol Cell Biol** 18: 7432-43.
- Al-Hajj, M., Clarke, M. F. 2004: 'Self-renewal and solid tumor stem cells'. **Oncogene** 23: 7274-82.
- Aplenc, R., Thompson, J., Han, P., La, M., Zhao, H., Lange, B., Rebbeck, T. 2005: 'Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia'. **Cancer Res** 65: 2482-7.
- Ashman, L. K. 1999: 'The biology of stem cell factor and its receptor C-kit'. **Int J Biochem Cell Biol** 31: 1037-51.
- Azam, M., Latek, R. R., Daley, G. Q. 2003: 'Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL'. **Cell** 112: 831-43.
- Bagrintseva, K., Schwab, R., Kohl, T. M., Schnittger, S., Eichenlaub, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2004: 'Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitors in FLT3-ITD-transformed hematopoietic cells'. **Blood** 103: 2266-75.
- Beghini, A., Larizza, L., Cairoli, R., Morra, E. 1998: 'c-kit activating mutations and mast cell proliferation in human leukemia'. **Blood** 92: 701-2.
- Beghini, A., Peterlongo, P., Ripamonti, C. B., Larizza, L., Cairoli, R., Morra, E., Mecucci, C. 2000: 'C-kit mutations in core binding factor leukemias'. **Blood** 95: 726-7.
- Beghini, A., Ripamonti, C. B., Cairoli, R., Cazzaniga, G., Colapietro, P., Elice, F., Nadali, G., Grillo, G., Haas, O. A., Biondi, A., Morra, E., Larizza, L. 2004: 'KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication'. **Haematologica** 89: 920-5.
- Bell, H. S., Ryan, K. M. 2005: 'Intracellular signalling and cancer: complex pathways lead to multiple targets'. **Eur J Cancer** 41: 206-15.

## Literaturverzeichnis

- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., Sultan, C. 1976: 'Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group'. **Br J Haematol** 33: 451-8.
- Blechman, J. M., Lev, S., Barg, J., Eisenstein, M., Vaks, B., Vogel, Z., Givol, D., Yarden, Y. 1995: 'The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction'. **Cell** 80: 103-13.
- Blechman, J. M., Lev, S., Brizzi, M. F., Leitner, O., Pegoraro, L., Givol, D., Yarden, Y. 1993: 'Soluble c-kit proteins and antireceptor monoclonal antibodies confine the binding site of the stem cell factor'. **J Biol Chem** 268: 4399-406.
- Blume-Jensen, P., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Zsebo, K. M., Westermarck, B., Heldin, C. H. 1991: 'Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis'. **Embo J** 10: 4121-8.
- Blume-Jensen, P., Hunter, T. 2001: 'Oncogenic kinase signalling'. **Nature** 411: 355-65.
- Bohmer, F. D., Karagyozov, L., Uecker, A., Serve, H., Botzki, A., Mahboobi, S., Dove, S. 2003: 'A single amino acid exchange inverts susceptibility of related receptor tyrosine kinases for the ATP site inhibitor STI-571'. **J Biol Chem** 278: 5148-55.
- Bradford, M. M. 1976: 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding'. **Anal Biochem** 72: 248-54.
- Braess, J., Voss, S., Jahns-Streubel, G., Schoch, C., Haferlach, T., Kern, W., Keye, S., Schleyer, E., Hiddemann, W. 2000: 'The pharmacodynamic basis for the increased antileukaemic efficacy of cytosine arabinoside-based treatment regimens in acute myeloid leukaemia with a high proliferative activity'. **Br J Haematol** 110: 170-9.
- Broudy, V. C., Lin, N. L., Sabath, D. F. 2001: 'The fifth immunoglobulin-like domain of the Kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface'. **Cytokine** 15: 188-95.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B. J., Lydon, N. B. 1996: 'Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative'. **Cancer Res** 56: 100-4.
- Buchner, T., Hiddemann, W., Berdel, W., Wormann, B., Schoch, C., Loffler, H., Haferlach, T., Schumacher, A., Staib, P., Balleisen, L., Gruneisen, A., Rasche, H., Aul, C., Heyll, A., Lengfelder, E., Ludwig, W. D., Maschmeyer, G., Eimermacher, H., Karow, J., Frickhofen, N., Hirschmann, W. D., Sauerland, M. C. 2002: 'Acute myeloid leukemia: treatment over 60'. **Rev Clin Exp Hematol** 6: 46-59; discussion 86-7.



## Literaturverzeichnis

- Buchner, T., Hiddemann, W., Berdel, W. E., Wormann, B., Schoch, C., Fonatsch, C., Löffler, H., Haferlach, T., Ludwig, W. D., Maschmeyer, G., Staib, P., Aul, C., Gruneisen, A., Lengfelder, E., Frickhofen, N., Kern, W., Serve, H. L., Mesters, R. M., Sauerland, M. C., Heinecke, A. 2003: '6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group'. **J Clin Oncol** 21: 4496-504.
- Care, R. S., Valk, P. J., Goodeve, A. C., Abu-Duhier, F. M., Geertsma-Kleinekoort, W. M., Wilson, G. A., Gari, M. A., Peake, I. R., Lowenberg, B., Reilly, J. T. 2003: 'Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias'. **Br J Haematol** 121: 775-7.
- Carlberg, K., Rohrschneider, L. 1994: 'The effect of activating mutations on dimerization, tyrosine phosphorylation and internalization of the macrophage colony stimulating factor receptor'. **Mol Biol Cell** 5: 81-95.
- Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N. B., Gilliland, D. G., Druker, B. J. 1997: 'CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins'. **Blood** 90: 4947-52.
- Carroll, M., Tomasson, M. H., Barker, G. F., Golub, T. R., Gilliland, D. G. 1996: 'The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93: 14845-50.
- Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., Kroemer, G. 1996: 'Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis'. **J Immunol** 157: 512-21.
- Casteran, N., De Sepulveda, P., Beslu, N., Aoubala, M., Letard, S., Lecocq, E., Rottapel, R., Dubreuil, P. 2003: 'Signal transduction by several KIT juxtamembrane domain mutations'. **Oncogene** 22: 4710-22.
- Castilla, L. H., Garrett, L., Adya, N., Orlic, D., Dutra, A., Anderson, S., Owens, J., Eckhaus, M., Bodine, D., Liu, P. P. 1999: 'The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia'. **Nat Genet** 23: 144-6.
- Castilla, L. H., Wijmenga, C., Wang, Q., Stacy, T., Speck, N. A., Eckhaus, M., Marin-Padilla, M., Collins, F. S., Wynshaw-Boris, A., Liu, P. P. 1996: 'Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CBFB-MYH11'. **Cell** 87: 687-96.

## Literaturverzeichnis

- Cerchia, L., Duconge, F., Pestourie, C., Boulay, J., Aissouni, Y., Gombert, K., Tavitian, B., de Franciscis, V., Libri, D. 2005: 'Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase'. **PLoS Biol** 3: e123.
- Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., de Franciscis, V. 2002: 'Nucleic acid aptamers in cancer medicine'. **FEBS Lett** 528: 12-6.
- Chian, R., Young, S., Danilkovitch-Miagkova, A., Ronnstrand, L., Leonard, E., Ferrao, P., Ashman, L., Linnekin, D. 2001: 'Phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the transformation of hematopoietic cells by the D816V c-Kit mutant'. **Blood** 98: 1365-73.
- Chou, T. C., Talalay, P. 1981: 'Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors'. **Eur J Biochem** 115: 207-16.
- Chou, T. C., Talalay, P. 1984: 'Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors'. **Adv Enzyme Regul** 22: 27-55.
- Clarke, I. D., Dirks, P. B. 2003: 'A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming'. **Oncogene** 22: 722-33.
- Coico, R. (Hrsg.) 1994. Current Protocols in Immunology. **John Wiley & Sons**, Edison, NJ.
- Cools, J., Mentens, N., Furet, P., Fabbro, D., Clark, J. J., Griffin, J. D., Marynen, P., Gilliland, D. G. 2004: 'Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia'. **Cancer Res** 64: 6385-9.
- Crosier, P. S., Ricciardi, S. T., Hall, L. R., Vitas, M. R., Clark, S. C., Crosier, K. E. 1993: 'Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia'. **Blood** 82: 1151-8.
- Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K. M., Toshima, K., Lairmore, T. C., Howe, J. R., Moley, J. F., Goodfellow, P., Wells, S. A., Jr. 1993: 'Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC'. **Hum Mol Genet** 2: 851-6.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C. L. 2001: 'Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia'. **N Engl J Med** 344: 1031-7.
- Duensing, A., Medeiros, F., McConarty, B., Joseph, N. E., Panigrahy, D., Singer, S., Fletcher, C. D., Demetri, G. D., Fletcher, J. A. 2004: 'Mechanisms of oncogenic

## Literaturverzeichnis

- KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs)'. **Oncogene** 23: 3999-4006.
- Elisei, R., Cosci, B., Romei, C., Bottici, V., Sculli, M., Lari, R., Barale, R., Pacini, F., Pinchera, A. 2004: 'RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population'. **J Clin Endocrinol Metab** 89: 3579-84.
- Fabbro, D., Ruetz, S., Bodis, S., Pruschy, M., Csermak, K., Man, A., Campochiaro, P., Wood, J., O'Reilly, T., Meyer, T. 2000: 'PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential'. **Anticancer Drug Des** 15: 17-28.
- Fong, L., Hou, Y., Rivas, A., Benike, C., Yuen, A., Fisher, G. A., Davis, M. M., Engleman, E. G. 2001: 'Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98: 8809-14.
- Frost, M. J., Ferrao, P. T., Hughes, T. P., Ashman, L. K. 2002: 'Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant'. **Mol Cancer Ther** 1: 1115-24.
- Fuchs, R. 2002: 'Akute myeloische Leukämie. Therapie - Forschung - Perspektiven'. **UNI-MED Verlag AG**, Bremen.
- Gari, M., Goodeve, A., Wilson, G., Winship, P., Langabeer, S., Linch, D., Vandenberghe, E., Peake, I., Reilly, J. 1999: 'c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia'. **Br J Haematol** 105: 894-900.
- Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., Lazar, M. A. 1998: 'Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO'. **Mol Cell Biol** 18: 7185-91.
- Goemans, B. F., Zwaan, C. M., Miller, M., et al. 2003: 'Incidence and Prognostic Significance of c-kit Exon 8 and 17 Mutations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia (AML)'. **Blood** 102: 198b-199b [Abstract].
- Gokkel, E., Grossman, Z., Ramot, B., Yarden, Y., Rechavi, G., Givol, D. 1992: 'Structural organization of the murine c-kit proto-oncogene'. **Oncogene** 7: 1423-9.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., Goldstone, A. 1998: 'The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukemia Working Parties'. **Blood** 92: 2322-33.
- Haferlach, T., Schoch, C., Löffler, H., Gassmann, W., Kern, W., Schnittger, S., Fonatsch, C., Ludwig, W. D., Wuchter, C., Schlegelberger, B., Staib, P., Reichle, A., Kubica,

## Literaturverzeichnis

- U., Eimermacher, H., Balleisen, L., Gruneisen, A., Haase, D., Aul, C., Karow, J., Lengfelder, E., Wormann, B., Heinecke, A., Sauerland, M. C., Buchner, T., Hiddemann, W. 2003: 'Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multi-parameter analysis from the German AML Cooperative Group studies'. **J Clin Oncol** 21: 256-65.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., Bloomfield, C. D. 1999: 'The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997'. **Ann Oncol** 10: 1419-32.
- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., Naoe, T. 2000: 'Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines'. **Oncogene** 19: 624-31.
- Heinrich, M. C., Blanke, C. D., Druker, B. J., Corless, C. L. 2002: 'Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies'. **J Clin Oncol** 20: 1692-703.
- Heldin, C. H. 1995: 'Dimerization of cell surface receptors in signal transduction'. **Cell** 80: 213-23.
- Hiddemann, W. 1991: 'Cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia: the role and place of high-dose regimens'. **Ann Hematol** 62: 119-28.
- Hiddemann, W., Kern, W., Heinecke, A., Sauerland, C., Buchner, T. 2004: 'Priming with G-CSF in acute myeloid leukemia: preliminary data of the AMLCG'. **Ann Hematol** 83 Suppl 1: S53-4.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., Kitamura, Y. 1998: 'Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors'. **Science** 279: 577-80.
- Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A., La Rosee, P., Lahaye, T., Berger, U., Cross, N. C., Linkesch, W., Druker, B. J., Hehlmann, R., Gambacorti-Passerini, C., Corneo, G., D'Incalci, M. 2001: 'Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy'. **Science** 293: 2163.
- Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H. J., Yokomizo, T., Ito, Y. 2001: 'Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation'. **Embo J** 20: 723-33.

## Literaturverzeichnis

- Huntly, B. J., Gilliland, D. G. 2005: 'Timeline: Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research'. **Nat Rev Cancer** 5: 311-21.
- Ikeda, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Kitayama, H., Sugahara, H., Nishiura, T., Karasuno, T., Tomiyama, Y., Yamatodani, A., Kanayama, Y., et al. 1993: 'Changes in phenotype and proliferative potential of human acute myeloblastic leukemia cells in culture with stem cell factor'. **Exp Hematol** 21: 1686-94.
- Kaplan, E. L., Meier, P. 1958: 'Nonparametric estimations from incomplete observations'. **J Am Stat Assoc** 53: 457-481.
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., Gilliland, D. G. 2002: 'FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model'. **Blood** 99: 310-8.
- Kimura, S., Kawakami, T., Kawa, Y., Soma, Y., Kushimoto, T., Nakamura, M., Watabe, H., Ooka, S., Mizoguchi, M. 2005: 'Bcl-2 reduced and fas activated by the inhibition of stem cell factor/KIT signaling in murine melanocyte precursors'. **J Invest Dermatol** 124: 229-34.
- Kiyoi, H., Naoe, T., Nakano, Y., Yokota, S., Minami, S., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Jinnai, I., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Oh, H., Motoji, T., Omoto, E., Saito, H., Ohno, R., Ueda, R. 1999: 'Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia'. **Blood** 93: 3074-80.
- Kiyoi, H., Ohno, R., Ueda, R., Saito, H., Naoe, T. 2002: 'Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain'. **Oncogene** 21: 2555-63.
- Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H., Naoe, T. 1998: 'Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product'. **Leukemia** 12: 1333-7.
- Kogan, S. C., Lagasse, E., Atwater, S., Bae, S. C., Weissman, I., Ito, Y., Bishop, J. M. 1998: 'The PEBP2betaMYH11 fusion created by Inv(16)(p13;q22) in myeloid leukemia impairs neutrophil maturation and contributes to granulocytic dysplasia'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95: 11863-8.
- Kohl, T. M., Schnittger, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2005: 'KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor'. **Blood** 105: 3319-21.
- Larizza, L., Magnani, I., Beghini, A. 2005: 'The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia'. **Leuk Lymphoma** 46: 247-55.

## Literaturverzeichnis

- Lavagna, C., Marchetto, S., Birnbaum, D., Rosnet, O. 1995: 'Identification and characterization of a functional murine FLT3 isoform produced by exon skipping'. **J Biol Chem** 270: 3165-71.
- Lee, J. T., Jr., McCubrey, J. A. 2002: 'The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia'. **Leukemia** 16: 486-507.
- Lev, S., Blechman, J., Nishikawa, S., Givol, D., Yarden, Y. 1993: 'Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor'. **Mol Cell Biol** 13: 2224-34.
- Levine, E. G., Bloomfield, C. D. 1992: 'Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure'. **Semin Oncol** 19: 47-84.
- Levis, M., Pham, R., Smith, B. D., Small, D. 2004: 'In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects'. **Blood** 104: 1145-50.
- Ley, T. J., Minx, P. J., Walter, M. J., Ries, R. E., Sun, H., McLellan, M., DiPersio, J. F., Link, D. C., Tomasson, M. H., Graubert, T. A., McLeod, H., Houry, H., Watson, M., Shannon, W., Trinkaus, K., Heath, S., Vardiman, J. W., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Milbrandt, J. D., Mardis, E. R., Wilson, R. K. 2003: 'A pilot study of high-throughput, sequence-based mutational profiling of primary human acute myeloid leukemia cell genomes'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100: 14275-80.
- Longley, B. J., Jr., Metcalfe, D. D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S. Z., Heitjan, D., Ma, Y. 1999: 'Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96: 1609-14.
- Longley, B. J., Reguera, M. J., Ma, Y. 2001: 'Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy'. **Leuk Res** 25: 571-6.
- Lorimer, I. A., Lavioire, S. J. 2001: 'Activation of extracellular-regulated kinases by normal and mutant EGF receptors'. **Biochim Biophys Acta** 1538: 1-9.
- Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R., Huynh, K. D., Bardwell, V. J., Lavinsky, R. M., Rosenfeld, M. G., Glass, C., Seto, E., Hiebert, S. W. 1998: 'ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors'. **Mol Cell Biol** 18: 7176-84.
- Lux, M. L., Rubin, B. P., Biase, T. L., Chen, C. J., Maclure, T., Demetri, G., Xiao, S., Singer, S., Fletcher, C. D., Fletcher, J. A. 2000: 'KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors'. **Am J Pathol** 156: 791-5.
- Lyman, S. D., Jacobsen, S. E. 1998: 'c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities'. **Blood** 91: 1101-34.

## Literaturverzeichnis

- Lyman, S. D., James, L., Vanden Bos, T., de Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L. T., Picha, K. S., McKenna, H. J., Splett, R. R., et al. 1993: 'Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells.'. **Cell** 75: 1157-67.
- Mackarehtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., Lemischka, I. R. 1995: 'Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors'. **Immunity** 3: 147-61.
- Major, P. P., Egan, E. M., Beardsley, G. P., Minden, M. D., Kufe, D. W. 1981: 'Lethality of human myeloblasts correlates with the incorporation of arabinofuranosylcytosine into DNA'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 78: 3235-9.
- Majumder, S., Brown, K., Qiu, F. H., Besmer, P. 1988: 'c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization'. **Mol Cell Biol** 8: 4896-903.
- Matsuno, N., Nanri, T., Kawakita, T., Mitsuya, H., Asou, N. 2004. Imatinib Mesylate for Refractory Acute Myeloblastic Leukemia Harboring inv(16) and C-KIT Exon 8 Mutation *In ASH, abstract [4405]*, San Diego, CA.
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M., Weissman, I. L. 1988: 'The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematology differentiation and function'. **Science** 241: 1632-9.
- Menard, S., Casalini, P., Campiglio, M., Pupa, S. M., Tagliabue, E. 2004: 'Role of HER2/neu in tumor progression and therapy'. **Cell Mol Life Sci** 61: 2965-78.
- Mrozek, K., Heinonen, K., Bloomfield, C. D. 2001: 'Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia'. **Best Pract Res Clin Haematol** 14: 19-47.
- Mrozek, K., Heinonen, K., de la Chapelle, A., Bloomfield, C. D. 1997: 'Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia'. **Semin Oncol** 24: 17-31.
- Mulligan, L. M., Kwok, J. B., Healey, C. S., Elsdon, M. J., Eng, C., Gardner, E., Love, D. R., Mole, S. E., Moore, J. K., Papi, L., et al. 1993: 'Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A'. **Nature** 363: 458-60.
- Munoz, L., Aventin, A., Villamor, N., Junca, J., Acebedo, G., Domingo, A., Rozman, M., Torres, J. P., Tormo, M., Nomdedeu, J. F. 2003: 'Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication'. **Haematologica** 88: 637-45.
- Ning, Z. Q., Li, J., McGuinness, M., Arceci, R. J. 2001: 'STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity'. **Oncogene** 20: 4528-36.

## Literaturverzeichnis

- Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shigesada, K., Ito, Y. 1993: 'PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90: 6859-63.
- Okuda, T., Cai, Z., Yang, S., Lenny, N., Lyu, C. J., van Deursen, J. M., Harada, H., Downing, J. R. 1998: 'Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors'. **Blood** 91: 3134-43.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., Downing, J. R. 1996: 'AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis'. **Cell** 84: 321-30.
- Omura, T., Heldin, C. H., Ostman, A. 1997: 'Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization'. **J Biol Chem** 272: 12676-82.
- Ono, R., Nakajima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y., Nosaka, T. 2005: 'Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis'. **J Clin Invest** 115: 919-29.
- Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M., McKearn, J. P. 1984: 'Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro'. **Nature** 309: 126-31.
- Plantier, I., Lai, J. L., Wattel, E., Bauters, F., Fenaux, P. 1994: 'Inv(16) may be one of the only 'favorable' factors in acute myeloid leukemia: a report on 19 cases with prolonged follow-up'. **Leuk Res** 18: 885-8.
- Propper, D. J., McDonald, A. C., Man, A., Thavasu, P., Balkwill, F., Braybrooke, J. P., Caponigro, F., Graf, P., Dutreix, C., Blackie, R., Kaye, S. B., Ganesan, T. S., Talbot, D. C., Harris, A. L., Twelves, C. 2001: 'Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C'. **J Clin Oncol** 19: 1485-92.
- Reilly, J. T. 2003: 'Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis'. **Blood Rev** 17: 241-8.
- Reuther, G. W., Lambert, Q. T., Caligiuri, M. A., Der, C. J. 2000: 'Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia'. **Mol Cell Biol** 20: 8655-66.
- Ronnstrand, L. 2004: 'Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit'. **Cell Mol Life Sci** 61: 2535-48.
- Rosnet, O., Birnbaum, D. 1993: 'Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases'. **Crit Rev Oncog** 4: 595-613.



## Literaturverzeichnis

- Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tonnelles, C., Toiron, Y., Birg, F., Birnbaum, D. 1993: 'Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells'. **Blood** 82: 1110-9.
- Ross, S. E., Radomska, H. S., Wu, B., Zhang, P., Winnay, J. N., Bajnok, L., Wright, W. S., Schaufele, F., Tenen, D. G., MacDougald, O. A. 2004: 'Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis'. **Mol Cell Biol** 24: 675-86.
- Roussel, M. F., Downing, J. R., Rettenmier, C. W., Sherr, C. J. 1988: 'A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential'. **Cell** 55: 979-88.
- Roussel, M. F., Downing, J. R., Sherr, C. J. 1990: 'Transforming activities of human CSF-1 receptors with different point mutations at codon 301 in their extracellular domains'. **Oncogene** 5: 25-30.
- Sasaki, K., Yagi, H., Bronson, R. T., Tominaga, K., Matsunashi, T., Deguchi, K., Tani, Y., Kishimoto, T., Komori, T. 1996: 'Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93: 12359-63.
- Sattler, M., Salgia, R. 2004: 'Targeting c-Kit mutations: basic science to novel therapies'. **Leuk Res** 28 Suppl 1: S11-20.
- Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H., Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R. A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette, R. L., Druker, B. J. 2002: 'Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study'. **Blood** 99: 3530-9.
- Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., **Kohl, T. M.**, Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M., Buske, C. 2005: 'The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice'. **J Clin Invest** 115: 2159-2168.
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Loffler, H., Sauerland, C. M., Serve, H., Buchner, T., Haferlach, T., Hiddemann, W. 2002: 'Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease'. **Blood** 100: 59-66.
- Seiden, M. V. 2001: 'Ovarian cancer'. **Oncologist** 6: 327-32.

## Literaturverzeichnis

- Sibley, K., Rollinson, S., Allan, J. M., Smith, A. G., Law, G. R., Roddam, P. L., Skibola, C. F., Smith, M. T., Morgan, G. J. 2003: 'Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia'. **Cancer Res** 63: 4327-30.
- Slevin, M. L., Johnston, A., Woollard, R. C., Piall, E. M., Lister, T. A., Turner, P. 1983: 'Relationship between protein binding and extravascular drug concentrations of a water-soluble drug, cytosine arabinoside'. **J R Soc Med** 76: 365-8.
- Sommer, G., Agosti, V., Ehlers, I., Rossi, F., Corbacioglu, S., Farkas, J., Moore, M., Manova, K., Antonescu, C. R., Besmer, P. 2003: 'Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100: 6706-11.
- Speck, N. A., Gilliland, D. G. 2002: 'Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia'. **Nat Rev Cancer** 2: 502-13.
- Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schoch, C., Haferlach, T., Hiddemann, W., Schnittger, S. 2002a: 'A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia'. **Blood** 100: 3423-5.
- Spiekermann, K., Dirschinger, R. J., Schwab, R., Bagrintseva, K., Faber, F., Buske, C., Schnittger, S., Kelly, L. M., Gilliland, D. G., Hiddemann, W. 2003: 'The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3'. **Blood** 101: 1494-504.
- Spiekermann, K., Faber, F., Voswinckel, R., Hiddemann, W. 2002b: 'The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells'. **Exp Hematol** 30: 767-73.
- Sridhar, R., Hanson-Painton, O., Cooper, D. R. 2000: 'Protein kinases as therapeutic targets'. **Pharm Res** 17: 1345-53.
- Stirewalt, D. L., Radich, J. P. 2003: 'The role of FLT3 in haematopoietic malignancies'. **Nat Rev Cancer** 3: 650-65.
- Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Klimek, V., Galinsky, I., Estey, E., Nimer, S. D., Grandin, W., Lebwohl, D., Wang, Y., Cohen, P., Fox, E. A., Neuberg, D., Clark, J., Gilliland, D. G., Griffin, J. D. 2005: 'Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412'. **Blood** 105: 54-60.
- Suh, Y., Vijg, J. 2005: 'SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes'. **Mutat Res** 573: 41-53.

## Literaturverzeichnis

- Tallman, M. S., Gilliland, D. G., Rowe, J. M. 2005: 'Drug therapy of acute myeloid leukemia'. **Blood**.
- Taylor, M. L., Metcalfe, D. D. 2000: 'Kit signal transduction'. **Hematol Oncol Clin North Am** 14: 517-35.
- Testa, U., Martucci, R., Rutella, S., Scambia, G., Sica, S., Benedetti Panici, P., Pierelli, L., Menichella, G., Leone, G., Mancuso, S., et al. 1994: 'Autologous stem cell transplantation: release of early and late acting growth factors relates with hematopoietic ablation and recovery'. **Blood** 84: 3532-9.
- Tian, Q., Frierson, H. F., Jr., Krystal, G. W., Moskaluk, C. A. 1999: 'Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors'. **Am J Pathol** 154: 1643-7.
- Torrent, M., Rickert, K., Pan, B. S., Sepp-Lorenzino, L. 2004: 'Analysis of the activating mutations within the activation loop of leukemia targets Flt-3 and c-Kit based on protein homology modeling'. **J Mol Graph Model** 23: 153-65.
- U.S. Government Statistics. 2002: 'Surveillance, epidemiology, and end-results (SEER) of the National Cancer Institute'.
- van Oosterom, A. T., Judson, I., Verweij, J., Stroobants, S., Donato di Paola, E., Dimitrijevic, S., Martens, M., Webb, A., Scot, R., Van Glabbeke, M., Silberman, S., Nielsen, O. S. 2001: 'Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study'. **Lancet** 358: 1421-3.
- Vassbotn, F. S., Langeland, N., Hagen, I., Holmsen, H. 1990: 'A monoclonal antibody against PDGF B-chain inhibits PDGF-induced DNA synthesis in C3H fibroblasts and prevents binding of PDGF to its receptor'. **Biochim Biophys Acta** 1054: 246-9.
- Vlahovic, G., Crawford, J. 2003: 'Activation of tyrosine kinases in cancer'. **Oncologist** 8: 531-8.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W. 2004: 'Cancer genes and the pathways they control'. **Nat Med** 10: 789-99.
- Wadleigh, M., DeAngelo, D. J., Griffin, J. D., Stone, R. M. 2005: 'After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies'. **Blood** 105: 22-30.
- Wandzioch, E., Edling, C. E., Palmer, R. H., Carlsson, L., Hallberg, B. 2004: 'Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines'. **Blood** 104: 51-7.
- Wang, C., Curtis, J. E., Geissler, E. N., McCulloch, E. A., Minden, M. D. 1989: 'The expression of the proto-oncogene C-kit in the blast cells of acute myeloblastic leukemia'. **Leukemia** 3: 699-702.

## Literaturverzeichnis

- Wang, W. L., Healy, M. E., Sattler, M., Verma, S., Lin, J., Maulik, G., Stiles, C. D., Griffin, J. D., Johnson, B. E., Salgia, R. 2000: 'Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571'. **Oncogene** 19: 3521-8.
- Wang, Y. Y., Zhou, G. B., Yin, T., Chen, B., Shi, J. Y., Liang, W. X., Jin, X. L., You, J. H., Yang, G., Shen, Z. X., Chen, J., Xiong, S. M., Chen, G. Q., Xu, F., Liu, Y. W., Chen, Z., Chen, S. J. 2005: 'AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec'. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102: 1104-9.
- Weiler, S. R., Mou, S., DeBerry, C. S., Keller, J. R., Ruscetti, F. W., Ferris, D. K., Longo, D. L., Linnekin, D. 1996: 'JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor'. **Blood** 87: 3688-93.
- Wodnar-Filipowicz, A., Lyman, S. D., Gratwohl, A., Tichelli, A., Speck, B., Nissen, C. 1996: 'Flt3 ligand level reflects hematopoietic progenitor cell function in aplastic anemia and chemotherapy-induced bone marrow aplasia'. **Blood** 88: 4493-9.
- Woodcock, D. M. 1987: 'Cytosine arabinoside toxicity: molecular events, biological consequences, and their implications'. **Semin Oncol** 14: 251-6.
- Worobec, A. S., Semere, T., Nagata, H., Metcalfe, D. D. 1998: 'Clinical correlates of the presence of the Asp816Val c-kit mutation in the peripheral blood mononuclear cells of patients with mastocytosis'. **Cancer** 83: 2120-9.

## 10 Lebenslauf

### *Persönliche Daten:*

<i>Name</i>	Tobias Martin Kohl
<i>Geburtsdatum</i>	3.2.1977
<i>Geburtsort</i>	Augsburg
<i>Familienstand</i>	ledig
<i>Email-Kontakt</i>	tobiasmartinkohl@gmx.de

### *Chronologischer Lebenslauf:*

6/96	allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Olching (Oberbayern), Note 1.1
9/96 - 9/97	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Fürstfeldbruck (Oberbayern), Dienst auf einer Station für innere Medizin
11/97-10/01	Studium der Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München
4/98	Famulatur in der Apotheke des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München
9/98	Famulatur in der St-Antonius-Apotheke München
8/99	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Note 1.75)
2/00	Verleihung des Herbert-Marcinek-Preises 2000
4/00	Laborpraktikum im Bereich der präparativen pharmazeutischen Chemie im Arbeitskreis Prof. Wanner
6/01	Verleihung eines Bücherpreises im Rahmen der Dr. August und Dr. Anni Lesmüller-Stiftung für besonders qualifizierte Studienleistungen
10/01	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung (Note 1.0)

## Lebenslauf

11/01 - 10/02	Praktisches Jahr in der Löwen-Apotheke, Maisach
11/02	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung bei der Regierung von Oberbayern (Note 1.0)
12/02	Approbation als Apotheker
seit 02/03	Promotion zum Thema <i>Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen in der AML</i> in der Klinischen Kooperationsgruppe Leukämie (AG Spiekermann), Medizinische Klinik und Poliklinik III, des Klinikums Grosshadern der LMU München im GSF-Hämatologikum (Leitung: Prof. Dr. med Wolfgang Hiddemann)

### *Veröffentlichungen:*

Schnittger, S., **Kohl, T. M.**, Leopold, N., Schoch, C., Wichmann, H. E., Kern, W., Lohse, P., Hiddemann, W., Haferlach, T., Spiekermann, K. 2005: 'D324N single-nucleotide polymorphism in the FLT3 gene is associated with higher risk of myeloid leukemias'. **Genes Chromosomes Cancer** [Epub-Vorveröffentlichung am 30.November 2005]

Schnittger, S., **Kohl, T. M.**, Haferlach, T., Kern, W., Hiddemann, W., Spiekermann, K., Schoch, C. 2005: 'KIT-D816 mutations in AML1-ETO positive AML are associated with impaired event-free and overall survival'. **Blood** [Epub-Vorveröffentlichung am 27.Oktober 2005]

Schessl, C., Rawat, V. P., Cusan, M., Deshpande, A., **Kohl, T. M.**, Rosten, P. M., Spiekermann, K., Humphries, R. K., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S. K., Furing-Buske, M., Buske, C. 2005: 'The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice'. **J Clin Invest** 115: 2159-2168.

**Kohl, T. M.**, Schnittger, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2005: 'KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor'. **Blood** 105: 3319-21.

Bagrintseva, K., Schwab, R., **Kohl, T. M.**, Schnittger, S., Eichenlaub, S., Ellwart, J. W., Hiddemann, W., Spiekermann, K. 2004: 'Mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 define a new molecular mechanism of acquired drug resistance to PTK inhibitors in FLT3-ITD-transformed hematopoietic cells'. **Blood** 103: 2266-75.

## *Vortrag:*

**Kohl, T.M.,** Schnittger, S., Ellwart, J.W., Hiddemann W., Spiekermann, K. 2004: 'KIT exon 8 mutations associated with core binding factor (CBF) – acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor', **46<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition**, Abstract Nr. 93

## *Posterpräsentationen:*

**Kohl, T. M.,** Schnittger, S., Leopold, N., Schoch, C., Wichmann, H. E., Kern, W., Lohse, P., Hiddemann, W., Haferlach, T., Spiekermann, K. 2005: 'The FLT3-D324N Variant Is a Functionally Silent Polymorphism in the FLT3 Gene and May Be Associated with a Higher Risk for AML'. **DGHO-Jahrestagung Hannover 2005**, Abstract Nr. 343

Schnittger, S., **Kohl, T. M.,** Leopold, N., Schoch, C., Kern, W., Lohse, P., Hiddemann, W., Haferlach, T., Spiekermann, K. 2004: 'The FLT3-D324N Variant Is a Functionally Silent Polymorphism in the FLT3 Gene and May Be Associated with a Higher Risk for AML'. **46th ASH Annual Meeting and Exposition**, Abstract Nr. 3373