

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

Thema der Dissertation

**Die Bedeutung von Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 für
die Resistenzentstehung in der akuten myeloischen Leukämie**

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

Vorgelegt von
Stefanie Geisenhof
aus Bayreuth

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|------------------------------|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. W. Hiddemann |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. R. Rupp |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. B. Emmerich |
| | Prof. Dr. Th. Kirchner |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | PD Dr. Karsten Spiekermann |
| Dekan: | Prof. Dr. Dietrich Reinhardt |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 29.03.2007 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1 AML..... | 6 |
| 1.1.2 Diagnosestellung | 6 |
| 1.1.3 Klassifikationen..... | 7 |
| 1.1.3 Pathogenese | 8 |
| 1.2 Regulation der Hämatopoese durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren..... | 9 |
| 1.2.1 RTK | 9 |
| 1.2.2 FLT3 | 11 |
| 1.2.3 Mutationen im FLT3-Gen..... | 11 |
| 1.3 Therapiemöglichkeiten der AML..... | 12 |
| 1.3.1 konventionelle Chemotherapie | 13 |
| 1.3.2 RTK-Inhibitoren | 13 |
| 1.3.4 Mechanismen der Zytostatika-Resistenz..... | 14 |
| 2. Zielsetzung der Arbeit..... | 15 |
| 3. Material und Methoden..... | 16 |
| 3.1 Reagentien und Zelllinien..... | 16 |
| 3.1.1 Materialien für die Zellkultur | 16 |
| 3.1.2 Lösungen, Puffer und Gele..... | 16 |
| 3.1.3 Zelllinien | 18 |
| 3.1.4 PTK Inhibitoren und konventionelle Chemotherapeutika | 18 |
| 3.1.5 Antikörper | 19 |
| 3.1.6 Kits..... | 19 |
| 3.2 Methoden in der Zellkultur | 19 |
| 3.2.1 Kultivierung..... | 19 |
| 3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen | 20 |
| 3.2.3 Proliferationsassays | 20 |
| 3.2.4 FACS-Durchflußzytometrie..... | 20 |
| 3.2.5 Apoptosemessung mittels Annexin-V/7-AAD-Messung | 21 |
| 3.2.6 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Kernfärbung | 21 |
| 3.2.7 Transiente Transfektion von BOSC23-Zellen..... | 21 |
| 3.2.8 Transduktion von Ba/F3 Zellen..... | 21 |
| 3.3 Biochemische Methoden | 22 |
| 3.3.1 Proteinisolation | 22 |
| 3.3.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)..... | 22 |
| 3.3.3 SDS-PAGE | 22 |
| 3.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran | 23 |
| 3.3.5 Detektion mit Antikörpern | 23 |
| 3.3.6 Detektion der Antikörper mittels ECL-Verfahren | 24 |
| 3.3.7 Stripping der Nitrozellulosemembran | 24 |
| 3.4 Molekularbiologische Methoden..... | 24 |
| 3.4.1 DNA-Konstrukte und Vektoren | 24 |
| 3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese..... | 25 |
| 3.4.3 RNA-Präparation und RNA-Quantifizierung | 25 |
| 3.4.4 cDNA-Synthese | 25 |
| 3.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 25 |
| 3.4.6 In vitro-Mutagenese..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.7 Nukleotidsequenzierung | 27 |
| 3.5 Elektronische Datenverarbeitung/Software | 28 |
| 4. Ergebnisse | 29 |
| 4.1 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten haben eine erhöhte Resistenz gegenüber dem FLT3-PTK Inhibitor SU5614 | 29 |
| 4.1.2 Der Einfluß der Struktur der Längenmutationen auf die Sensitivität gegenüber PTK Inhibitoren | 29 |
| 4.2. FLT3-ITD-TKD duale Mutanten zeigen eine partielle Resistenz gegenüber Daunorubicin | 31 |
| 4.2.1 Erhöhte Resistenz gegenüber Daunorubicin in Proliferations-/ Apoptoseassays | 31 |
| 4.2.2 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten haben in Gegenwart von Daunorubicin einen kompetitiven Wachstumsvorteil | 32 |
| 4.2.3 Unterschiedliche Längenmutationen zeigen nur geringen Einfluss auf Resistenz gegenüber Daunorubicin | 33 |
| 4.3 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten haben einen Einfluss auf die STAT5 Aktivierung und die Regulation seiner Zielproteine Bcl- x(L) und RAD51 in Ba/F3-Zellen | 35 |
| 4.3.1 Duale Mutanten induzieren eine verstärkte Aktivierung von STAT5 | 35 |
| 4.3.2 Konstitutive STAT5 Aktivierung führt zu einer Hochregulation seiner Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51 | 36 |
| 4.4 Die Koexpression von Bcl-x(L) und FLT3-ITD führt in Ba/F3 Zellen zu einem den FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten sehr ähnlichen Resistenzmuster gegenüber FLT3 PTK Inhibitoren und Daunorubicin | 38 |
| 4.4.1 Resistenzentwicklung gegenüber SU5614 | 38 |
| 4.4.2 Resistenzmechanismen von FLT3 Mutanten gegenüber Daunorubicin | 40 |
| 4.5 Zellzyklusanalysen bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten zeigen Veränderungen in der Zellzyklusregulation nach Zytostatika- Exposition | 41 |
| 4.5.1 Zellzyklusanalyse nach Exposition mit Daunorubicin zeigt vermehrte Akkumulation der FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten in der G ₂ M-Phase | 41 |
| 4.5.2 FLT3-Expression ist verantwortlich für G ₂ M-Zellzyklusarrest | 42 |
| 4.6 Rapamycin stellt die Sensitivität der dualen Mutanten gegenüber PTK Inhibitoren wieder her | 43 |
| 5. Diskussion | 45 |
| 5.1 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten in der AML | 45 |
| 5.2 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu PTK Inhibitor-Resistenzen – Mechanismen und Folgen für Therapiestrategien | 47 |
| 5.3 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten induzieren Resistenzen gegenüber dem Zytostatikum Daunorubicin | 48 |
| 5.3.1 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu einer gesteigerten Aktivierung von STAT5 | 48 |
| 5.3.2 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu einer Überexpression von Bcl-x(L) | 49 |
| 5.3.3 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu einer erhöhten Expression von RAD51 | 50 |
| 5.3.4 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu Veränderungen in der Zellzykluskontrolle nach DNA-Schädigung | 51 |
| 5.4 Therapiestrategien, Möglichkeiten und Entwicklung | 52 |
| 5.4.1 Kombinationstherapien | 52 |
| 5.4.2 Angriff auf resistenzfördernde Gene | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 6. Zusammenfassung | 55 |
| 7. Referenzen | 56 |
| 8. Anhang | 60 |
| 8.1 Abkürzungsverzeichnis | 60 |
| 8.2 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen..... | 62 |
| 8.3 Danksagung..... | 63 |
| 8.4 Lebenslauf | 64 |

1. Einleitung

1.1 AML

Der Begriff Leukämie entstammt dem Griechischen und bedeutet weißes Blut, was sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugation bei Patienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen bezieht.

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Neoplasie von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die in AML-Zellen nachweisbaren genetischen Veränderungen beeinflussen sowohl Wachstum als auch Differenzierung der Zellen. Die Zellen sind zwar noch zur Teilung sowie zur Proliferation befähigt, jedoch nicht mehr zur Differenzierung. Es kommt zur Akkumulation von leukämischen, unreifen Zellformen im Knochenmark und anderen Geweben sowie zu einer Ausschwemmung dieser Zellen ins Blut. Als Folge der Suppression der funktionstüchtigen, reifen hämatopoetischen Vorläuferzellen resultiert eine Verminderung von Erythrozyten, Neutrophilen und Thrombozyten.

Dies führt zu einer Vielfalt an Symptomen, unter anderem kommt es zur Anämie, zu verstärkten Blutungen und auch zu einem erhöhten Infektionsrisiko. Patienten stellen sich mit unterschiedlichen Symptomen vor, häufig sind Schwächegefühl und leichte Ermüdbarkeit, Infektionen verschiedener Intensität sowie eine hämorrhagische Diathese, die sich in Form von Zahnfleischbluten, Ecchymosen oder Epistaxis manifestiert (Schiffer, 2005).

Die Inzidenz der AML beträgt in den westlichen Ländern ungefähr 3,4/100.000/Jahr, wobei 1,2/100.000/Jahr bei einem Alter von 30 Jahren auftreten, während ab einem Alter von 80 Jahren $> 70/100.000$ beobachtet werden können. Die AML macht 80% aller akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus (Schiffer, 2005; Tallman et al., 2005).

1.1.2 Diagnosestellung

Die Diagnosestellung besteht aus drei Komponenten: Zum einen muss eine Infiltration des Knochenmarks mit Blasten nachgewiesen werden. Nach dem derzeitigen FAB-Standard wird eine AML durch das Vorhandensein von mindestens 30% Blasten definiert. Von der WHO wurde vorgeschlagen, diesen Wert auf 20% zu senken.

Neben der Infiltration des Knochenmarks muss die Abstammung der Blasten von der myeloischen Zellreihe bestätigt werden. Dies kann durch zytochemische sowie durch immunologische Studien durchgeführt werden.

Als letzter diagnostischer Schritt sollte die Klassifikation der AML nach den aktuellen FAB- und WHO- Schemata erfolgen (Schiffer, 2005).

1.1.3 Klassifikationen

Es existieren verschiedene Klassifikationen der AML: zum einen gibt es die FAB-Klassifikation (French-American-British-Group) (siehe Tabelle 1), die eine Einteilung nach morphologischen Kriterien vornimmt. Zum anderen existiert eine Klassifikation der WHO, die die morphologischen Kriterien der FAB-Klassifikation zwar berücksichtigt, aber zusätzlich die Wichtigkeit der zytogenetischen Befunde unterstreicht (siehe Tabelle 2).

| FAB | | % von AML | Zytochemie |
|-------------|---------------------------------|-----------|----------------|
| M0 | Akute undifferenzierte L. | 5 | |
| M1 | AML ohne Ausreifung | 15 | POX |
| M2 | AML mit Ausreifung | 25 | POX |
| M3 | Akute Promyelozyten-L. (APL) | 10 | POX |
| M3v | Variante mikrogranulozytäre APL | | POX |
| M4 | Akute myelomonozytäre L. | 25 | POX + Esterase |
| M4Eo | Mit Eosinophilie | | POX + Esterase |
| M5 | Akute monozytäre Leukämie | 10 | Esterase |
| M6 | Akute Erythroleukämie | 5 | |
| M7 | Akute megakaryozytäre L. | 5 | |

Tabelle 1: FAB-Klassifikation (Larson & Le Beau, 2005) L.: Leukämie; POX: Myeloperoxidasereaktion; Esterase: α -Naphthylacetatesterasereaktion

| |
|--|
| <p>AML mit definierten Chromosomenanomalien</p> <ul style="list-style-type: none"> • AML mit t(8;21)(q22;q22) • AML mit abnormen Eosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) • Akute promyelozytische Leukämie mit t(15;17)(q22;q12), PML/RAR-α und Varianten • AML mit 11q23 (MLL) Abnormalitäten |
| <p>AML mit multilinearer Dysplasie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Folgend auf ein MDS oder MDS/MPD • Ohne vorangehendes MDS oder MDS/MPD, aber mit einer Dysplasie in mind. 50% der Zellen oder in zwei bzw. mehr myeloischen Zelllinien |
| <p>AML und MDS (therapiebedingt)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Durch Alkylantien/Bestrahlung bedingt • Durch Topoisomerase II Inhibitoren bedingt • Andere |

AML, nicht anderweitig kategorisiert

- AML, minimal differenziert
- AML ohne Reifung
- AML mit Reifung
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute monoblastische/akute monozytische Leukämie
- Akute erythrozytäre Leukämie (erythrozytäre/myeloische und reine erythroleukämische Varianten)
- Akute megakaryoblastische Leukämie
- Akute basophile Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose
- Myeloisches Sarkom

Tabelle 2: WHO-Klassifikation (Schiffer, 2005)**1.1.3 Pathogenese**

Ähnlich der Pathogenese von anderen Malignomen entsteht auch die AML durch genetische Veränderungen, die neben Mutationen von Onkogenen auch den Verlust von Tumorsuppressorgenen beinhalten. Wie bei vielen soliden Tumoren gilt die Mehrschrittpathogenese, wonach für die Entstehung einer Leukämie mehrere Mutationen auftreten müssen.

Evidenzen aus experimentellen Modellsystemen sprechen für die Hypothese, dass die akute myeloische Leukämie aus einer transformierten hämatopoetischen Vorläuferzelle entsteht. Nach diesem Konzept ist jeder Zelltyp innerhalb dieser Vorläuferzellen empfänglich für eine solche Transformation, was in abnormen Zellen unterschiedlichster Differenzierungsstadien resultiert. Diesem Model wird in der FAB-Klassifikation Rechnung getragen (siehe Tabelle 1) (Stock & Thirman, 2005).

Die AML kann sowohl durch verschiedene Chemotherapeutika als auch durch Strahlung induziert werden. Eine therapieinduzierte AML tritt typischerweise nach einer Schädigung durch Alkylantien mit einer Latenz von drei bis fünf Jahren auf. Zumeist ist die Leukämie mit einer vorangehenden myelodysplastischen Störung assoziiert. Die Latenzperiode spricht für die These, dass multiple Mutationen notwendig sind (Stock & Thirman, 2005). Daneben kann eine AML auch durch Topoisomerase II Inhibitoren induziert werden. Die Latenzzeit beträgt hier nur Monate (Rowley, 1994).

Die ionisierende Strahlung hat wie die Alkylantien einen schädigenden Effekt auf die DNA. Dieser Effekt entsteht vor allem durch die Induktion von Doppelstrangbrüchen, die zu Mutationen, Deletionen oder Translokationen führen können. So wurde eine erhöhte Inzidenz an Leukämien sowohl bei den Hiroshima- und Nagasaki-Überlebenden, als auch bei Radiologen festgestellt. Aber auch die Strahlen- und/oder Chemotherapie, wie z.B. bei der Therapie eines M.Hodgkin wurde mit einem erhöhten Auftreten von Leukämien in Verbindung gebracht. Eine zusätzliche Chemotherapie erhöht das Risiko weiter.

Auch die Exposition gegenüber organischen Substanzen wie Benzol ist mit einem erhöhten Leukämierisiko verbunden. Allerdings konnten neuere Studien zeigen, dass die Risikoerhöhung nur minimal ist. Es gibt jedoch genetische Veränderungen, die zusammen mit einer chemischen Exposition ein größeres Risiko darstellen.

Zusätzlich konnte in Tiermodellen eine Assoziation zwischen Retroviren (z.B.: HTLV-I) und der Entstehung einer Leukämie festgestellt werden. Diese Verbindung konnte allerdings für die AML bisher nicht gezeigt werden.

Außerdem sind verschiedene genetische Erkrankungen mit einem erhöhten Leukämierisiko assoziiert. Zu diesen Erkrankungen gehören das Down-Syndrom, eine Trisomie 8, sowie Erkrankungen mit einem Defekt in der DNA-Reparatur, wie das Bloom's Syndrom oder die Fanconi-Anämie (Stock & Thirman, 2005).

1.2 Regulation der Hämatopoese durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Die Hämatopoese ist ein komplexer Vorgang, bei der primitive Vorläuferzellen zunehmend differenzierte Zellen mit unterschiedlichsten Fähigkeiten hervorbringen. Dies kann nur über eine gut entwickelte Steuerung funktionieren. Die Kontrolle erfolgt über Wachstumsfaktoren und Zytokine, von denen einige an so genannten Rezeptortyrosinkinasen (RTK) binden (Reilly, 2002).

1.2.1 RTK

Das menschliche Genom enthält 90 Gene für Tyrosinkinasen, davon kodieren 58 Gene für transmembranöse Rezeptoren. Rezeptortyrosinkinasen (RTK) können in 20 Unterfamilien unterteilt werden, je nach Struktur ihrer Kinasedomäne sowie der extrazellulären Region.

Rezeptortyrosinkinasen der Klasse III spielen in der Hämatopoese eine besonders wichtige Rolle. Zu ihnen gehören sowohl FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3) als auch andere Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie KIT, PDGFR A/B und der CSF1R.

Rezeptortyrosinkinasen der Klasse III haben charakteristischerweise fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen (IgD) in der extrazellulären Region, an die Liganden binden, eine transmembranöse Region (TM), eine juxtamembranöse Domäne (JM), zwei intrazelluläre Kinasedomänen (TK1 und TK2), die von einer Kinase-Insertionsdomäne (KI) unterteilt werden, sowie eine C-terminale Domäne (siehe Abbildung 1).

Wenn ein Ligand an den Rezeptor bindet, kommt es zu einer Oligomerisierung und nachfolgend zu einer Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität, welche in einer Phosphorylierung von verschiedenen Tyrosinresten resultiert (siehe Abbildung 2). An den phosphorylierten Rezeptor binden dann spezielle intrazelluläre Signalmoleküle, die aktiviert werden und eine intrazelluläre Kaskade bis hin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Gang setzen (Reilly, 2002).



Abbildung 1: FLT3: Ig: Immunglobulin-Domäne; TM: Transmembranöse Region; JM: Juxtamembranöse Domäne; TK1, TK2: Tyrosinkinasedomänen 1 und 2 (Reilly, 2002)

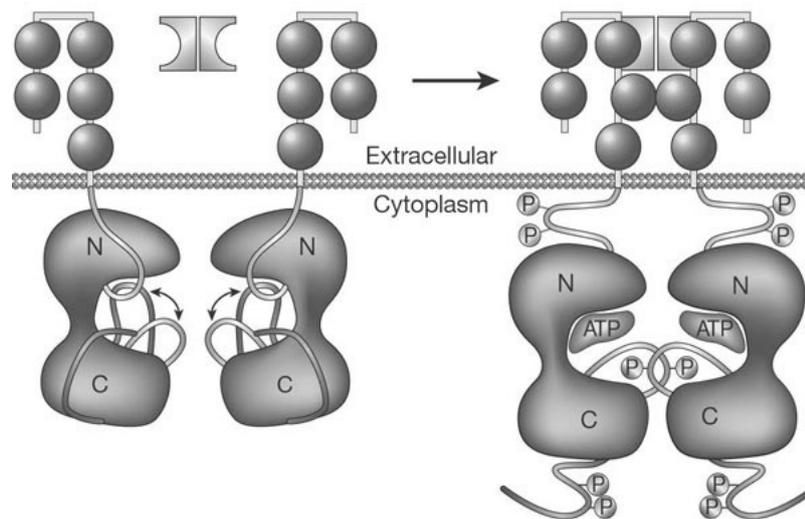


Abbildung 2: Aktivierungsmechanismus von Rezeptortyrosinkinasen:

Linke Seite: inaktive Konformation; Rechte Seite: Ligandeninduzierte Dimerisierung des Rezeptors und Tyrosin-Autophosphorylierung (Blume-Jensen & Hunter, 2001).

1.2.2 FLT3

FLT3 (CD135) wird auf pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Stammzellentwicklung und Differenzierung von Zellen. Dies wird vor allem durch Beobachtungen bei der Leukämieentstehung deutlich, wo FLT3 den am häufigsten mutierten Rezeptor darstellt.

1.2.3 Mutationen im FLT3-Gen

FLT3 Längenmutationen (FLT3-ITD) können in ungefähr 20-25% aller Fälle von AML gefunden werden. FLT3-ITD sind mit einer schlechten Prognose assoziiert; sie scheinen sogar den stärksten prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben in Patienten unter 60 Jahren unabhängig vom Karyotyp darzustellen (Kiyoi et al., 1999).

Die Mutationen werden durch interne Tandemduplikationen (ITD) der juxtamembranen Region (JM) verursacht (siehe Abbildung 1). Die Lokalisation bzw. Länge der Mutation kann von Fall zu Fall variieren. Als Folge der Mutation treten trotz Abwesenheit eines Liganden eine konstitutive Dimerisierung des Rezeptors sowie eine Autophosphorylierung von

spezifischen Tyrosinresten auf. Diese Mutation führt in vitro zu einer Aktivierung von Zielproteinen wie STAT5 und Ras, im Mausmodell konnte ein Myeloproliferatives Syndrom induziert werden (Kelly et al., 2002). In AML-Patienten wurde eine Assoziation zwischen FLT3-ITD und erhöhten Leukozytenzahlen bei Diagnosestellung gefunden (Reilly, 2002; Schnittger et al., 2000).

In ungefähr 7% aller Fälle von AML wird eine Mutation in der Aktivierungsschleife des Rezeptors gefunden (FLT3-TKD [Tyrosinkinasedomäne]). Die Mehrheit dieser Mutationen resultiert aus einer Substitution von Aspartat durch Histidin oder Tyrosin. Wie die ITD Mutationen führt auch die FLT3-TKD Mutation zu einer Aktivierung und Phosphorylierung des Rezeptors. Die Mutation tritt meist unabhängig von FLT3-ITD auf und hat keine signifikante Relation zur Leukozytenzahl. Bezüglich des Einflusses auf das rezidivfreie Überleben sind die Daten widersprüchlich (Schnittger et al., 2001; Yamamoto et al., 2001).

Obwohl immer angenommen wurde, dass sich die beiden Mutationsformen FLT3-ITD und FLT3-TKD gegenseitig ausschließen, tragen 1-2% der Patienten beide Mutationen. In ersten Studien konnte gezeigt werden, dass dies eine schlechtere Prognose zur Folge hat, als beide Mutationen für sich genommen (Karali et al., 2002; Moreno et al., 2003).

1.3 Therapiemöglichkeiten der AML

Unbehandelt führt die AML innerhalb von Wochen durch Infektionen oder Blutungen zum Tod der Patienten. Ziel ist daher, eine möglichst schnelle Wiederherstellung einer normalen Knochenmarkfunktion zu erreichen.

Mittels einer Induktionstherapie wird versucht, eine Reduktion der leukämischen Zellen unter ihre Nachweisgrenze zu erreichen. Es wird jedoch angenommen, dass es persistierende Zellen gibt, die als so genannte „minimal residual disease“ unentdeckt bleiben, aber zu einem Rezidiv führen können.

Die Postinduktions- oder Konsolidierungstherapie soll diese restlichen Zellen mit Hilfe von einem oder mehreren Zyklen Chemotherapie oder mit Hilfe einer Knochenmarktransplantation eradizieren (Larson, 2005).

In verschiedenen Therapieansätzen, wie dem einer intensiven Konsolidierungstherapie, einer Hochdosischemotherapie oder einer Radiochemotherapie mit nachfolgender

Knochenmarktransplantation wurde versucht, die Zellen der minimal residual disease zu eliminieren. Es konnte gezeigt werden, dass dies zwar einen Vorteil für jüngere Patienten, nicht jedoch für ältere darstellt (Tallman et al., 2005).

Abhängig vom Alter und vom Patientengut erreichen ungefähr 60% – 80% eine komplette Remission. Die Gesamtüberlebensrate beträgt allerdings nur 20-30%, bei älteren Patienten weniger als 10%, was gerade in Hinblick auf die am häufigsten betroffenen älteren Patienten eine Herausforderung an die Entwicklung neuer Therapiestrategien darstellt (Tallman et al., 2005).

Die Prognose der AML hängt von einer Reihe Faktoren ab: Zu diesen zählen das Alter, die Intensität der Postremissionstherapie und biologische Charakteristika, wie zytogenetische Merkmale, sowie Mutationen und Überexpression von verschiedenen Genen wie WT1, KIT und FLT3.

1.3.1 Konventionelle Chemotherapie

Zur Induktionstherapie wird ein Schema bestehend aus dem phasenspezifischen Zytostatikum Cytarabin (AraC) und dem nicht phasenspezifischen Daunorubicin benutzt. Daunorubicin gehört in die Familie der Anthracycline und wirkt über eine Interkalierung in die DNA. Cytarabin ist ein Pyrimidinantagonist, welcher über einen Einbau in Nukleinsäuren phasenspezifisch wirkt.

Zur Konsolidierung werden ein bis drei Blöcke einer Hochdosis-AraC enthaltenden Therapie eingesetzt, gefolgt von einer zyklischen Erhaltungstherapie. Alternativ wird bei ausgewählten Patienten eine allogene oder autologe Knochenmarktransplantation als Postremissionstherapie durchgeführt.

1.3.2 RTK-Inhibitoren

Durch die immer genaueren Kenntnisse über molekulare Vorgänge in der AML wurde eine neue Ära der Therapie der Leukämie eingeleitet, die zur Entwicklung spezifischer Agenzien wie z.B. Apoptose-Inhibitoren und Resistenz-Inhibitoren führte. Da FLT3 der Rezeptor ist, der in der AML am häufigsten Mutationen aufweist, wurde nach spezifischen Wirkstoffen zur seiner Inhibition gesucht: die FLT3-Inhibitoren.

Es gibt vier kleinmolekulare FLT3-Inhibitoren, die in klinischen Studien getestet werden: PKC-412, CEP-701, MLN518 und SU11248. Diese Inhibitoren wirken selektiv, jedoch nicht spezifisch auf FLT3-Rezeptoren, werden aber in der Regel gut toleriert. Erste Resultate zeigen ein hämatologisches Ansprechen bei 30-50% der Patienten. Die Wirkung besteht meist in einer transienten Reduktion von peripheren Blasten. Weniger häufig werden Blasten im Knochenmark reduziert. Patienten mit Mutationen von FLT3 scheinen besser auf die Therapie anzusprechen, als Patienten mit unverändertem (Wildtyp) Rezeptor. Ein großes Problem stellt allerdings die Entwicklung von primären und sekundären Resistenzen dar (Fiedler et al., 2005; Stone et al., 2005; Tallman et al., 2005).

1.3.4 Mechanismen der Zytostatika-Resistenz

Die klinische Resistenz gegenüber Zytostatika ist ein Hauptgrund sowohl für ein primäres Therapieversagen als auch für Rezidive in der AML. Unterschiedliche Mechanismen können hierfür verantwortlich sein: zum einen eine verminderte Bereitschaft der Zellen, als Antwort auf eine Noxe in Apoptose zu gehen, zum anderen Probleme der Substanzen, die Zellen zu erreichen, wie es z.B. bei Resistenzen durch fehlerhaften intrazellulären Transport der Medikamente der Fall ist. Ein anderer Faktor ist das Vorhandensein von transmembranösen Transportproteinen, welche Wirkstoffe aus der Zelle entfernen können und so zur Resistenzbildung führen (Ross, 2000). Resistenzen können durch die Expression von verschiedenen Genen entstehen, wie z.B. WT1, BCL-2, KIT und FLT3 (Tallman et al., 2005).

2. Zielsetzung der Arbeit

FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3) ist der am häufigsten mit Mutationen assoziierte Rezeptor in der akuten myeloischen Leukämie. Längenmutationen, die durch ITD Mutationen (internal tandem duplication) im Bereich der juxtamembranösen Region verursacht werden, kommen bei ungefähr 20% der Patienten vor. Mutationen im Bereich der Tyrosinkinasedomäne (TKD) können bei bis zu 8% der Patienten nachgewiesen werden. Vor allem die ITD Mutationen scheinen einen starken prognostischen Faktor darzustellen. Es wurde bisher davon ausgegangen, dass die beiden Mutationstypen exklusiv vorkommen. Allerdings tragen ungefähr 1-2% der Patienten beide Mutationen (FLT3-ITD-TKD). Die klinische Bedeutung dieser Beobachtung ist noch unklar. Erste Studien haben jedoch gezeigt, dass diese dualen Mutationen mit einer besonders schlechten Prognose verknüpft sind.

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass die schlechte Prognose, die mit diesen Mutationen assoziiert ist, nicht nur durch Resistenzen gegenüber PTK Inhibitoren bedingt ist, sondern darüber hinaus auch durch Resistenzen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika. Somit war es das Ziel dieser Arbeit, diese Resistenzentwicklungen gegenüber Zytostatika in vitro nachzuweisen.

Zum anderen sollten Mechanismen der Resistenzentstehung gegenüber PTK Inhibitoren und Zytostatika untersucht werden. Wenn möglich, sollten Möglichkeiten gefunden werden, um diese Resistenzen zu überwinden.

3. Material und Methoden

3.1 Reagentien und Zelllinien

3.1.1 Materialien für die Zellkultur

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

3.1.2 Lösungen, Puffer und Gele

| Material | Beschreibung | Bezugsquelle |
|---------------------------|--|------------------------------------|
| 2 % Agarosegel | 2 g Agarose, 100 ml 1x TBE | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 2x BBS | 280 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 50 mM BES; H ₂ O (bidest)ad 500 ml | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 1x Bio-Rad-Dye | Bio-Rad-Dye-Reagenz 1:5 mit H ₂ O verdünnt | Bio-Rad, Deutschland |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | Sigma, Deutschland |
| 10x Elektrophorese-Puffer | 30 g Tris; 144 g Glycin; 800 ml H ₂ O; 10 g SDS (Natriumdodecylsulfat) | Chemikalien von Sigma, Deutschland |

| | | |
|-------------------|--|--|
| 1x G-NET | 2,5 g Gelatine in 100 ml 10x NET gelöst und aufgeköcht und H ₂ O ad 1 l | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| HEPES-Puffer | 50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 0.1 % Triton X-100; 10 % Glycerol | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 4x HNTG-Puffer | 200 mM HEPES pH 7,5; 600 mM NaCl; 0,4 % Triton X-100; 40 % Glycerol | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| Lämmli-Puffer | 187,5 mM Tris; 6 % SDS; 30 % Glyzerin; Bromphenolblau | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| Lämmli-DTT-Puffer | 2,5 ml Lämmli-Puffer; 0,6 g DTT (Dithiothreitol) | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 10x NET | 1,5 M NaCl; 0,05 M EDTA pH 8; 0,5 M Tris pH 7,5; 0,5 % Triton X-100 | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| Ponceau-Rot | 1 g Ponceau S in 500ml 2 % Trichloressigsäure gelöst | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| RIPA-Puffer | 0,5 M Tris-HCl pH 7,4; 2,5 % Deoxycholat; 1,5 M NaCl; 10 mM EGTA pH 7; 1 ml NP-40; 100 mM PMSF; 100 mM Orthovanadat (Na ₃ VO ₄); 1 mg/ml Aprotinin; 1 mg/ml Leupeptin; 0,1 mg/ml Pepstatin; 100 mM NaF; H ₂ O | Chemikalien von Sigma und Fluka, Deutschland |
| 4% Sammelgel | 6,1 ml H ₂ O; 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 ohne SDS; 1,3 ml Acrylamid (Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8) 100 µl 10 % SDS; 50 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat); 10 µl TEMED (N',N',N',N'-Tetramethyldiamin) | Chemikalien von Sigma und Roth, Deutschland |
| Strippinglösung | 800 ml 3xTBS-T; 20 ml Mercapthoethanol; 200 ml 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat) | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 5x TBE | 54 g Tris; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; H ₂ O (Millipore) ad 1l | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 10x TBS | 10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 1x TBS-T | 100ml 10x TBS; 15ml Tween 20; H ₂ O ad 1 l | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 3x TBS-T | 300ml 10x TBS; 15ml Tween 20; H ₂ O ad 1l | Chemikalien von Sigma, Deutschland |

| | | |
|------------------|---|------------------------------------|
| Transfektionsmix | 300 µl 2xBBS; 30 µl CaCl ₂ 2,5M; 6 µl DNA (1µg/µl); H ₂ O ad 600 µl | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 10x Transblot | 72,75 g Tris; 36,63 g Glycin; 0,475 g SDS | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 1x Transblot | 10x Transblot 1:10 mit Methanol 20% | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 15% Trenngel | 2 g Saccharose; 3,3 ml H ₂ O; 11,3 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 15 ml Acrylamid; 150 µl 20 % SDS; 100 µl 10 % APS und 3 µl TEMED | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 12,5% Trenngel | 2 g Saccharose; 2,9 ml H ₂ O; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 6,25 ml Acrylamid; 75 µl 20 % SDS, 50 µl 10 % APS und 1,5 µl TEMED | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| 7,5% Trenngel | 5,4 ml H ₂ O; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 3,75ml Acrylamid; 75 µl 20 % SDS, 50 µl 10 % APS und 1,5 µl TEMED | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| Tris-HCl pH 8,8 | 1,5 M Tris; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt | Chemikalien von Sigma, Deutschland |
| Tris-HCl pH 6,8 | 1,5 M Tris; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt | Chemikalien von Sigma, Deutschland |

3.1.3 Zelllinien

Sämtliche Zelllinien wurden von der DSMZ (deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) erworben. **Ba/F3 Zellen** sind murine Pro-B-Zellen, entnommen aus dem peripheren Blut, die IL3 abhängig sind und in Suspension wachsen.

293HEK-Zellen sind humane embryonale Fibroblasten der Niere, die adhärent wachsen.

3.1.4 PTK Inhibitoren und konventionelle Chemotherapeutika

Der PTK Inhibitor SU5614 wurde von Calbiochem (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland) bezogen. Der PTK Inhibitor PKC412 wurde uns freundlicherweise von Novartis Pharma AG (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Daunorubicin und Rapamycin wurden von Sigma (Deutschland) erworben.

3.1.5 Antikörper

| Antikörper | Bezugsquelle |
|---------------------------|---|
| Anti-phospho-STAT5-Tyr694 | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland |
| Anti-RAD51 | New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland |
| Anti-STAT5 | Sc-835, Santa Cruz |
| Anti-bcl-xL | Sc-8392, Santa Cruz |
| Anti-β-actin | A-5441, Sigma |

3.1.6 Kits

Annexin V/Propidium Iodide (PI) kit (Alexis, Lausen, Schweiz)

Bio-rad Protein estimation kit (Bio-rad, München, Deutschland)

Detection system ECL® (enhanced chemiluminescence) (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland)

Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Deutschland)

Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Deutschland)

QIAprep-spin Miniprep Kit (Qiagen, Deutschland)

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland)

3.2 Methoden in der Zellkultur

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter Laminar-Flow-Sterilbänken durchgeführt. Medien und Zusätze wurden gekühlt aufbewahrt und vor Verwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.2.1 Kultivierung

Alle Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂, Wasserdampfsättigung sowie je nach experimentellem Ansatz in Gegenwart von IL3 kultiviert. Beim Mediumwechsel, der in Abhängigkeit von der Zelldichte, in der Regel aber alle zwei bis drei Tage durchgeführt wurde, wurden in Suspension wachsende Zellen fünf Minuten bei 1000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in neuem Kulturmedium aufgenommen und in Abhängigkeit von der Zelldichte in verschiedenem Verhältnis (1:2 – 1:10) gesplittet. Adhärente Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und resuspendiert.

Zur Kultivierung von IL3 abhängigen Zelllinien wurde entweder ein mit WEHI versetztes Medium oder im Rahmen von Experimenten rekombinates IL3 (Biosource International, Camarillo, CA, USA) verwendet. Für die Gewinnung von WEHI-Überständen wurden WEHI-Zellen kultiviert, das konditionierte Medium abgenommen und abzentrifugiert. Die Überstände wurden sterifiltriert und eingefroren.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach Abzentrifugieren der Zellen und Aufnahme von je 10^7 in Einfriermedium (90% FBS und 10% DMSO) wurden die Zellen in einem Freezing-Container bei -80°C eingefroren und nach ca. 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt, in Medium resuspendiert, abzentrifugiert, erneut resuspendiert und anschließend wie oben beschrieben kultiviert.

3.2.3 Proliferationsassays

Die Zellen wurden in einer Dichte von $4 \times 10^4/\text{ml}$ Wachstumsmedium RPMI 1640 mit 10% FBS ausgesät. Je nach Experiment wurde IL3, ein Inhibitor oder Daunorubicin hinzugegeben. Nach 24, 48 sowie 72 Stunden wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und in einer Standard-Neubauer-Zählkammer unter einem Durchlichtmikroskop nach Ausschlußmethode gezählt.

3.2.4 FACS-Durchflußzytometrie

Die FACS-Durchflußzytometrie wurde unter anderem zur Überprüfung des Verhältnisses bei Mischversuchen sowie zur Apoptosemessung und Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür in FACS-Röhrchen (mind. 1×10^5 Zellen) abzentrifugiert, in PBS mit 2% FCS resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Die Zellen konnten dann nach einmaliger Wiederholung dieses Waschschrilles in 1ml PBS aufgenommen und in einem Durchflußzytometer (FACSscan, Beckton Dickinson, Mountain Views, CA) gemessen werden.

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

Die Bestimmung von apoptotischen Zellen erfolgte durch die Färbung mit Annexin V sowie 7-Aminoactinomycin (7AAD), was eine Unterscheidung in vitale, früh- und spätapoptotische Zellen zulässt. Die Zellen wurden nach Behandlung mit Daunorubicin bzw. SU5614 dem Herstellerprotokoll entsprechend gefärbt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in einer Menge von 10^6 /ml Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Portionen von 100 μ l aliquotiert, mit je 5 μ l der Annexin V-PE bzw. der 7AAD Präparationen gefärbt, bei Raumtemperatur 15 Minuten mittels Vortex gemischt und anschließend mit 400 μ l Puffer versetzt. Danach konnte der Grad der Apoptose durchflußzytometrisch gemessen werden.

3.2.6 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Kernfärbung

Bei der Zellzyklusanalyse wurde der DNA-Gehalt der Zellkerne mittels Propidiumjodidfärbung nach dem Protokoll von Buske et al. bestimmt (Buske et al., 1997). Die Zellen wurden den Proliferations- und Apoptoseassays entsprechend mit dem angegebenen Inhibitor inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend in einem speziellen PI-Lysispuffer (0.1% Natriumcitrat; 0,1% Triton X-100; 20 μ g/ml Propidiumjodid, pH 8) resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für ca. fünf Minuten konnte der DNA-Gehalt mittels Durchflußzytometrie gemessen werden.

3.2.7 Transiente Transfektion von BOSC23-Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die BOSC23-Zellen in einer Dichte von 1×10^5 /ml in Schalen mit einem Durchmesser von 10cm ausgesät. Die Transfektion wurde dann mit der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode durchgeführt. Es wurden 6 μ g DNA pro Schale verwendet. 18 Stunden nach der Transfektion wurden 3ml neues Medium hinzugegeben und nach weiteren 30 Stunden konnte der retrovirale Überstand verwendet werden, um Ba/F3 Zellen zu transduzieren.

3.2.8 Transduktion von Ba/F3 Zellen

Ba/F3-Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 /ml in 200 μ l Wachstumsmedium (RPMI 1640) ausgesät und anschließend einmalig mit 200 μ l des retroviralen Überstandes in Gegenwart

von Polybrene (8µg/ml) transduziert. Um eine toxische Wirkung von Polybrene auf die Zellen zu vermeiden, wurde nach vier bis zwölf Stunden 1ml Medium hinzugefügt.

Nach 48-72 Stunden konnten die EGFP/EYFP (Expressionsvektor) positiven Zellen dann mit Hilfe eines Zellsortiergerätes isoliert werden.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Proteinisolation

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen, in RIPA-Puffer aufgenommen und für 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die dadurch gewonnenen Lysate wurden 20 Minuten bei 4°C bei 13200rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, und die Überstände wurden direkt verwendet bzw. bei -20°C gelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Der Proteingehalt der Lysate wurde mit Hilfe eines Bradford-Reagenz (Bio-Rad-Dye, Bio-Rad, Deutschland) photometrisch bestimmt. Hierfür wurde das Reagenz 1:5 mit H₂O verdünnt und filtriert. Dann wurden 20µl der Proteinprobe zu 980µl des verdünnten Reagenz gegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Absorption bei 595nm bestimmt werden. Als Referenzwert diente hierbei das Reagenz. Die Proteinkonzentration konnte dann mit Hilfe einer Standardkurve, die durch eine aus einer BSA-Stammlösung erstellten Verdünnungsreihe ermittelt wurde, bestimmt werden. Für die Auswertung wurde die Absorption gegen die Proteinkonzentration aufgetragen.

3.3.3 SDS-PAGE

Im Western-Blot können die durch eine SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Die SDS-PAGE wurde in vertikalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurden 4%ige Sammelgele sowie 15%ige Polyacrylamid-Trenngele und 7,5-12,5%ige Polyacrylamid-Gradienten-Trenngele verwendet. Die Trenngele wurden nach dem Gießen mit destilliertem Wasser beschichtet. Nach der Polymerisation konnte das Wasser abgenommen und das Sammelgel hinzugegeben werden. Gleichzeitig wurde ein Gelkamm eingelegt. Von den zu untersuchenden Proteinen

wurden Lysate mit gleichem Proteingehalt (15-100µg) mit gleichen Volumina von Lämmli-DDT-Puffer versetzt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C denaturiert, in einer Tischzentrifuge für eine Minute bei 9000rpm abzentrifugiert und in die präparierten Geltaschen pipettiert. Die Geltaschen wurden mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zwei Molekulargewichtsmarker (LMW, low molecular weight calibration kit, Amersham, England; high molecular weight standard broad range, Bio-Rad, Deutschland) wurden als Größenreferenz für die Proteinbestimmung verwendet. Die Elektrophorese erfolgte nun bei 20 bis 32mA über 12 bis 18 Stunden, bis die Lauffront des im Lämmli-DDT-Puffer enthaltenen Bromphenolblaumarkers das Ende des Trenngels erreicht hatte.

3.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Der Transfer der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einem semi-dry Verfahren (modifizierter Western-Blot nach Towbin). Eine Nitrozellulosemembran (Protran, Porengröße 0,45µm, Schleicher&Schüll, Deutschland) sowie drei Blottingpapiere (Schleicher&Schüll, Deutschland) in Größe des Gels wurden mit Transblottpuffer getränkt und übereinander auf die Anode der Semi-Dry Elektrophorese Transferkammer platziert. Auf die Nitrozellulosemembran wurden dann das Gel und drei weitere ebenfalls getränkte Blottingpapiere gelegt. Darüber wurde die Kathode angeordnet, und der Proteintransfer aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran wurde bei 250mA über drei Stunden durchgeführt. Die Membran wurde anschließend mit destilliertem Wasser gespült und die Proteine mittels Inkubation mit Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt. Die Molekulargewichtstandards konnten so markiert werden. Hierauf wurde die reversible Färbung durch eine Waschung in G-NET über 20 Minuten wieder entfernt.

3.3.5 Detektion mit Antikörpern

Mittels Inkubation der Nitrozellulosemembran in G-NET bei 4°C über zwölf Stunden wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Für die Detektion erfolgte eine Inkubation der Nitrozellulosemembran auf einem Kippschüttler für zwölf Stunden mit einem zuvor mit G-NET 1:1000 verdünnten Kaninchen- oder Maus-Primärantikörper. Die Membran wurde dann dreimal mit 1xTBE für je 15 Minuten gewaschen und anschließend für eine Stunde mit einem an HRPO (horse radish peroxidase) gekoppelten Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert. Hierauf erfolgte ein dreimaliges Waschen mit TBS-T für 15 Minuten sowie ein einmaliges Waschen mit PBS für fünf Minuten.

3.3.6 Detektion der Antikörper mittels ECL-Verfahren

Ein ECL-Kit (enhanced chemiluminescence Kit, Amersham, England) wurde verwendet, um die Antikörper zu detektieren. Dieses Verfahren beruht auf der Fähigkeit dieser Reagenzien, mit HRPO eine Chemolumineszenz zu erzeugen, die detektiert werden kann. Hierzu wurde die Membran für eine Minute mit den Reagenzien inkubiert und anschließend in Klarsichtfolie verpackt. Mit dieser Membran wurde dann ein Röntgenfilm bis zu 60 Minuten belichtet. Der Film wurde automatisch in einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

3.3.7 Stripping der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend von den Antikörpern gereinigt, indem sie zweimal für je 15 Minuten bei 65°C mit Strippinglösung inkubiert und 30 Minuten mit 3xTBS-T gewaschen wurde. Zum Nachweis gleicher Proteinmengen konnte anschließend ein zweites Mal mit einem Anti-Tubulin-Antikörper detektiert werden.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 DNA-Konstrukte und Vektoren

Das FLT3-ITD-W51 Konstrukt enthält sieben Aminosäuren als Duplikat (REYEYDL), die zwischen Aminosäure 611 und 612 des humanen FLT3-Wildtyps inserieren. Das FLT3-ITD-NPOS Konstrukt enthält eine 28 Aminosäuren lange Sequenz (CSSDNEYFYD FREYEYDLKWEFPRENL), die als Duplikat zwischen Aminosäure 583 und 610 des humanen FLT3-Wildtyps eingefügt wurde. Beide Konstrukte wurden uns freundlicherweise von D.G. Gilliland, Howard Hughes Medical Institute und Brigham and Women's Hospital, Harvard Institutes of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA zur Verfügung gestellt.

Das Umklonieren aller FLT3-Konstrukte wurde mit Hilfe des retroviralen MSCV-IRES-EYFP/EGFP-Expressionsvektors durchgeführt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R.K. Humphries, The Terry Fox Laboratory, Vancouver, University of British Columbia). Bei diesem Vektor ist eine Translation des EYFP/EGFP und des Konstruktes vom selben Transkript möglich.

Das Bcl-x(L)- Konstrukt wurde uns freundlicherweise von S.J. Korsmeyer (Howard Hughes Medical Institute, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA) zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Eine definierte Menge an Agarose wurde zu einer abgemessenen Menge an Elektrophoresepuffer (1xTBE) gegeben und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Dann wurde die Mischung auf ca. 50°C abgekühlt und in die Gelkammer gegossen. Nach 30-40 Minuten war das Gel fest und wurde mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Nun konnten die Proben in die vorgesehenen Taschen gegeben werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 15-20 Minuten in Ethidiumbromid gefärbt und unter einer UV-Lampe detektiert.

3.4.3 RNA-Präparation und RNA-Quantifizierung

Die RNA-Präparation wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. 1×10^7 Zellen wurden mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und in Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurde die so extrahierte RNA in 50µl RNase freiem Wasser aufgenommen.

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurden 10µl der zu messenden DNA zu 980µl RNase freiem Wasser gegeben. Dann wurde die Absorption mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

3.4.4 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA wurde mittels reverser Transkriptase durchgeführt. 20µl präparierter RNA wurden bei 70°C für zehn Minuten denaturiert und zu folgendem Ansatz gegeben: 8µl 5x Erststrangpuffer (Gibco Katalog-Nr.: 18064), 1,5µl Superscript RNase H Reverse Transcriptase (Gibco Katalog-Nr.: 18064), 4µl 100mM DTT (Gibco Katalog-Nr.: 18064), 3,5µl 100mM dNTP mix (Gibco Katalog-Nr.: 10297-018), 2µl (3µg/µl) Random Primer (Gibco Katalog-Nr.: 48190-011), 1µl rekombinanter Rnase Ribonuclease Inhibitor (Promega Katalog-Nr.: N2511). Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 70 Minuten bei 37°C sowie für fünf Minuten bei 95°C. Die Proben konnten anschließend eingefroren werden.

3.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion wurde die zu untersuchende cDNA in einem PCR-Thermocycler amplifiziert. Der PCR-Ansatz bestand aus der zu amplifizierenden DNA, den

spezifischen Primern, sowie 10xPCR-Puffer, 25mM MgCl₂ und dNTP. Das Standard-PCR-Programm umfasste:

| | |
|----------------|--------------|
| 94°C 2 Minuten | |
| 94°C 1 Minute | 35-40 Zyklen |
| 58°C 1 Minute | |
| 72°C 1 Minute | |
| 72°C 7 Minuten | |
| 4°C ∞ | |

Bei jeder PCR wurde ein PCR-Ansatz ohne cDNA als Negativkontrolle verwendet. Nach der PCR wurden 5µl jedes Amplifikationsproduktes in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und zur Darstellung unter UV-Licht mit Ethidiumbromid gefärbt. Zum Größenvergleich wurde eine 100bp DNA Leiter mitgeführt.

3.4.6 In vitro-Mutagenese

Die In-Vitro-Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Hierbei wurden in einem PCR-basierten Verfahren FLT3-D835Y/N und FLT3-V592A Punktmutationen in FLT3-Wildtyp, FLT3-V592A, FLT3-ITD-W51 sowie in die FLT3-ITD-NPOS Konstrukte eingefügt.

Die **Mutagenese-Reaktion** umfasste die DNA, die jeweiligen Primer, 10xPCR-Puffer, dNTP und die Quik-Lösung.

Die **Mutagenese-Primer** wurden so entwickelt, dass sie zwischen 25 und 40 Basen umfassten und die gewünschte Mutation ungefähr in der Mitte lag:

FLT3 D835Y

5'-GACTTTGGATTGGCTCGAT**AT**ATCATGAGTGATTCCAACC -3'

FLT3 D835N

5'- GACTTTGGATTGGCTCGAA**AT**ATCATGAGTGATTCCAACC -3'

Folgende **Cycling-Parameter** wurden benutzt:

| | |
|----------------|----------|
| 94°C 2 Minuten | Hotstart |
| 80°C 1 Minute | |

| | |
|---------------|----------|
| 94°C 1 Minute | 4 Zyklen |
| 56°C 1 Minute | |
| 72°C 1 Minute | |

| | |
|---------------|-----------|
| 94°C 1 Minute | 14 Zyklen |
| 58°C 1 Minute | |
| 72°C 1 Minute | |

| |
|----------------|
| 72°C 7 Minuten |
| 4°C ∞ |

3.4.7 Nukleotidsequenzierung

Um die korrekte Sequenz der erhaltenen Konstrukte zu überprüfen, wurden Nukleotidsequenzierungen gemacht. Diese Sequenzierungen wurden durch die Firma Sequi-Lab (Deutschland) durchgeführt.

Primer zur Sequenzierung von FLT3

- **pMSCV** 5'- CCCTTGAACCTCCTCGTTTCG-3' 1-260bp von FLT3
- **FLT3-2** 5'-AAGACCTCGGGTGTGCGTTG-3' 260-600
- **FLT3-3** 5'-ACGCCCTGGTCTGCATATC-3' 600-940
- **FLT3 843F** 5'- CGGGCTCACCTGGGAATTAG-3' 940-1280
- **FLT3-5** 5'-TTTGCAATCATAAGCACCAGC- 3' 1280-1620
- **FLT3-6** 5'-ATACAATTCCCTTGGCACATC-3' 1620-1960
- **FLT3-7** 5'-AACGGAGTCTCAATCCAGG-3' 1960-2300
- **FLT3 2205F** 5'-CAGCATGCCTGGTTCAAGAG-3' 2300-2640
- **FLT3-9** 5'-AGGCATCTACACCATTAAGAG-3' 2640-2980

3.5 Elektronische Datenverarbeitung/Software

- Cellquest Software (Bekton Dickison, Mountain View, CA)
- Winmdi 3.2
- BioEdit
- Tina 2.09
- Microsoft Word, Excel, Powerpoint, Photoshop
- Adobe Illustrator
- Adobe Photoshop

4. Ergebnisse

4.1 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten haben eine erhöhte Resistenz gegenüber dem FLT3-PTK Inhibitor SU5614

Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne von Rezeptortyrosinkinasen können zur Resistenz gegenüber PTK-Inhibitoren führen. Dies wurde vor allem für Mutationen bei BCR-ABL festgestellt (Gorre et al., 2001; von Bubnoff et al., 2002). Jedoch konnte dieses Phänomen auch bei FLT3 beobachtet werden, unter anderem bei FLT3-ITD dualen Mutanten. Diese Mutanten waren durch eine kontinuierliche Exposition von FLT3-ITD exprimierenden Ba/F3 Zellen gegenüber ansteigenden Konzentrationen des FLT3-PTK Inhibitors SU5614 generiert worden (Bagrintseva et al., 2004).

FLT3-ITD-TKD duale Mutanten weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem FLT3-PTK Inhibitor SU5614 auf (IC_{50} ist >10-fach gegenüber der Mutterzelllinie FLT3-ITD erhöht), was sowohl in Proliferations- als auch in Apoptoseassays gezeigt werden konnte (Bagrintseva et al., 2004).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Resistenz gegenüber FLT3-PTK Inhibitoren auf Zellen beschränkt ist, bei denen die FLT3-ITD-TKD Mutation auf demselben „Allel“ (Plasmid) lokalisiert ist. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Proliferationsassays mit FLT3-ITD-D835N und FLT3-ITD-D835Y (beide Zelllinien haben die Mutation auf demselben „Allel“) sowie mit FLT3-ITD/D835N und FLT3-ITD/WT (welche die Mutationen auf verschiedenen „Allelen“ tragen) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Inhibitors SU5614 durchgeführt (Bagrintseva, 2005).

4.1.2 Der Einfluß der Struktur der Längenmutationen auf die Sensitivität gegenüber PTK Inhibitoren

Um die Mechanismen der Resistenz gegenüber PTK Inhibitoren weiter zu analysieren, wurde in einer früheren Arbeit (Bagrintseva, 2005) untersucht, ob strukturell unterschiedliche Längenmutationen in der juxtamembranösen Region zu unterschiedlicher Sensitivität gegenüber dem PTK Inhibitor SU5614 führen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Ba/F3 Zellen generiert, zum einen transformiert mit V592A-D835N und zum anderen mit FLT3-NPOS-D835N. V592A repräsentiert die erste aktivierende Punktmutation in der juxtamembranösen Region von FLT3 und wurde in zwei AML-Zelllinien, MonoMac1 und MonoMac6 nachgewiesen (Spiekermann et al., 2003b; Stirewalt et al., 2004). Die FLT3-ITD-

NPOS Mutanten enthalten eine 28 Aminosäuren lange Sequenz als Duplikat, die zwischen Aminosäure 611 und 612 inseriert ist, im Gegensatz zu den FLT3-ITD-W51 Mutanten, die nur eine sieben Aminosäuren lange Sequenz als Duplikat zwischen Aminosäure 601 und 602 enthalten (Kelly et al., 2002).

Im Rahmen von Proliferationsassays konnte damals gezeigt werden, dass all diese dualen Mutanten, also auch in Zusammenhang mit NPOS sowie V592A, eine partielle Resistenz gegenüber SU5614 zeigen, jedoch zu einem unterschiedlichen Grad ($IC_{50}=0,3\mu M$ für V592-D835N, $0,4\mu M$ für NPOS und NPOS/W51 und $1\mu M$ für NPOS-D835N).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob FLT3-Längenmutationen eine Resistenz gegenüber FLT3 PTK Inhibitoren und zytotoxischen Substanzen induzieren können. In Analogie zu BCR-ABL Genamplifikationen, die Imatinib-Resistenzen induzieren, sollte die genomische Amplifikation von FLT3-ITD durch Transduktion mit 1x, 2x oder 3x ITD-Konstrukten initiiert werden. Es wurden daher Zellen generiert, die neben einer NPOS-Insertion noch eine bzw. zwei weitere NPOS-Insertionen haben. In Gegenwart von SU5614 wurden Apoptoseassays durchgeführt. Die Zellen mit nur einer NPOS-Insertion gingen im Vergleich zu den Zellen mit zwei oder drei Insertionen schneller in Apoptose (siehe Abbildung 3 und Tabelle 3).

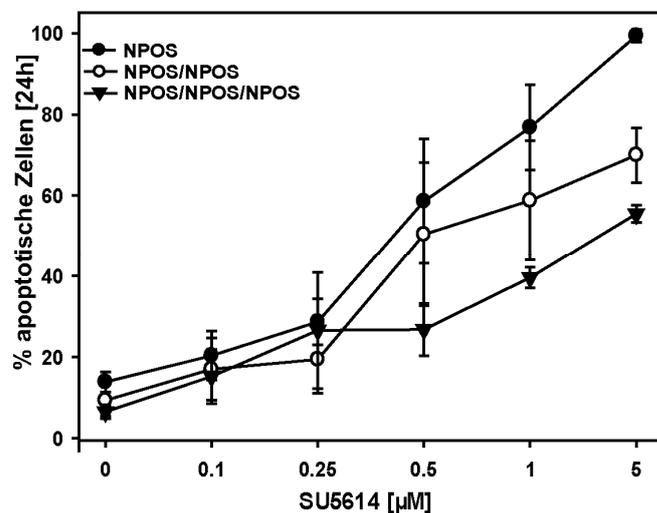


Abbildung 3: Apoptoseassay nach Inkubation mit SU5614: Ba/F3 FLT3-NPOS, FLT3-NPOS-NPOS sowie FLT3-NPOS-NPOS-NPOS Zellen wurden für 24 Stunden verschiedenen Konzentrationen von SU5614 ausgesetzt. Anschließend wurde die Apoptose nach Färbung mit Annexin V-PE und 7-AAD durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

| SU5614 (μM) | | |
|--------------------------|------------------|------------------|
| Zelllinie | IC ₅₀ | IC ₈₀ |
| FLT3-NPOS | 0,4 | 1,5 |
| FLT3-NPOS-NPOS | 0,5 | n.m. |
| FLT3-NPOS-NPOS-NPOS | 3 | n.m. |

Tabelle 3: IC₅₀ und IC₈₀ bei Apoptose nach Inkubation mit SU5614; n.m.: nicht messbar, d.h. Wert wurde nicht erreicht.

4.2. FLT3-ITD-TKD duale Mutanten zeigen eine partielle Resistenz gegenüber Daunorubicin

4.2.1 Erhöhte Resistenz gegenüber Daunorubicin in Proliferations-/Apoptoseassays

Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, definieren FLT3-ITD Mutationen eine Gruppe von Patienten mit Hochrisiko (Abu-Duhier et al., 2000) und sind wie ein Verlust des FLT3-WT Allels (Whitman et al., 2001) mit einer schlechten Prognose assoziiert. Nach der heutigen Datenlage haben Patienten mit FLT3-ITD-TKD dualen Mutationen im Vergleich zu anderen Mutationen des FLT3-Gens, wie ITD Mutationen, eine noch schlechtere Prognose (Karali et al., 2002; Moreno et al., 2003).

Um festzustellen, ob Resistenzentwicklungen hierbei eine Rolle spielen könnten, wurde die Sensitivität dieser Zellen gegenüber dem Zytostatikum Daunorubicin *in vitro* untersucht. Hierfür wurden sowohl Proliferations- als auch Apoptoseassays in der Gegenwart von Daunorubicin durchgeführt. Die Ergebnisse in den Proliferationsassays zeigen, dass Ba/F3 FLT3-ITD-D835Y/N eine fünffach erhöhte Resistenz im Vergleich zu FLT3-ITD gegenüber Daunorubicin aufweisen (siehe Abbildung 4 und Tabelle 4). Dies konnte in Apoptoseassays bestätigt werden (siehe Tabelle 4).

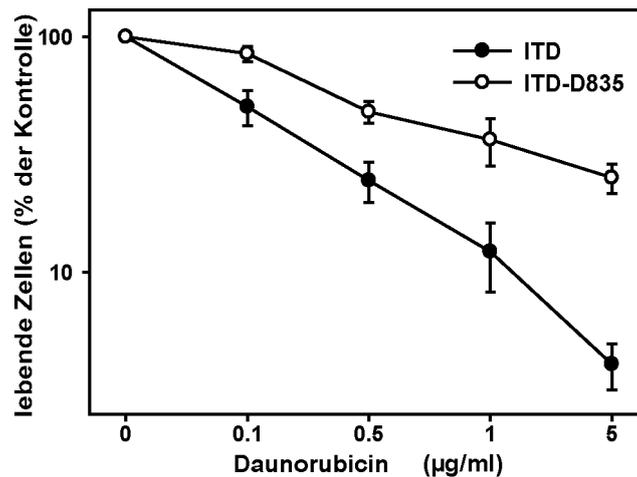


Abbildung 4: Proliferationsassay in Gegenwart von Daunorubicin: Ba/F3 FLT3-ITD und FLT3-ITD-D835Y wurden für 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Daunorubicin inkubiert, zweimal gewaschen und in einer Dichte von 1×10^5 /ml ausgesät. Nach 20 Stunden wurden die lebenden vitalen Zellen mittels Trypanblauausschluß gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

| IC ₅₀ | Proliferationsassay | | Apoptoseassay | |
|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|--|
| | Zelllinie | Daunorubicin (µg/ml) | Daunorubicin (µg/ml) | |
| | FLT3-ITD | 0,0035 | 0,1 | |
| | FLT3-ITD-D835N/Y | 0,018 | 0,5 | |

Tabelle 4: IC₅₀ von Daunorubicin in FLT3-ITD und FLT3 ITD-TKD Zelllinien

4.2.2 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten haben in Gegenwart von Daunorubicin einen kompetitiven Wachstumsvorteil

Mittels Mischversuchen konnte gezeigt werden, dass die dualen Mutanten in der Gegenwart von SU5614 einen klaren kompetitiven Überlebensvorteil hatten (Bagrintseva et al., 2004). Duale FLT3-ITD-D835N/Y (YFP+) und FLT3-ITD Mutanten (GFP+) wurden in einem Verhältnis von 1:10 in Gegenwart von 0,2µM SU5614 kultiviert. Durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Expressionsvektoren (GFP und YFP) war es möglich, das Verhältnis durchflußzytometrisch zu bestimmen. Interessanterweise zeigte sich dieser Überlebensvorteil in Gegenwart, nicht aber in Abwesenheit von SU5614.

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob dieses Phänomen auch in Gegenwart von Daunorubicin auftritt. Hierzu wurden den Mischversuchen mit SU5614 entsprechend FLT3-ITD-TKD duale Mutanten und FLT3-ITD Mutanten im Verhältnis 1:10 in der Gegenwart einer subtoxischen Konzentration von Daunorubicin (0.01µg/ml) kultiviert. Das Verhältnis von GFP/YFP exprimierenden Zellen wurde alle drei bis vier Tage durchflußzytometrisch bestimmt. Auch hier zeigte sich bei den Messungen, dass FLT3-ITD-TKD duale Mutanten gegenüber FLT3-ITD Mutanten einen kompetitiven Überlebensvorteil besitzen. Das Verhältnis hatte sich nach durchschnittlich 20 Tagen umgekehrt (siehe Abbildung 5).

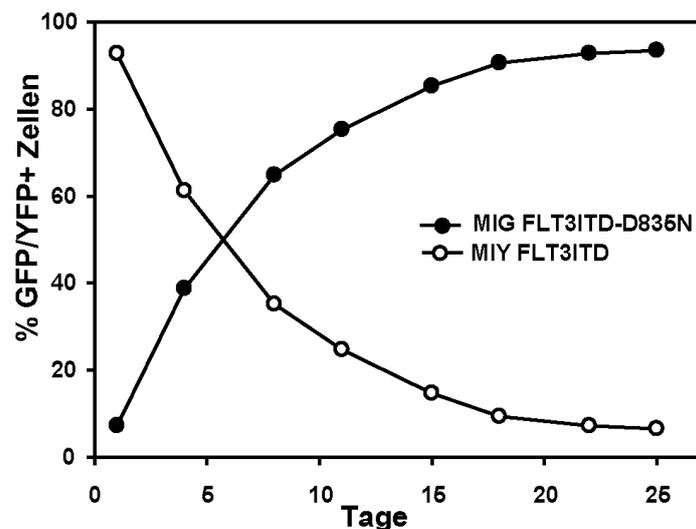


Abbildung 5: Mischversuch in Gegenwart von Daunorubicin: Ba/F3 FLT3-ITD-D836N (YFP) und FLT3-ITD (GFP) wurden im Verhältnis 1:10 gemischt und in Gegenwart von Daunorubicin (0.01µg/ml) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Verhältnis MIY/MIG durchflußzytometrisch bestimmt.

4.2.3 Die genomische Amplifikation von FLT3-ITD zeigt nur geringen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Daunorubicin

Im Weiteren wurden in Anlehnung an die BCR-ABL Genamplifikationen, die Resistenzen gegenüber Imatinib induzieren, auch die Amplifikationen von FLT3-ITD (1x, 2x und 3x NPOS) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Daunorubicin überprüft. Hierzu wurden Zellen generiert, die neben einer NPOS-Insertion noch eine bzw. zwei weitere NPOS-Insertionen haben. Es zeigten sich sowohl in den Proliferationsassays (Daten ohne Abbildung) als auch in den Apoptosemessungen (siehe Abbildung 6 und Tabelle 5) Unterschiede, die allerdings nur zwischen FLT3-NPOS und jeweils FLT3-NPOS-NPOS bzw. FLT3-NPOS-NPOS-NPOS erkennbar waren.

Mischversuche, die analog zu den Mischversuchen der FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten mit SU5614 sowie Daunorubicin durchgeführt wurden, konnten keinen Selektionsvorteil einer der Zelllinien zeigen (Daten ohne Abbildung).

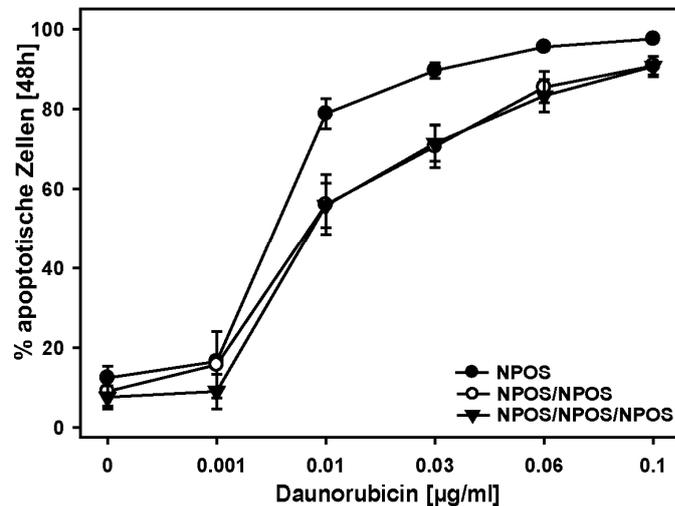


Abbildung 6: Apoptoseassay nach Inkubation mit Daunorubicin: Ba/F3 FLT3-NPOS, FLT3-NPOS-NPOS sowie FLT3-NPOS-NPOS-NPOS Zellen wurden für 48 Stunden verschiedenen Konzentrationen von Daunorubicin ausgesetzt. Dann wurde die Apoptose nach Färbung mit Annexin V-PE und 7-AAD durchflußzytometrisch gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

| Zelllinie | Daunorubicin (ng/ml) | |
|---------------------|----------------------|------------------|
| | IC ₅₀ | IC ₈₀ |
| FLT3-NPOS | 3,5 | 10 |
| FLT3-NPOS-NPOS | 7,5 | 50 |
| FLT3-NPOS-NPOS-NPOS | 7,5 | 50 |

Tabelle 5: IC₅₀ und IC₈₀ von FLT3-NPOS exprimierenden Zellen nach Inkubation mit Daunorubicin

4.3 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten haben einen Einfluss auf die STAT5 Aktivierung und die Regulation seiner Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51 in Ba/F3-Zellen

4.3.1 Duale Mutanten induzieren eine verstärkte Aktivierung von STAT5

STAT5 spielt als Zielprotein des konstitutiv aktivierten FLT3-Rezeptors eine wichtige Rolle und trägt entscheidend zu dessen transformierendem Potential bei (Mizuki et al., 2000; Spiekermann et al., 2003a). STAT5 besitzt wichtige Funktionen in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Zellen (Nosaka et al., 1999). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, inwieweit die Aktivierung von STAT5 bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten von Bedeutung ist und zu Resistenzbildungen gegenüber SU5614 und Daunorubicin führt. Hierfür wurde die Aktivierung von STAT5 mittels Westernblot ermittelt. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, führen duale Mutationen von FLT3 im Vergleich zu einfachen FLT3-ITD Mutationen zu einer stärkeren Aktivierung von STAT5.

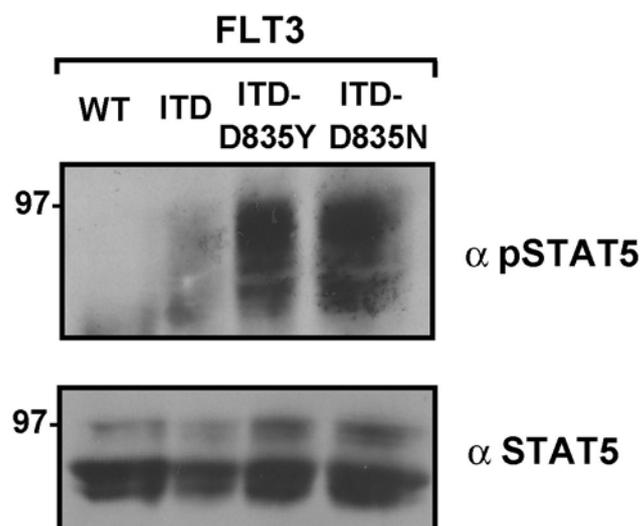


Abbildung 7: Westernblot: in Lysaten von Ba/F3 FLT3-WT, FLT3-ITD sowie FLT3-ITD-D835N/D835Y exprimierenden Zelllinien wurde mittels Westernblot der Status der Phosphorylierung von STAT5 bestimmt. Es wurde ein polyklonaler Antikörper benutzt. Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit polyklonalem anti-STAT5 Antikörper detektiert.

4.3.2 Die konstitutive STAT5 Aktivierung führt zu einer Hochregulation seiner Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51

Die weitere Arbeitshypothese war, dass STAT5 durch eine Hochregulierung seiner Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51 eine wichtige Rolle in der Entstehung von Resistenzen spielt. Mittels Westernblot wurde untersucht, ob diese Zielproteine auch bei dualen Mutanten erhöhte Expressionslevel aufweisen. Die Resultate der Versuche (siehe Abbildung 8) zeigen deutlich, dass duale Mutanten im Vergleich zu ITD Mutanten eine erhöhte Expression der Proteine Bcl-x(L) und RAD51 in Ba/F3 Zellen induzieren.

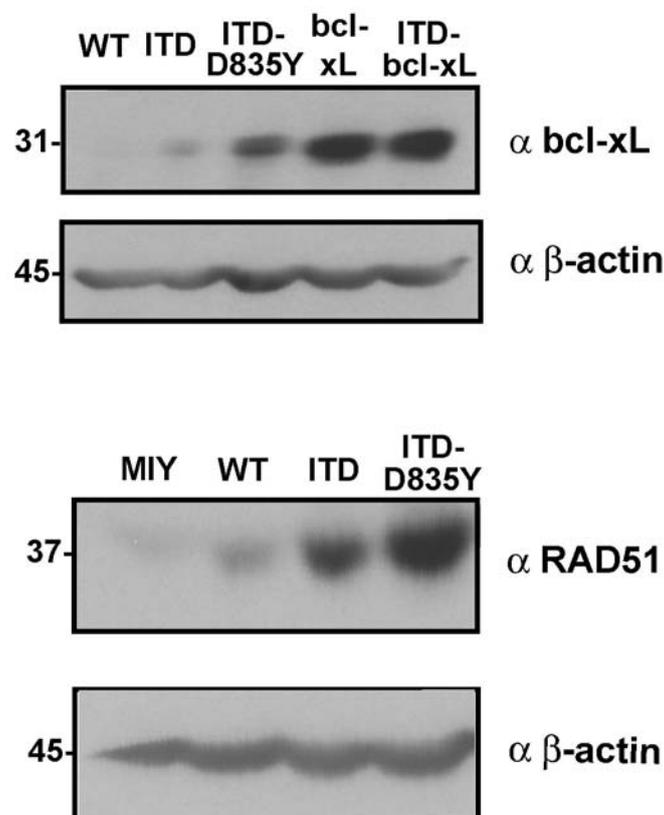


Abbildung 8: Westernblot: die Expression von Bcl-x(L) und RAD51 wurde in Lysaten von FLT3-WT, FLT3-ITD sowie FLT3-ITD-D835N/D835Y exprimierenden Ba/F3 Zellen im Westernblot mittels monoklonalem Bcl-x(L) Antikörper und polyklonalem RAD51 Antikörper bestimmt. Durch einen β -actin Antikörper wurden gleiche Proteinmengen bestätigt. Als Positivkontrolle wurden Zellen, die nur bcl-xL (per Expressionsvektor) exprimieren, sowie FLT3-ITD- Bcl-x(L) Zellen, welche sowohl ITD als auch Bcl-x(L) exprimieren, verwendet.

Um zu klären, ob die Expression der FLT3 Mutante zur Hochregulation von Bcl-x(L) und RAD51 führt, wurde der Einfluss eines selektiven FLT3-PTK Inhibitors untersucht. Hierzu wurden FLT3-ITD-D835Y sowie FLT3-ITD Zellen für 72 Stunden mit dem FLT3 PTK Inhibitor PKC412 inhibiert. Anschließend wurden die Expressionslevel der Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51 mittels Westernblot bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Bcl-x(L) als auch RAD51 durch die Inhibition in ihrer Expression stark unterdrückt werden können (siehe Abbildung 9).

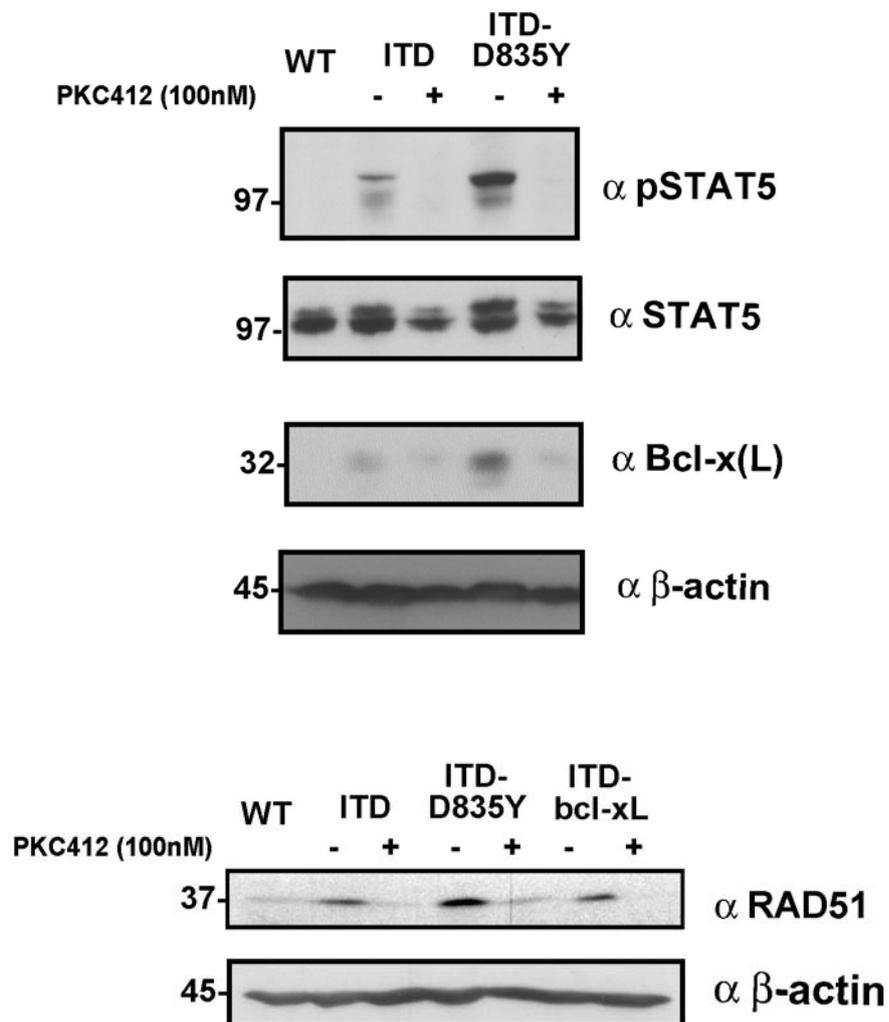


Abbildung 9: Westernblot: in Lysaten von Ba/F3 FLT3-WT, FLT3-ITD und FLT3-ITD-D835N/D835Y exprimierenden Zellen, die für 72 Stunden mit PKC412 (100nM) inhibiert wurden, sowie in unbehandelten Zellen wurde die Expression und Phosphorylierung mittels Westernblot bestimmt. Es wurden polyklonale STAT5, anti-STAT5 Antikörper und monoklonale anti-Bcl-x(L) und β -actin Antikörper verwendet. Als Positivkontrolle für die Expression von Bcl-x(L) wurden Lysate von FLT3-ITD- Bcl-x(L) Zellen, welche sowohl ITD als auch Bcl-x(L) exprimieren, verwendet.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass duale Mutanten über eine starke STAT5 Aktivierung eine Hochregulation der STAT5 Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51 induzieren. Dies legt die Hypothese nahe, dass diese Mechanismen in der Entwicklung von Resistenzen gegenüber FLT3 PTK Inhibitoren eine wichtige Rolle spielen.

4.4 Die Koexpression von Bcl-x(L) und FLT3-ITD führt in Ba/F3 Zellen zu einem den FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten sehr ähnlichen Resistenzmuster gegenüber FLT3 PTK Inhibitoren und Daunorubicin

Die Hypothese, dass STAT5 die Bildung von Resistenzen über seine Zielproteine Bcl-x(L) sowie RAD51 begünstigt, wurde nun näher untersucht. Um die Rolle von Bcl-x(L) bei der Resistenzentwicklung charakterisieren zu können, wurden Zelllinien generiert, die eine Koexpression von FLT3-ITD Mutanten und Bcl-x(L) aufweisen. Die Koexpression konnte im Westernblot bestätigt werden.

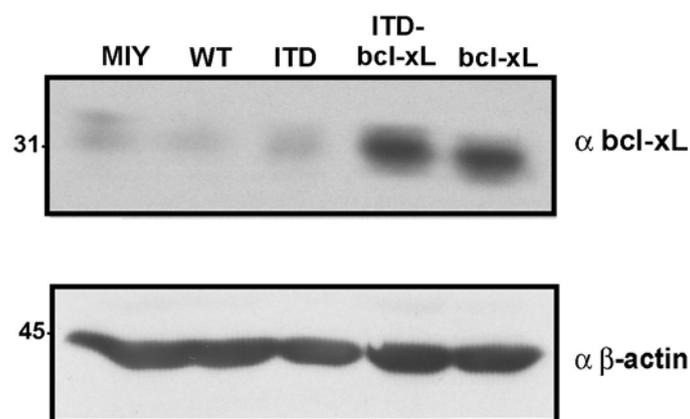


Abbildung 10: Westernblot: Die Bcl-x(L)-Expression in Ba/F3 FLT3-WT, FLT3-ITD und FLT3-ITD-Bcl-x(L) Zellen wurde durch Westernblotanalyse bestimmt. Der leere Vektor MIY sowie Bcl-x(L) exprimierende Zellen wurden als Kontrollen genutzt. Gleiche Proteinmengen wurden durch Bestimmung der β -actin Expression bestätigt.

4.4.1 Resistenzentwicklung gegenüber SU5614

Anschließend wurden Proliferations- und Apoptoseassays in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von SU5614 durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die

Überexpression von Bcl-x(L) in FLT3-ITD Mutanten exprimierenden Ba/F3 Zellen zu einer Resistenzentwicklung gegenüber SU5614 führt (siehe Abbildung 11 und 12).

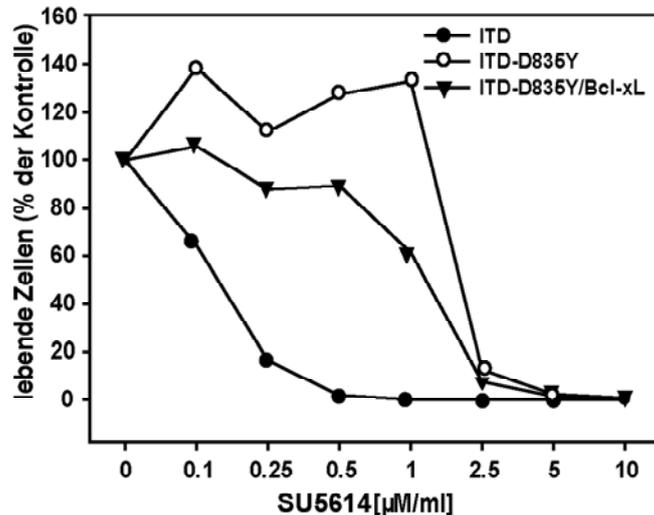


Abbildung 11: Proliferationsassay in Gegenwart von SU5614: Ba/F3 FLT3-ITD, FLT3-ITD-D835Y sowie FLT3-ITD-Bcl-x(L) exprimierende Ba/F3 Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^4 /ml ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen von SU5614 inkubiert. Die lebenden Zellen wurden nach 72 Stunden mittels Trypanblauausschluß bestimmt. Das Wachstum der Zellen ohne Inhibitor wurde als 100% definiert.

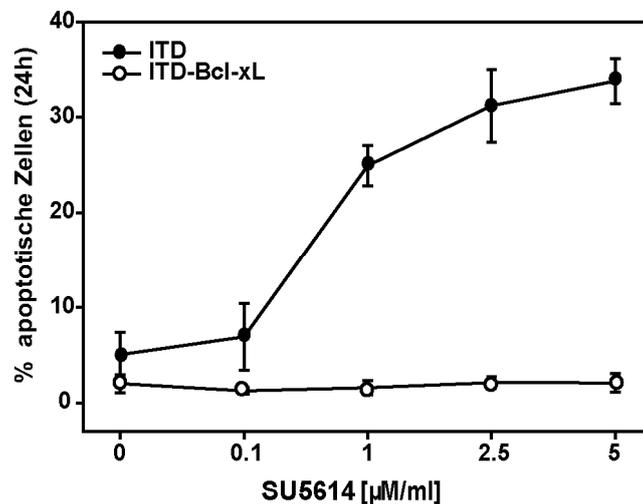


Abbildung 12: Apoptoseassay nach Inkubation mit SU5614: Ba/F3 FLT3-ITD, sowie FLT3-ITD-Bcl-x(L) exprimierende Ba/F3 Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von SU5614 inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose nach Färbung mit Annexin V-PE und 7-AAD durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.4.2 Resistenzmechanismen von FLT3 Mutanten gegenüber Daunorubicin

Um die Bcl-x(L) und ITD koexprimierenden Zellen auf ihre Resistenz gegenüber Daunorubicin zu testen, wurden ebenfalls Proliferations- (Daten ohne Abbildung) sowie Apoptoseassays durchgeführt (siehe Abbildung 13).

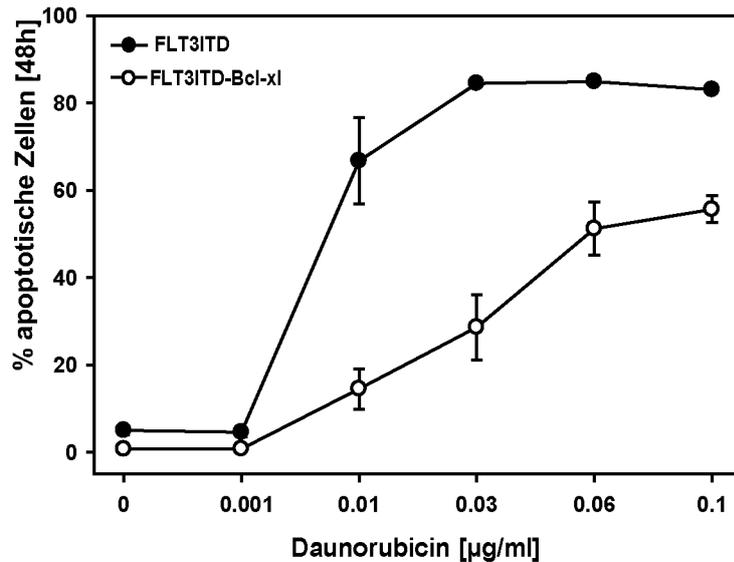


Abbildung 13: Apoptoseassay nach Inkubation mit Daunorubicin: Ba/F3 FLT3-ITD sowie FLT3-ITD-Bcl-x(L) exprimierende Zellen wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Daunorubicin inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose nach Färbung mit Annexin V-PE und 7-AAD durchflußzytometrisch gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen deutlich erkennen, dass neben der Resistenz gegenüber SU5614 auch eine Resistenz gegenüber Daunorubicin induziert wird. Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass Bcl-x(L) eine entscheidende Rolle bei der Resistenzentwicklung von FLT3 dualen Mutanten zukommt.

4.5 Zellzyklusanalysen bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten zeigen Veränderungen in der Zellzyklusregulation nach Zytostatika-Exposition

Der Effekt der Zytostatika wird durch die Antwort der Zelle auf den DNA-Schaden bestimmt: Hierbei spielt die Funktion von p53 eine wichtige Rolle, indem nach einer Schädigung der DNA ein Verbleib in der Phase G₁ des Zellzyklus induziert wird. Falls die DNA-Synthese fortschreitet, wird durch p53 die Apoptose eingeleitet. Neben verschiedenen Störungen dieses Kontrollmechanismus, wie z.B. ein Verlust der Aktivität von p53, kann eine Anhäufung der Zellen in der G₂M-Phase des Zellzyklus zu Resistenzen gegenüber Zytostatika führen. Dieser fehlende Übergang in der G₂M-Phase nach einer Schädigung der DNA, wie er z.B. durch BCR-ABL vermittelt wird, gibt der Zelle die Möglichkeit, eine Reparatur oder Replikation der DNA durchzuführen (Bedi et al., 1995).

4.5.1 Zellzyklusanalyse nach Exposition mit Daunorubicin zeigt vermehrte Akkumulation der FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten in der G₂M-Phase

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit dieser Mechanismus für Resistenzen bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten verantwortlich gemacht werden kann. Um dies näher zu untersuchen, wurden Ba/F3 FLT3-WT, FLT3-ITD sowie FLT3-ITD-TKD Zellen für 24 Stunden geringen Konzentrationen von Daunorubicin (0.03µg/ml) ausgesetzt. Anschließend wurde mittels Propidiumjodid-Färbung der Zellkerne eine Analyse des Zellzyklus durchgeführt.

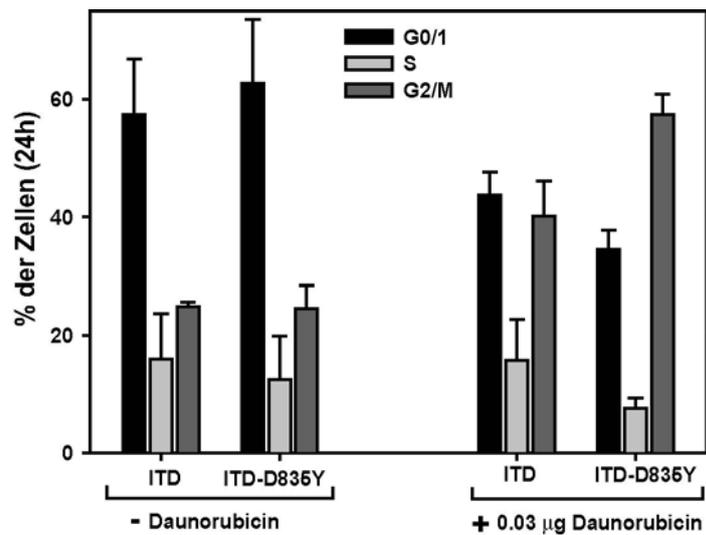


Abbildung 14: Zellzyklusanalyse: Ba/F3 FLT3-ITD und FLT3-ITD-D835Y exprimierende Ba/F3 Zellen wurden mit 0,03µg Daunorubicin inkubiert. Anschließend wurden die inkubierten Zellen sowie nicht inkubierte Zellen nach Färbung der DNA mit Propidiumjodid durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die transformierten Ba/F3-Zellen, sowohl FLT3-ITD als auch FLT3-ITD-TKD Zellen, akkumulierten nach der Exposition mit Daunorubicin in der G₂M-Phase, wobei dieses Phänomen bei FLT3-ITD-TKD im Vergleich zu FLT3-ITD Zellen zu einem viel höheren Prozentsatz der Fall war (57,4% bei FLT3-ITD-TKD vs. 40,0% bei FLT3-ITD Zellen). Im Gegensatz hierzu waren 95% der FLT3-Ligand-stimulierten Ba/F3 FLT3-WT Zellen bei dieser Konzentration von Daunorubicin hypodiploid und somit apoptotisch (Daten ohne Abbildung).

4.5.2 FLT3-Expression ist verantwortlich für G₂M-Zellzyklusarrest

Um zu beweisen, dass die Expression von FLT3 für diesen Effekt verantwortlich ist, wurden die Zellen Daunorubicin (0,03µg) in Gegenwart bzw. Abwesenheit des PTK Inhibitors SU5614 (5µM) ausgesetzt. Dabei zeigt sich, dass die Gegenwart des PTK Inhibitors den Anteil der Zellen, der sich nach Exposition mit Daunorubicin in der G₂M-Phase befand, von 57,4% auf 43,0% reduzieren konnte. Die Gegenwart des PTK Inhibitors führt dazu, dass FLT3-ITD-TKD Zellen in der G₀/G₁-Phase akkumulieren können.

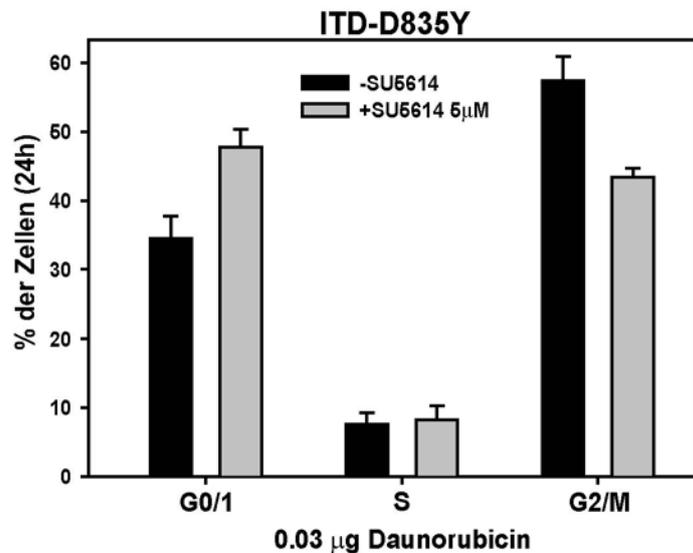


Abbildung 15: Zellzyklusanalyse: Ba/F3 FLT3-ITD-D835Y exprimierende Zellen wurden für 24h mit Daunorubicin behandelt, in Gegenwart oder Abwesenheit von SU5614(5µM). Anschließend wurden die Zellen nach Färbung der DNA mit Propidiumjodid durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Diese Resultate zeigen, dass die Expression von FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten nach Exposition mit Zytostatika zu einer Akkumulation der Zellen in der G₂M-Phase führt, was einen weiteren Mechanismus der Resistenzentstehung gegenüber Daunorubicin bzw. PTK Inhibitoren bei diesen Zellen darstellt.

4.6 Rapamycin stellt die Sensitivität der dualen Mutanten gegenüber PTK Inhibitoren wieder her

Rapamycin ist ein Makrolid mit antibakteriellen, fungiziden, immunsuppressiven sowie antiproliferativen Eigenschaften. Seine Wirkung besteht in einer Inhibition der Translation der mRNA von Proteinen, die für ein Fortschreiten des Zellzyklus von der G₁ zur S-Phase notwendig sind. Rapamycin ist ein Inhibitor der Proteinkinase mTOR (mammalian target of rapamycin) (Hidalgo & Rowinsky, 2000). Mohi et al. konnten zeigen, dass die Therapie mit Imatinib in Kombination mit Rapamycin Imatinib-resistente Mutanten in vitro sowie in vivo überkommen konnte. Desweiteren fanden sie eine synergistische Wirkung von Rapamycin und PKC412 bei FLT3-Mutanten (Mohi et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Rapamycin auch bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber PTK Inhibitoren hat. Hierzu wurden Proliferationsassays mit Ba/F3 FLT3-WT, FLT3-ITD sowie FLT3-ITD-TKD exprimierenden Zellen in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von SU5614 allein oder in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Rapamycin durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in dualen Mutanten die Sensitivität gegenüber SU5614 durch Rapamycin wieder hergestellt werden konnte. Gleichzeitig wurde auch ein antiproliferativer und pro-apoptotischer Effekt auf die FLT3-ITD Mutanten sichtbar.

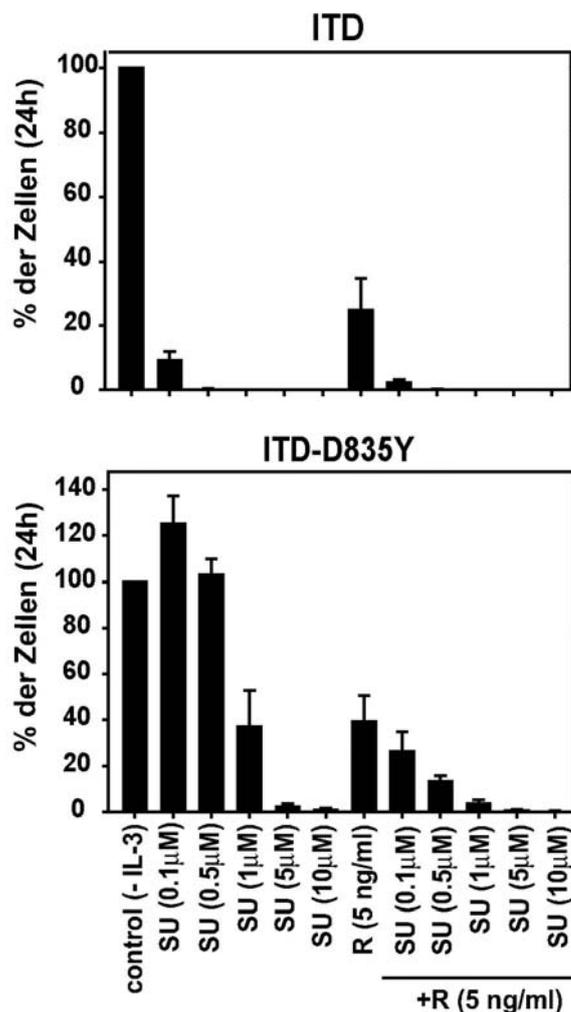


Abbildung 16: Proliferationsassay: Ba/F3 FLT3-ITD und FLT3-ITD-D835Y Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^4 /ml in Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von SU5614 sowie zum Teil kombiniert mit Rapamycin (R) (5ng/ml) ausgesät. Nach 72 Stunden wurden die lebenden Zellen mittels Trypanblauausschluß gezählt. Das Wachstum der Zellen ohne Inhibitor wurde als 100% definiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

5. Diskussion

5.1 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten in der AML

Aktivierende Mutationen von Tyrosinkinase gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei Patienten mit AML. Mindestens 20% der Patienten weisen eine ITD Mutation in der juxtamembranösen Region von FLT3 auf, was sie zu einer der häufigsten Mutationen innerhalb der AML macht. Mit FLT3-ITD Mutationen ist sowohl eine Leukozytose als auch ein hoher Prozentsatz von Blasten im Knochenmark assoziiert. Die Mutation korreliert negativ mit dem Rezidivrisiko sowie mit dem krankheitsfreien Überleben. Es zeigt sich, dass FLT3-ITD für diese beiden Parameter einen signifikant prognostischen Faktor darstellt. Bezüglich kompletter Remissionen oder Gesamtüberleben sind die Daten allerdings widersprüchlich (Kottaridis et al., 2001; Schnittger et al., 2002b).

Neben ITD Mutationen in der juxtamembranösen Region wurden Punktmutationen in Position D835 in der Tyrosinkinasedomäne von FLT3 gefunden. Diese treten bei ungefähr 7% der Patienten auf - und entsprechend der gängigen Meinung - unabhängig von ITD Mutationen. Bezüglich des Einflusses auf das rezidivfreie Überleben ist die Datenlage nicht ganz eindeutig (Schnittger et al., 2001; Yamamoto et al., 2001). Die Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung des FLT3 Rezeptors (Abu-Duhier et al., 2001).

Nähere Untersuchungen konnten zeigen, dass bei ungefähr 1-2% aller Patienten mit AML sowohl eine ITD Mutation als auch eine Mutation innerhalb der Tyrosinkinasedomäne vorliegt. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit beiden Mutationen ist es jedoch schwierig, deren Bedeutung für das Krankheitsgeschehen herauszufinden (Schnittger et al., 2002a; Thiede et al., 2002). Jedoch wird durch eine Studie der Verdacht nahegelegt, dass Patienten mit beiden Mutationen im Vergleich zu ITD Mutationen allein eine nochmals schlechtere Prognose aufweisen (Karali et al., 2002).

Bei einem gleichzeitigen Auftreten von beiden Mutationstypen bestehen zwei Möglichkeiten: Zum einen kann es sein, dass die Mutationen auf verschiedenen Allelen des FLT3 Gens auftreten. Zum anderen besteht aber die Möglichkeit, dass beide auf demselben Allel (FLT3-ITD-TKD duale Mutanten) zu finden sind. Wie Bagrintseva et al. (Bagrintseva et al., 2004) zeigen konnten, induzieren FLT3 duale Mutanten eine Resistenz gegenüber PTK Inhibitoren, was an dem Beispiel SU5614 veranschaulicht wurde. Die Sensitivität gegenüber SU5614 war bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten um bis zu einem Zehnfachen gegenüber der einfachen FLT3-ITD Mutante herabgesetzt. Zudem fand sich ein kompetitiver

Selektionsvorteil der FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten im Vergleich zu den FLT3-ITD Mutanten nach Exposition gegenüber SU5614. Es stellte sich natürlich die Frage, inwieweit es für diese Phänomene eine Rolle spielt, ob die Mutationen auf einem oder zwei Allelen vorhanden sind. Wie es scheint, macht dies einen großen Unterschied. Es ist wohl für die Resistenzentwicklung gegenüber PTK Inhibitoren nötig, dass sich beide Mutationen auf demselben Allel befinden. Demgegenüber weisen Zellen mit Mutationen auf verschiedenen Allelen eine Sensitivität gegenüber SU5614 auf, die FLT3-ITD Mutanten ähnlich ist. Es besteht auch kein Wachstumsvorteil dieser Zellen. Die Hypothese dieser Arbeit war nun, dass im Falle von beiden Mutationen auf demselben Allel ein Phänotyp induziert wird, der sowohl zu einer verstärkten Kinaseaktivität als auch zu einer vermehrten STAT5-Aktivierung führt - und so die beschriebene Resistenzbildung zur Folge hat.

Desweiteren wurde untersucht, ob die Grösse und Lokalisation der ITD Mutation bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten eine Bedeutung für die Entwicklung von Resistenzen aufweist. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Grösse und Lokalisation der ITD Mutation dabei wohl von untergeordneter Bedeutung ist (Bagrintseva, 2005).

In Analogie zu BCR-ABL Genamplifikationen, die Resistenzen gegenüber Imatinib induzieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit die Amplifikation von FLT3-ITD eine Rolle spielt. Die Versuche mit den verschiedenen FLT3-ITD Zellen (NPOS) konnten zwar leichte Sensitivitätsunterschiede zeigen, die aber im Vergleich zur Resistenzentwicklung der dualen Mutanten geringer ausgeprägt sind. Es konnte kein Wachstumsvorteil für diese Zelllinien ermittelt werden. Ein resistenter Phänotyp resultiert wohl nur, wenn eine Kombination beider Mutationstypen, also sowohl FLT3-ITD als auch FLT3-TKD auf einem Allel vorhanden sind.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass FLT3 duale Mutanten nicht nur Resistenzen gegenüber PTK Inhibitoren, sondern auch Resistenzen gegenüber dem Zytostatikum Daunorubicin induzieren können. Als molekularer Mechanismus konnte hier eine starke STAT5-Aktivierung sowie eine Hochregulation seiner Zielproteine Bcl-x(L) sowie RAD51 identifiziert werden. Dass die Überexpression von Bcl-x(L) eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt, konnte dadurch bewiesen werden, dass Bcl-x(L) und ITD koexprimierende Zellen das Resistenzbild der dualen Mutanten imitieren können. Interessanterweise konnte der selektive mTOR-Inhibitor Rapamycin die Sensitivität der dualen Mutanten wiederherstellen. Welche Implikationen dieser Befund für künftige Therapiestrategien beinhaltet, werden weitere Versuche noch zeigen müssen.

5.2 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu PTK Inhibitor Resistenzen – Mechanismen und Folgen für Therapiestrategien

Resistenzverhalten gegenüber PTK Inhibitoren wurde bis jetzt vor allem bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) unter Therapie mit dem PTK Inhibitor STI-571 (Imatinib) untersucht. In Studien mit CML-Patienten war aufgefallen, dass viele Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung anfangs sehr gut auf eine Therapie mit STI-571 angesprochen hatten, es jedoch schnell zu Rezidiven kam. In der weiteren Untersuchung dieser Patienten wurden verschiedene Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne von BCR-ABL gefunden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Mutationen zu Konformationsänderungen der Kinase führen und somit die Affinität der Kinase gegenüber dem Inhibitor vermindern (Gorre et al., 2001; von Bubnoff et al., 2002). Zudem wurden Hinweise dafür gefunden, dass mutierte Klone vielfach schon vor der Therapie existieren, allerdings oft unter der Nachweisgrenze konventioneller Verfahren. Während der Therapie mit dem PTK Inhibitor kommt es zu einem Selektionsvorteil für diese Klone (Shah et al., 2002).

Bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten könnte es durch ähnliche Mechanismen zur Resistenzentstehung gegenüber SU5614 kommen. Es ist möglich, dass die Mutationen Veränderungen der Proteintertiärstruktur induzieren, die das Bindungsverhalten von Inhibitor und Rezeptor im Sinne einer Reduktion der Affinität beeinflussen. Diese Hypothese wird vor allem durch die Beobachtung gestützt, dass Zellen, die Resistenzen gegenüber SU5614 zeigen, sensitiv auf den strukturell unterschiedlichen PTK Inhibitor PKC412 reagieren (Bagrintseva et al., 2004). Dieses Phänomen bietet natürlich die Möglichkeit, beim Auftreten von Resistenzen auf einen anderen Inhibitor zu wechseln bzw. durch eine Kombinationstherapie die Selektion resistenter Klone zu verzögern bzw. zu verhindern.

FLT3 duale Mutanten können nur in einer Untergruppe von AML-Patienten gefunden werden. Jedoch zeigen die Resultate deutlich, dass bei FLT3 dualen Mutanten in der Gegenwart von SU5614 ein kompetitiver Wachstumsvorteil besteht. Dadurch kommt es, ähnlich der CML, zu einer Selektion der Zellen. Leider proliferieren AML-Blasten im Vergleich zu Zellen in der chronischen Phase der CML wesentlich schneller, wodurch es schnell zu Resistenzentwicklungen kommen wird. Dies könnte auch der Grund für die Beobachtung sein, dass es bei AML-Patienten initial zu einem guten Ansprechen auf PKC412 kommt,

jedoch schon nach einigen Wochen Resistenzen auftreten (Stone et al., 2004). Daher sollte schon im Vorfeld überlegt werden, ob es nicht Sinn macht, von Anfang an eine Kombinationstherapie anzuwenden. Damit könnte man diesen Resistenzentwicklungen vorbeugen.

5.3 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten induzieren Resistenzen gegenüber dem Zytostatikum Daunorubicin

Neben der schon erwähnten Resistenzentwicklung gegenüber dem PTK Inhibitor SU5614 fanden sich im Rahmen dieser Arbeit Resistenzen gegenüber dem Zytostatikum Daunorubicin. Diese Resistenz kann jedoch nicht durch eine Veränderung des Bindungsverhaltens des Rezeptors erklärt werden, zusätzliche Mechanismen müssen hierfür eine Rolle spielen. Auffälligerweise kommt es bei FLT3 dualen Mutanten zu einer Hochregulierung von STAT5 sowie zu erhöhten Expressionsleveln seiner Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51. Weiterhin sind wahrscheinlich Veränderungen im Zellzyklus wie ein G₂M-Zellzyklus-Arrest von Bedeutung für die Entstehung von Resistenzen.

5.3.1 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu einer gesteigerten Aktivierung von STAT5

STATs (Signal transducers and activators of transcription) haben eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären, über Wachstumsfaktoren regulierten, Signaltransduktion. STAT5 ist ein wichtiges Signalprotein bei aktivierten FLT3-Rezeptoren. Es ist wahrscheinlich sowohl in vitro als auch in vivo für einen Großteil seines transformierenden Potentials verantwortlich. Vor allem für die FLT3-ITD Mutation und die daraus folgende konstitutive Phosphorylierung von FLT3 wurde eine verstärkte Aktivierung von STAT5 nachgewiesen (Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000).

Nun konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass FLT3-ITD-TKD duale Mutanten im Vergleich zu ITD Mutanten zu einer nochmals erhöhten Aktivität von FLT3 und daraus resultierend zu einer weiteren Aktivierung von STAT5 führen. Die konstitutive Aktivierung von STAT5 hat zur Folge, dass verschiedene Gene, die regulierenden Einfluss auf den Zellzyklus sowie auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose haben, verändert exprimiert werden

(Nosaka et al., 1999). Man weiß, dass eine verstärkte Aktivierung von STAT5 zur Resistenzbildung führen kann – über die vermehrte Expression von Bcl-x(L) und RAD51.

5.3.2 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu einer Überexpression von Bcl-x(L)

Bcl-x(L) gehört zur Familie der bcl-2 Gene, die für die Regulation des Apoptoseprozesses verantwortlich sind. Es gibt eine wachsende Anzahl an Daten, die zeigen, dass eine veränderte Expression der Gene der Bcl-2 Familie einen Einfluss auf die zytostatikainduzierte Apoptose hat und daraus folgend zu Resistenzen führt. Es hat sich gezeigt, dass eine gesteigerte Expression von Bcl-x(L) ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein Ansprechen auf Therapie ist. Ein schlechtes Ansprechen wurde vor allem in der intermediären zyto-genetischen Risikogruppe gefunden (Schaich et al., 2001). Es konnten bereits Mechanismen identifiziert werden, die erklären, warum Bcl-x(L) zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führt: Durch Zytostatikatherapie ausgelöste Zellschäden haben eine proteolytische Aktivierung von Caspasen zur Folge, was aber durch Proteine wie Bcl-x(L) verhindert werden kann (Ibrado et al., 1996). Desweiteren kommt es im Normalfall relativ früh in der Apoptose zu einer Störung der Funktion der Mitochondrien. Die Expression von Bcl-x(L) kann diesen Mechanismus durchbrechen und so die Fähigkeit zur Apoptose empfindlich stören (Heiden et al., 1997).

Diese Daten legten die Hypothese nahe, dass Bcl-x(L) auch bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten eine Rolle für die Resistenzentwicklung spielen könnte. Es zeigten sich in der Tat stark erhöhte Expressionslevel im Vergleich zu FLT3-ITD Mutanten. Dass die Erhöhung von Bcl-x(L) nicht nur ein Nebeneffekt ist, sondern eine große Bedeutung für die Resistenzentwicklung der dualen Mutanten darstellt, konnte durch ITD und Bcl-x(L) koexprimierende Zellen gezeigt werden, die eine Resistenz gegenüber Zytostatika sowie gegenüber strukturell unterschiedlichen PTK Inhibitoren induzieren konnten. Wahrscheinlich resultiert die Überexpression von Bcl-x(L) in einer primären Resistenz gegenüber PTK Inhibitoren.

5.3.3 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu einer erhöhten Expression von RAD51

Das Gen RAD51 und seine Genfamilie (RAD51B, RAD51C, XRCC2, XRCC3) stehen momentan sehr im Focus der Forschung. RAD51 ist an vielen Interaktionen beteiligt, die die Reparatur von DNA-Schäden sowie die Regulation von Zellzyklus und Apoptose beinhalten. RAD51 spielt eine zentrale Rolle bei der homologen Rekombination, welche als eine Hauptmaßnahme zur Reparatur von schweren DNA-Schäden, wie z.B. Doppelstrangbrüchen, dient (Richardson, 2005). Zusätzlich beeinflusst RAD51 die Längenregulation von Telomeren, und zwar unabhängig von der Telomeraseaktivität der Zellen (Tarsounas et al., 2004). RAD51 scheint eine lebenswichtige Rolle für die Stabilität des Genoms zu spielen. Dies konnte durch Mäuse, die defizient für RAD51 waren und extrem sensitiv auf DNA-schädigende Substanzen reagierten, gezeigt werden (Smiraldo et al., 2005).

Eine erhöhte Expression von RAD51 wurde sowohl in verschiedenen immortalisierten Zelllinien als auch in mehreren Primärtumoren gefunden. Auch in BCR-ABL exprimierenden Zellen konnten erhöhte Expressionslevel nachgewiesen werden, die, vermittelt durch BCR-ABL, sowohl aus einer erhöhten STAT5-Aktivierung als auch aus einem verminderten Abbau durch die Caspase 3 resultieren. Es wurde beobachtet, dass die Expression von RAD51 mit Resistenzen gegenüber Zytostatika positiv korrelierte. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Erniedrigung der Expression von RAD51 verminderte Resistenzen zur Folge hatte (Slupianek et al., 2001).

Inwieweit RAD51 bei der Resistenzbildung der FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten eine Rolle spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten konnte eine erhöhte Expression, welche durch STAT5 vermittelt wurde, nachgewiesen werden. Auf der einen Seite werden durch Daunorubicin Doppelstrangbrüche erzeugt, auf der anderen Seite spielt RAD51 eine entscheidende Rolle bei der Reparatur dieses DNA-Schadens. Daher kann angenommen werden, dass RAD51 ein Glied in der Kette veränderter Parameter ist, die bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten speziell zu Resistenzen gegenüber Zytostatika wie Daunorubicin führen.

5.3.4 FLT3-ITD-TKD duale Mutanten führen zu Veränderungen in der Zellzykluskontrolle nach DNA-Schädigung

Die zelluläre Antwort auf eine Schädigung der DNA ist vielseitig: Sie umfasst eine Entfernung und Reparatur des Schadens, Checkpoints, die den Zellzyklus koordinieren, Änderungen in der Transkription zum Vorteil der Zelle sowie die Apoptose. Einen sehr wichtigen Baustein bilden die Checkpoints im Zellzyklus. Diese Checkpoints sollen Verzögerungen im Zellzyklus induzieren, um so dessen Progression im Hinblick auf die Erkennung von Schäden und deren Reparatur zu koordinieren. Zu den Schlüsselstellen gehört zum einen ein Checkpoint kurz vor der Replikation der DNA (G_1/S) und zum anderen ein Checkpoint kurz vor der Trennung der Chromosomen (G_2/M).

Die Funktion des G_1/S -Checkpoints besteht darin, zu ermöglichen, dass Reparaturen vor dem Eintritt in die S-Phase stattfinden. So soll verhindert werden, dass Mutationen repliziert werden. Hierbei spielen p53 sowie die Inaktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen eine entscheidende Rolle. Falls es trotz Mutationen zu einer Progression im Zellzyklus kommt, wird die Apoptose eingeleitet.

Der G_2/M -Checkpoint kontrolliert, dass die DNA-Replikation komplett stattfindet und induziert, im Falle von Schäden der DNA, einen Arrest in der Phase G_2 vor der Mitose (Latif et al., 2001; Sancar et al., 2004).

Der korrekte Ablauf des Zellzyklus und seiner Checkpoints ist nicht nur für eine gesunde Zelle notwendig, sondern auch für das Ansprechen von Tumorzellen auf zytotoxische Therapien wichtig. Hier kommt es vor allem auf die Bereitschaft der Zelle an, bei DNA-Schäden in Apoptose zu gehen. In BCR-ABL exprimierenden Zellen konnte eine Verzögerung im Übergang von der G_2 - zur M-Phase nachgewiesen werden, was mit einer Hemmung der Apoptose assoziiert war (Bedi et al., 1995). Dies wurde dadurch erklärt, dass dieser Arrest in der G_2 -Phase der Zelle genug Zeit gibt, Reparaturen durchzuführen sowie die Replikation der DNA und die Teilung der Chromosomen zu vollenden. Da Zytostatika das Ziel haben, durch DNA-Schäden eine Apoptose zu induzieren, kann dieser Mechanismus zu einem geringeren Ansprechen auf Zytostatika führen (Bedi et al., 1995).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FLT3-ITD-TKD duale exprimierende Zellen nach Behandlung mit Daunorubicin in der G_2 -Phase akkumulieren, und zwar zu einem wesentlich größeren Prozentsatz als FLT3-ITD exprimierende Zellen. Dieser G_2/M Arrest erlaubt auch hier, DNA-Schäden zu reparieren und eine Apoptose zu vermeiden. Durch die Zugabe von PTK Inhibitoren konnte dieser Arrest verhindert werden, was seine Spezifität

beweist. Sicherlich spielen diese Störungen im Zellzyklus neben der STAT5-Aktivierung sowie der Hochregulation seiner Zielgene Bcl-x(L) und RAD51 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Zytostatika-Resistenzen bei FLT3-ITD-TKD dualen Mutanten.

5.4 Therapiestrategien, Möglichkeiten und Entwicklung

Zur Tumorbekämpfung gibt es bereits eine Reihe unterschiedlichster Therapiestrategien. Durch den rasanten Zuwachs an Wissen über molekulare Vorgänge in Tumorzellen wird es möglich, neue Ansätze für Therapien zu entwickeln. Ziel ist hier vor allem, Therapeutika zu finden, die möglichst selektiv wirken und dadurch eine geringe Toxizität aufweisen (targeted therapies). Eine solche Therapiestrategie ist der gezielte Einsatz von Inhibitoren von Proteintyrosinkinasen. Hier ist im Bereich der Leukämien vor allem der ABL-Inhibitor Imatinib (STI571) zu nennen, der bei CML-Patienten bereits sehr erfolgreich angewandt wird. Auch FLT3-Inhibitoren wie z.B. PKC412 zeigen in ersten Studien vielversprechende Resultate. Doch mit dem ersten Erfolg waren auch schnell die Schattenseiten dieser neuen Medikamentengruppe, ähnlich den der konventionellen Therapeutika, erkennbar: die Entwicklung von Resistenzen. Nun steht die Verhinderung der Resistenzentstehung bzw. das Überkommen von schon vorhandenen Resistenzen im Focus der Forschung.

5.4.1 Kombinationstherapien

Eine Möglichkeit, Resistenzentwicklungen zu vermindern, besteht in der Anwendung von Kombinationstherapien. Dabei können sowohl verschiedene Inhibitoren untereinander als auch konventionelle Zytostatika mit Inhibitoren kombiniert werden. Synergistische Effekte wurden zum Beispiel bei der Kombination von Imatinib und Interferon Alpha, Hydroxyurea, Ara-C sowie Daunorubicin in BCR-ABL-exprimierenden Zellen beobachtet (Thiesing et al., 2000).

Rapamycin ist ein Inhibitor der Serin-Threonin Kinase mTOR (mammalian target of Rapamycin), ein wichtiger Regulator mit antibakteriellen, fungiziden, immunsuppressiven sowie antiproliferativen Eigenschaften (Hidalgo & Rowinsky, 2000). Für Rapamycin konnte gezeigt werden, dass es in Kombination mit PTK Inhibitoren Resistenzen überkommen kann. Dies konnte sowohl für Imatinib-resistente Mutanten von BCR-ABL gezeigt werden, als auch

für PKC412-resistente Mutanten von FLT3. Rapamycin wirkt dabei synergistisch mit dem jeweiligen PTK Inhibitor (Imatinib oder PKC412) (Mohi et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität von FLT3 dualen Mutanten gegenüber SU5614 durch Rapamycin wiederhergestellt werden konnte. Die dabei benötigte Konzentration an Rapamycin lag in dem Bereich, der therapeutisch zur Immunsuppression nach Organtransplantationen erreicht wird.

5.4.2 Angriff auf resistenzfördernde Gene

Da antiapoptotische Proteine, wie die der Bcl-2 Familie, in Tumorzellen oft überexprimiert werden, sind sie ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt. Das Ziel neuer Therapeutika ist, in Zellen durch die selektive Inhibition dieser Gene Apoptose zu induzieren. In einem Therapieansatz wird versucht, die Proteinlevel durch Antisense-Moleküle zu reduzieren. In einem anderen Ansatz wurden spezielle kleinmolekulare Inhibitoren entwickelt. Zusätzlich versucht man, Moleküle zu identifizieren, die die Proteine binden und kontrollieren können (Gardner, 2004).

Für Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (HNSCC) konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Antisense-Molekülen und Chemotherapeutika (hier Cisplatin und Etoposid) in vitro einen positiven Effekt hatte, indem sie zur vermehrten Apoptoseinduktion führte (Sharma et al., 2005).

Um dem resistenzfördernden Effekt einer erhöhten Expression von RAD51 entgegenzuwirken, wurde ebenfalls versucht, diverse Therapiestrategien zu entwickeln. Einer dieser Versuche besteht darin, eine siRNA (short interfering RNA) in den Tumor einzuschleußen, die dann die Expression von RAD51 durch einen Verdau von dessen mRNA gezielt supprimieren soll. Erste Erfolge konnten in vivo und in vitro gezeigt werden. Die Transkriptlevel von RAD51 konnten durch dieses Verfahren um ungefähr 25% gesenkt werden, während die Sensitivität gegenüber einem Zytostatikum (hier Cisplatin) gesteigert werden konnte (Ito et al., 2005).

Andere zielgerichtete Therapieansätze umfassen Modulatoren von Efflux-Pumpen (z.B. gegen P-glycoprotein), die durch ihre Eigenschaft als Membranpumpen Chemotherapeutika aus der Zelle schleusen und so zu Resistenzen führen. Weitere Ansätze sind Therapeutika gegen CD33, ein Oberflächenmolekül, welches auf den meisten AML-Blasten exprimiert

wird. Auch Agenzien mit Einfluss auf die Angiogenese werden in klinischen Studien untersucht (Tallman et al., 2005).

Jedoch zeichnet sich schon jetzt in klinischen Studien ab, dass viele dieser neuen Substanzen als Monotherapie keine ausreichende klinische Aktivität haben. Die große Chance dieser neuen Agenzien besteht in ihrer Kombination mit herkömmlichen Therapien.

6. Zusammenfassung

FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3) ist bei ca. 30% aller Patienten mit akuter myeloischer Leukämie konstitutiv aktiviert und repräsentiert einen krankheitsspezifischen molekularen Marker. Zwei verschiedene Arten von Mutationen sind hierbei vorherrschend: ITD (internal tandem duplications) im Bereich der juxtamembranösen Region sind bei ungefähr 20-25% der Patienten nachweisbar sowie Mutationen im Bereich der Tyrosinkinasedomäne (TKD), die bei bis zu 8% der AML-Fälle auftreten. Es wurde bisher davon ausgegangen, dass die beiden Mutationstypen nicht im gleichen Patienten auftreten, da sie eine funktionelle Redundanz aufweisen. Neuere Daten zeigen jedoch, dass 1-2% aller AML-Patienten beide Mutationen (FLT3-ITD-TKD, duale Mutanten) tragen. Die Signifikanz dieser Beobachtung ist noch unklar, erste Studien haben jedoch gezeigt, dass diese dualen Mutationen mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FLT3 duale Mutanten in in vitro Modellsystemen nicht nur Resistenzen gegenüber PTK Inhibitoren, sondern auch gegenüber dem Zytostatikum Daunorubicin induzieren können. Als molekularer Mechanismus hierfür konnte eine verstärkte Aktivierung von STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) sowie eine erhöhte Expression der STAT5-Zielproteine Bcl-x(L) und RAD51 identifiziert werden. Darüber hinaus konnte ein Arrest in der G₂/M Phase des Zellzyklus beobachtet werden. Dieser Zellzyklusarrest erlaubt, DNA-Schäden zu reparieren und eine Apoptose zu vermeiden.

Dass die Überexpression von Bcl-x(L) den wohl kritischen Punkt bei der Resistenzentstehung von FLT3-ITD-TKD Mutationen ausmacht, konnte dadurch bewiesen werden, dass Bcl-x(L)- und ITD- koexprimierende Zellen das Resistenzbild der dualen Mutanten imitieren können. Interessanterweise konnte der selektive mTOR-Inhibitor Rapamycin in Kombination mit PTK Inhibitoren die Sensitivität der dualen Mutanten wiederherstellen.

Diese Arbeit beschreibt die molekularen Grundlagen von Resistenzbildungen gegenüber FLT3 PTK Inhibitoren und zeigt gleichzeitig therapeutische Ansätze auf, um Resistenzen zu verhindern oder zu überkommen.

7. Referenzen

- Abu-Duhier, F.M., Goodeve, A.C., Wilson, G.A., Care, R.S., Peake, I.R. & Reilly, J.T. (2001). Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, **113**, 983-8.
- 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.
- Bagrintseva, K. (2005). Mutationen des FLT3 Genes in akuter myeloider Leukämie. In *Medizinische Fakultät, Medizinische Klinik III, Großhadern*. Ludwigs-Maximilians-Universität: Munich.
- 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. Epub 2003 Nov 6.
- Bedi, A., Barber, J.P., Bedi, G.C., el-Deiry, W.S., Sidransky, D., Vala, M.S., Akhtar, A.J., Hilton, J. & Jones, R.J. (1995). BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*, **86**, 1148-58.
- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-65.
- Buske, C., Becker, D., Feuring-Buske, M., Hannig, H., Wulf, G., Schafer, C., Hiddemann, W. & Wormann, B. (1997). TGF-beta inhibits growth and induces apoptosis in leukemic B cell precursors. *Leukemia*, **11**, 386-92.
- Fiedler, W., Serve, H., Dohner, H., Schwittay, M., Ottmann, O.G., O'Farrell A, M., Bello, C.L., Allred, R., Manning, W.C., Cherrington, J.M., Louie, S.G., Hong, W., Brega, N.M., Massimini, G., Scigalla, P., Berdel, W.E. & Hossfeld, D.K. (2005). A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*, **105**, 986-93. Epub 2004 Sep 30.
- Gardner, C. (2004). Anticancer drug development based on modulation of the Bcl-2 family core apoptosis mechanism. *Expert Rev Anticancer Ther.*, **4**, 1157-1177.
- Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N. & Sawyers, C.L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, **293**, 876-80.
- 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.
- Heiden, M.G.V., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria. *Cell*, **91**, 627-637.
- Hidalgo, M. & Rowinsky, E.K. (2000). The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*, **19**, 6680-6686.
- Ibrado, A.M., Huang, Y., Fang, G., Liu, L.Q. & Bhalla, K. (1996). Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/YAMA protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res*, **56**, 4743-8.
- Ito, M., Yamamoto, S., Nimura, K., Hiraoka, K., Tamai, K. & Kaneda, Y. (2005). RAD51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *Gene Med*.

- Karali, V., Dimitriadou, E., Paraskevi, K., Georgiou, G., Vervessou, E. & Panayiotidis, P. (2002). ITD and Asp835 mutation of FLT-3 gene can occur simultaneously in AML patients. *Blood*, **100**, 197b.
- 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.
- 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.
- Kottaridis, P.D., Gale, R.E., Frew, M.E., Harrison, G., Langabeer, S.E., Belton, A.A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D.T., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. & Linch, D.C. (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, **98**, 1752-9.
- Larson, R.A. (2005). Treatment of acute myeloid leukemia in adults. Up to date.
- Larson, R.A. & Le Beau, M.M. (2005). Cytogenetics in acute myeloid leukemia. UpToDate.
- Latif, C., Harvey, S.H. & Connell, M.J. (2001). Ensuring the Stability of the Genome: DNA Damage Checkpoints. *The Scientific World*, **1**, 684-702.
- Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Muller, C., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., Buchner, T., Kienast, J., Kanakura, Y., Berdel, W.E. & Serve, H. (2000). Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*, **96**, 3907-14.
- Mohi, M.G., Boulton, C., Gu, T., Sternberg, D.W., Neuberg, D., Griffin, J.D., Gilliland, D.G. & Neel, B.G. (2004). Combination of rapamycin and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3130-3135.
- Moreno, I., Martin, G., Bolufer, P., Barragan, E., Rueda, E., Roman, J., Fernandez, P., Le n, P., Mena, A., Cervera, J., Torres, A. & Sanz, M.A. (2003). Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **88**, 19-24.
- Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A.L. & Kitamura, T. (1999). STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo J*, **18**, 4754-65.
- Reilly, J.T. (2002). Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol*, **116**, 744-57.
- Richardson, C. (2005). RAD51, genomic instability, and tumorigenesis. *Cancer Letters*, **218**, 127-139.
- Ross, D.D. (2000). Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia*, **14**, 467-73.
- Rowley, J.P.-B.J. (1994). The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood*, **83**, 2780-2786.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.*, **73**, 39-85.
- Schaich, M., Illmer, T., Seitz, G., Mohr, B., Schakel, U., Beck, J.F. & Ehninger, G. (2001). The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **86**, 470-7.
- Schiffer, C.A. (2005). Clinical features, diagnosis, and prognosis of acute myeloid leukemia. Up To Date.

- Schnittger, S., Boell, I., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Sauerland, M.C., Hiddemann, W. & Haferlach, T. (2002a). FLT3D835/I836 Point Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Correlation to Cytogenetics, Cytomorphology, and Prognosis in 1229 Patients. *Blood*, **100**, 329a.
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Löffler, H., Sauerland, C.-M., Serve, H., Büchner, T., Haferlach, T. & Hiddemann, W. (2002b). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia (AML): Correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study, and usefulness as a marker for detection of minimal residual disease. *Blood*, **100**, 59-66.
- Schnittger, S., Schoch, C., Hiddemann, W. & Haferlach, T. (2001). Rapid, Simple and Reliable Detection of FLT3 Asp835 Point Mutations in Acute Myeloid Leukemia and Identification of a New Length Mutation In Exon 20. *Blood (abstract)*, **98**, 107a.
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W. & Haferlach, T. (2000). Flt3 length mutations in AML: correlation to cytogenetics, FAB-subtype, and prognosis in 652 patients. *Blood*, **96**, 826a.
- Shah, N.P., Nicoll, J.M., Nagar, B., Gorre, M.E., Paquette, R.L., Kuriyan, J. & Sawyers, C.L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (ST1571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, **2**, 117-25.
- Sharma, H., Sen, S., Muzio, L.L., Mariggio, A. & Singh, N. (2005). Antisense-Mediated Downregulation of Anti-Apoptotic Proteins Induces Apoptosis and Sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells to Chemotherapy. *Cancer Biol Ther.*, **4**.
- Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M.O., Pierce, A.J., Fishel, R. & Skorski, T. (2001). BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell*, **8**, 795-806.
- Smiraldi, P.G., Gruver, A.M., Osborn, J.C. & Pittman, D.L. (2005). Extensive chromosomal instability in RAD51d-deficient mouse cells. *Cancer Res.*, **65**, 2089-2096.
- Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K. & Hiddemann, W. (2003a). Overexpression and Constitutive Activation of FLT3 Induces STAT5 Activation in Primary Acute Myeloid Leukemia Blast Cells. *Clin Cancer Res*, **9**, 2140-50.
- Spiekermann, K., Dirschinger, R.J., Schwab, R., Bagrintseva, K., Faber, F., Buske, C., Schnittger, S., Kelly, L.M., Gilliland, D.G. & Hiddemann, W. (2003b). The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood*, **101**, 1494-504.
- Stirewalt, D.L., Meshinchi, S., Kussick, S.J., Sheets, K.M., Pogosova-Agadjanyan, E., Willman, C.L. & Radich, J.P. (2004). Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, **124**, 481-4.
- Stock, W. & Thirman, M.J. (2005). Pathobiology of acute myeloid leukemia. Up to date.
- 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.
- Tallman, M.S., Gilliland, D.G. & Rowe, J.M. (2005). Drug therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*, **106**, 1154-63.
- Tarsounas, M., Munoz, P., Claas, A., Smiraldi, P.G., Pittman, D.L., Blasco, M.A. & West, S.C. (2004). Telomere Maintenance Requires the RAD51D Recombination/Repair Protein. *Cell*, **117**, 337-347.
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schakel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhauser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. & Illmer, T. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia:

- association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, **99**, 4326-35.
- Thiesing, J.T., Sayuri, O., Kolibaba, K.S. & Druker, B.J. (2000). Efficacy of STI571, an Abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against Bcr-Abl-positive cells. *Blood*, **96**, 3195-3199.
- von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C. & Duyster, J. (2002). BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet*, **359**, 487-91.
- Whitman, S.P., Archer, K.J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B.D., Carroll, A.J., Mrozek, K., Vardiman, J.W., George, S.L., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D. & Caligiuri, M.A. (2001). Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer Res*, **61**, 7233-9.
- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R. & Naoe, T. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, **97**, 2434-2439.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

- AK: Antikörper
- AML: Akute Myeloische Leukämie
- Ara-C: Cytosin-Arabinosid
- Bcl-x(L): Mitglied der Bcl-2 family
- bp: base pairs
- BSA: Bovines Serumalbumin
- CML: Chronische myeloische Leukämie
- CSF: Colony Stimulating Factor
- CSFR: Colony Stimulating Factor Receptor
- DMSO: Dimethylsulfoxid
- DNA: Desoxyribonucleid Acid
- DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
- FAB: French-American-British-Group
- FACS: Durchflußzytometrie
- FCS: Fötale Kälberserum
- FLT3: fms-like tyrosine kinase-3
- GFP: Green Fluorescence Protein
- IgD: Immunglobulin-ähnliche Domäne
- IL: Interleukin
- ITD: Internal Tandem Duplication
- JM: Juxtamembranöse Domäne
- kD: Kilodalton
- KIT: Receptor for stemm cell factor
- LM: Length Mutation
- MAP: Mitogen Activated Protein
- MDS: Myelodysplastische Syndrom
- MPD: Myeloproliferative Disease
- MPS: Myeloproliferatives Syndrom
- mRNA: Messenger Ribonucleic Acid
- MT: Mutation

- mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
- PBS: Phosphat Buffered Saline
- PCR: Polymerase Chain Reation
- PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor
- PTK: Proteintyrosinkinase
- PXase: Peroxidase
- RNA: Ribonucleic Acid
- Rpm: Rounds per minute
- SBB: Sudan Black
- SDS: Natriumdodecylsulfat
- siRNA: short interfering RNA
- STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
- TK: Kinasedomäne
- TKD: Tyrosine Kinase Domain
- TM. Transmembranöse Region
- Wt: Wildtyp
- YFP: Yellow Fluorescence Protein

8.2 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen

- Bagrintseva K., **Geisenhof S**, Kern R, Eichenlaub S, Reindl C, Hiddemann W, Spiekermann K. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK Inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-xL. *Blood*. 2005 May 1; 105(9):3679-85

Abstracts:

- Bagrintseva K., **Geisenhof S**, Schwab R, Eichenlaub S, Hiddemann W, Spiekermann K. [P48] Dual FLT3-ITD/TKD Mutants Found in AML confer Resistance to FLT3 PTK Inhibitors and Daunorubicin *Abstract #48 appears in Annals of Hematology, Suppl1 to Vol 83 (2004)*
- Bagrintseva K., **Geisenhof S**, Schwab R, Eichenlaub S, Hiddemann W, Spiekermann K. [2174] Dual Activating FLT3-ITD/TKD Mutations Found in patients with AML Induce Resistance to FLT3 PTK Inhibitors and Daunorubicin by Upregulation of Bcl-xL. *Abstract #2174 appears in Blood, Volume 102, issue 11, November 16, 2003*

8.3 Danksagung

Für die Ermöglichung der Arbeit in der Klinischen Kooperationsgruppe zwischen der Medizinischen Klinik III und der gsf möchte ich Herrn CA Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Karsten Spiekermann für die Überlassung des Themas und für die unmittelbare und konstruktive Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dr. Ksenia Bagrintseva, Ruth Kern, Sabine Eichenlaub und Tobias Kohl für die geduldige Unterstützung in Wort und Tat bedanken. Hier möchte ich vor allem Frau Dr. Ksenia Bagrintseva erwähnen, die mich bei meinem Projekt in jeder Hinsicht gefördert hat.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Stefanie Geisenhof
 Amarellenweg 8
 80689 München
 Telefon: 089/70929519
 Email: Stefanie.Geisenhof@med.uni-muenchen.de

Geboren am 1. Mai 1978 in Bayreuth
 Nationalität: deutsch

Schulbildung

09/88 – 06/97 Werner-von-Siemens-Gymnasium in Weißenburg / Bayern (Abitur-Note: 1,5)

Freiwilliges Soziales Jahr

09/97 – 08/98 Cnopf'sche Kinderklinik / Klinikum Hallerwiese in Nürnberg
 Pflegedienst auf einer Station für pädiatrische Onkologie

Studium

10/98-09/2000 **Vorklinisches Studium** der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg (Note im Physikum: 1,3)

Seit 10/2000 **Klinisches Studium** der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Note im 1. Staatsexamen: 1,0; Note im 2. Staatsexamen: 1,6)

04/2004-03/2005 **Praktisches Jahr:**
 1. Terial: Innere Medizin: Harvard Medical School, Boston (Note: High Honors)
 2. Terial: Gynäkologie: Universitätsspital Zürich
 3. Terial: Chirurgie: Chirurgische Klinik, Innenstadt, LMU München

06/2005 Abschluss des Studiums mit 3. Staatsexamen (Gesamtnote 1,3)

Weiterbildung

Seit 06/2005 Weiterbildung zur Endokrinologin in der Medizinischen Klinik Innenstadt, München

Forschung

03/2002-09/2004 Arbeitsgruppe „Signaltransduktion von Proteintyrosinkinase in der akuten myeloischen Leukämie (AML)“, Klinische Kooperationsgruppe Akute Leukämien im Hämatologikum der GSF/ Medizinische Klinik III

Publikationen

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

2005 **Geisenhof S***, Horng A*, Lehnen N*, Meier A*, Obermaier B*, Poeck H*, Ricken J*, Sarafoff N*, Toegel F*, Westmeyer G*, Aretz HT, Christ F: "*Praktisches Jahr in Harvard 2004: PraeCuM - Neugestaltung des I. Studienabschnittes*" Poster für den Besuch des Wissenschaftsrates am Klinikum der Universität München, Feb. 2005
* these authors contributed equally

Stipendien

2001 Deutsch-chinesische Gesellschaft für Medizin: Famulaturprogramm an chinesischen Universitäten

2004 Medizinische Fakultät der LMU München: Programm an der Harvard Medical School

Praktika und Famulaturen

03/2000 Interkulturelle Studentenbegegnung und Praktikum in einem Krankenhaus in Togo/Westafrika

03/2001 Famulatur in der Inneren Medizin / Endokrinologie, Medizinische Klinik, München

08-09/2001 Famulatur in der Gynäkologie und Orthopädie (z.T. in Kombination mit Akupunktur) an der Universitätsklinik Tangshan (VR China)

08/2002 Famulatur in einer radiologischen Praxis in Weißenburg / Bayern

03/2003 Famulatur in der Neuropsychiatrie im Riverview Hospital in Vancouver (Kanada)