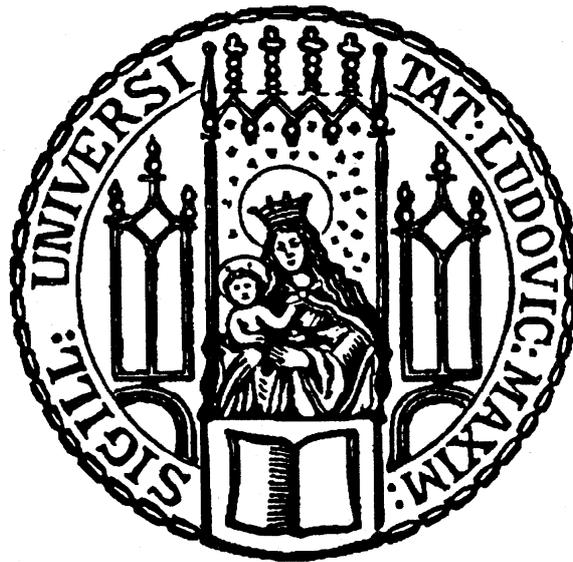


Aktivierung des FLT3-Signalweges als molekulare Zielstruktur in der akuten myeloischen Leukämie



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Harald Polzer

München, Januar 2013

Dissertation eingereicht am: 29.01.2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Barbara Conradt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München, im Januar 2013

Harald Polzer

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 der Promotionsordnung von Herrn Prof. Dr. Dirk Eick betreut. Ich erkläre hiermit, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, im Januar 2013

Harald Polzer

Die Ergebnisse wurden zum Teil in folgenden Präsentationen veröffentlicht oder werden in Kürze zur Publikation eingereicht:

Pietschmann K., Bolck H.A., Buchwald M., Spielberg S., **Polzer H.**, Spiekermann K., Bug G., Heinzl T., Böhmer F.D., Kraemer O.H.

„Breakdown of the FLT3-ITD/STAT5 axis and synergistic apoptosis induction by the histone deacetylase inhibitor Panobinostat and FLT3-specific inhibitors“, Molecular Cancer Therapeutics, 2012

Polzer H., Janke H., Schmid D., Hiddemann W., Spiekermann K.

„Casitas B-lineage lymphoma mutants activate AKT to induce transformation in cooperation with class III receptor tyrosine kinases“, Experimental Hematology, 2012

Opatz S., ***Polzer H.**, Herold T., Konstandin N.P., Ksienzyk B., Zellmeier E., Vosberg S., Graf A., Krebs S., Blum H., Hopfner K.P., Kakadia P.M., Schneider S., Dufour A., Braess J., Sauerland M.C., Berdel W.E., Büchner T., Woermann B.J., Hiddemann W., Spiekermann K., Bohlander S.K., Greif P.A.

„Exome Sequencing Identifies Recurring *FLT3* N676K Mutations in Core Binding Factor Leukemia”, *Blood*, 2013, *Epub ahead of print*

Polzer H., Zellmeier E., Schmid D., Quentmeier H., Hiddemann W., Spiekermann K.
„Detection of a novel *FLT3*-TKD mutation in BCR-ABL positive ALL“, *manuscript in preparation*

Janke H., Schneider F., Schumacher D., Herold T., Hopfner K.P., Schneider S., Berdel W.E., Büchner T., Woermann B.J., Subklewe M., Bohlander S.K., Hiddemann W., *Spiekermann K., **Polzer H.**

„Activating *FLT3* mutations display a wide range of transforming potential and a characteristic pathway profile associated with prognosis in acute myeloid leukemia“, *manuscript submitted*

Abkürzungsverzeichnis

α	Anti, Alpha
A	Ampere, Alanin
Abb.	Abbildung
aCML	atypische chronische myeloische Leukämie
ad	auffüllen auf
AKT	Protein Kinase B
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	engl. adaptor protein with a PH and SH2 domain
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
bp	Basenpaare
C	Cystein
CBF	engl. core binding factor
CBL	engl. casitas B-lineage lymphoma protein
C/EBP α	engl. CCAATT/enhancer binding protein α
CEL-NOC	chronische eosinophile Leukämie
CIN85	engl. Cbl-interacting protein of 85kDa
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CNL	chronische neutrophile Leukämie
CSF-1	engl. colony stimulating factor
CSF1R	engl. colony stimulating factor 1 receptor
D	Aspartat
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E	Glutaminsäure
ECL	engl. enhanced chemoluminescence

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	engl. epidermal growth factor receptor
EPO	Erythropoetin
ET	essentielle Thrombozythämie
F	Phenylalanin
FACS	engl. fluorescence activated cell sorter
FGF1R	engl. Fibroblast growth factor 1 receptor
FKS	fötales Kälberserum
FL	FLT3-Ligand
FLT3	engl. FMS-like tyrosin kinase 3
g	Erdbeschleunigung, Gramm
G	Glycin, Guanin
Gab	eng. GRB2-associated-binding protein
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V.
GFP	engl. green fluorescent protein
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
Gly	Glycin
GRB2	engl. growth factor receptor-bound protein 2
H	Histidin
HBS	engl. hepes-buffered saline solution
HDAC	Histondeacetylase
HECT	engl. homologous to the E6-AP carboxyl terminus
HES	Hypereosinophiles Syndrom
HRP	engl. horseradish peroxidase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IL-3	Interleukin-3
IRES	engl. internal ribosomal entry site
ITD	engl. internal tandem duplication
JM	juxtamembranös
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
K	Lysin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KI	Interkinase
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
l	Liter
LTR	engl. long terminal repeat

M	Molar (mol / l)
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinase
MCS	engl. multiple cloning site
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MDM2	engl. murine double minute
mg	Milligramm
min	Minute
MPL	Thrombopoietin-Rezeptor
MPN	myeloproliferative Neoplasien
MPN-u	unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien
MSCV	engl. murine stem cell virus
mTORC	engl. mammalian target of rapamycin complex
N	Asparagin
NPM1	Nucleophosmin
Nr.	Nummer
PBS	engl. phosphat buffer saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PDGF	engl. platelet-derived growth factor
PDGFR	engl. platelet-derived growth factor receptor
PDK1	phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
Ph	Philadelphia-Chromosom
PH	Pleckstrin-Homologie
Phe	Phenylalanin
PMF	primäre Myelofibrose
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PV	Polycythemia vera
RA	refraktäre Anämie
RCUD	refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie
rh	rekombinant human
RING	engl. really interesting new gene
rpm	engl. rounds per minute
RT	Raumtemperatur

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SB1	engl. SETA binding protein 1
SCF	engl. stem cell factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SFK	engl. src family kinase
SH2	engl. SRC-homology 2
SH3	engl. SRC-homology 3
SHP-2	engl. SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2
STAT5	engl. signal transducer and activator of transcription 5
TET	Tet-Methylcytosin-Dioxygenase
TM	transmembranös
TPO	Thrombopoetin
TKB	Tyrosinkinasebindung
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
U	engl. unit
UBA	engl. ubiquitin-associated domain
UBCH8	engl. ubiquitin-conjugating enzyme H8"
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor
VEGFR	engl. vascular endothelial growth factor receptor
VCM	engl. virus containing medium
W	Tryptophan
WHO	engl. World Health Organization
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
YFP	engl. yellow fluorescent protein
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
7-AAD	7-Aminoactinomycin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Akute myeloische Leukämie.....	1
1.2 Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3	3
1.2.1 Aufbau der FMS-like Tyrosinekinase 3 (FLT3).....	3
1.2.2 Mutationen und Signalwege des FLT3-Rezeptors.....	5
1.3 Casitas B-lineage lymphoma (CBL)	8
1.3.1 Aufbau und Funktion der E3-Ubiquitin-Ligase CBL.....	8
1.3.2 Das Onkogen CBL.....	9
1.4 Zielsetzung.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Plasmide	12
2.1.2 Oligonukleotide	14
2.1.3 Zelllinien.....	17
2.1.4 Antikörper	18
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen	19
2.1.6 Chemikalien	21
2.1.7 Kitsysteme	23
2.1.8 Laborausstattung	24
2.1.9 Software	26
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien	26
2.2.1.2 Chemische Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	27
2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA	27
2.2.1.3.1 Plasmid-Minipräparation.....	27
2.2.1.3.2 Plasmid-Maxipräparation.....	28
2.2.1.4 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme	28
2.2.1.5 Elektrophoretische DNA-Auftrennung	28
2.2.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	29
2.2.1.7 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren	29
2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
2.2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.2.1.10 Ortsgerichtete Mutagenese	30
2.2.1.11 Sequenzierung	30
2.2.1.12 Extraktion genomischer DNA aus Zellen.....	31
2.2.1.13 Isolation von mRNA aus Zellen	31

2.2.1.14	Synthese von cDNA	31
2.2.1.15	<i>Real-Time</i> -PCR	32
2.2.2	Zellbiologische Methoden	32
2.2.2.1	Zellkulturbedingungen	32
2.2.2.1.1	Kultur von adhärenent wachsenden Zellen	32
2.2.2.1.2	Kultur von Suspensionszellen	33
2.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
2.2.2.3	Transiente Transfektion von Zellen	33
2.2.2.4	Stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen	34
2.2.2.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	35
2.2.2.6	Apoptose-Test durch Annexin-V- und 7-AAD-Färbung	36
2.2.2.7	Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie	36
2.2.2.8	Internalisierung von Rezeptoren	37
2.2.2.9	Hungern und Stimulation der Zellen vor Zelllyse	37
2.2.2.10	Zellen-Test auf Mykoplasmen und Behandlung	37
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.3.1	Präparation von Zelllysaten	39
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	39
2.2.3.3	SDS-Polyadrylamid-Gelelektrophorese	40
2.2.3.4	Western-Blot	41
2.2.3.5	Immunpräzipitation	41
2.2.3.6	Strippen der Nitrocellulose-Membran	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Funktionelle Charakterisierung von CBL-Mutanten in rezeptor- exprimierenden Zellen	43
3.1.1	Unterschiedliches liganden-induziertes Wachstum bei rezeptor- exprimierenden Zellen	43
3.1.2	Unterschiedlich starker pro-proliferativer Phänotyp in rezeptor- exprimierenden Zellen durch CBL-Mutanten	46
3.1.3	Verstärkung der Proliferation von RTK-Klasse-III-exprimierenden Zellen durch CBL-Mutanten	48
3.1.4	Apoptoseresistenz nach Zytokin-Entzug durch CBL-Mutanten	50
3.1.5	Verzögerung der Internalisierung der Klasse-III-Rezeptor- Tyrosinkinase durch CBL Δ exon8	51
3.1.6	Verstärkung der Phosphorylierung der RTK-Klasse-III nach Ligandstimulation durch die CBL-Deletionsmutante	52
3.1.7	Verhinderung der CBL-induzierten Proliferation durch pharmakologische Inhibition der Rezeptoren	53
3.1.8	Verhinderung des pro-proliferativen Phänotyps der CBL-Mutante durch Koexpression eines Kinase-inaktiven Rezeptors	55
3.1.9	Einfluss von CBL-LINKER-Mutanten auf Proliferation und Apoptose in FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen	56

3.1.10 Screening von CMML-Patienten auf CBL-LINKER/RING-Finger-Mutationen	58
3.1.11 Beeinträchtigung der E3-Aktivität durch Mutationen im LINKER und RING-Finger	59
3.2 AKT als Mediator der CBL-induzierten Transformation	60
3.2.1 Verstärkung der AKT-Phosphorylierung in RTK-Klasse-III/CBL Δ exon8-Zellen nach Ligandstimulation.....	60
3.2.2 Hemmung der Proliferation der RTKIII-WT/CBL Δ exon8-Zellen durch pharmakologische Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges	61
3.2.3 Dephosphorylierung von AKT durch PI3K-Inhibitor LY294002.....	62
3.2.4 Korrelation von AKT-Phosphorylierung mit der Proliferation der CBL-Mutanten	63
3.2.5 Inhibitorisch-synergistischer Effekt in FLT3-WT/CBL Δ exon8 Ba/F3-Zellen bei Kombination mit FLT3- und AKT-Inhibitoren	64
3.2.6 Transformierender Phänotyp der AKT1-E17K-Mutante in FLT3-exprimierenden Zellen	65
3.2.7 Signalübertragung der AKT- und CBL-transduzierten FLT3-exprimierenden Zellen	67
3.2.8 Hemmung der AKT1-mutante-induzierten Proliferation durch AKT- und FLT3-Inhibitoren.....	68
3.2.9 Kombination aus AKT- und FLT3-Inhibitoren in AML-Zelllinien	69
3.3 Identifizierung von FLT3- und CBL-Interaktionsstellen	72
3.3.1 Stabile Expression der Interaktionsmutanten in Ba/F3-Zellen.....	72
3.3.2 Abschwächung des transformierenden Phänotyps der CBL-Mutante durch Mutationen in der juxtamembranösen Domäne von FLT3.....	73
3.3.3 Schwächung des transformierenden Phänotyps der CBL-Mutante durch die Mutationen G306E und Y731F.....	74
3.3.4 Aufhebung der Verzögerung der Internalisierung von FLT3 in CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen durch Interaktionsmutanten.....	75
3.4 Funktionelle Charakterisierung von chimären EGFR/FLT3-Rezeptoren.....	76
3.4.1 Proliferation und Apoptose der chimären Rezeptoren	78
3.4.2 Signalübertragung der chimären Rezeptoren	79
3.4.3 Transformierender Phänotyp von CBL Δ exon8 in Kooperation mit chimären Rezeptoren.....	80
3.4.4 Hemmung der CBL-induzierten Proliferation durch pharmakologische Inhibition der Rezeptoren.....	81
3.4.5 Signalübertragung der chimären Rezeptor/CBL Δ exon8-Zellen	81
3.5 Funktionelle Charakterisierung von FLT3-Mutationen in akuten Leukämien .	82
3.5.1 FLT3-Mutationen in Leukämie-Zelllinien und primären Ph ⁺ ALL-Proben	82
3.5.1.1 Einfluss der FLT3-D839N-Mutation auf Proliferation und Apoptose	83
3.5.1.2 Konstitutive Aktivierung von Rezeptor und Signalproteinen durch FLT3-D839N-Mutation.....	84
3.5.1.3 Wirkungslosigkeit von FLT3-Inhibitoren in der FLT3-D839N/BCR-ABL-Zellen.....	85

3.5.2 FLT3-Mutation N676K in CBF-AML-Patienten	89
3.5.2.1 Proliferationverstärkung und Apoptoseresistenz durch FLT3-N676K-Mutation.....	89
3.5.2.2 Konstitutive Aktivierung des FLT3-Signalweges durch FLT3-N676K-Mutation.....	91
3.5.2.3 Resistenzvermittlung gegenüber PTK-Inhibitoren durch FLT3-N676K-Mutation.....	92
3.5.3 HDAC-Inhibition als Therapiestrategie in FLT3-ITD-Zellen	93
4 Diskussion	95
4.1 Kooperation von CBL-Mutanten mit RTK-Klasse-III-Rezeptoren	95
4.2 AKT als Mediator der CBL-induzierten Transformation	98
4.3 Therapiestrategien in CBL-mutierten Tumoren	101
4.4 Interaktion von CBL mit der juxtamembranösen Domäne von FLT3	103
4.5 Rolle der juxtamembranösen Domäne in der Signalübertragung von Rezeptor-Tyrosinkinasen	105
4.6 FLT3 Mutationen in der AML und ALL	108
4.6.1 FLT3-TKD-Mutation in ALL.....	108
4.6.2 FLT3-TKD-Mutation in CBF-Leukämien.....	111
4.6.3 Verwendung von HDAC-Inhibitoren in FLT3-ITD-Zellen	112
5 Zusammenfassung	114
6 Abstract	116
7 Literaturverzeichnis	118
8 Anhang	134
8.1 Abbildungsverzeichnis	134
8.2 Tabellenverzeichnis	135
9 Danksagung	138

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Laut der gemeinsamen Publikation der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut „Krebs in Deutschland 2007/2008“ (2012) erkrankten im Jahre 2008 469.900 Menschen an Krebs. Jeder vierte Todesfall in Deutschland war krebsbedingt. Dabei fallen 2,5% der Krebsneuerkrankungen auf Leukämieerkrankungen - hiervon 25-29% auf die akute myeloische Leukämie (AML) [1]. Leukämien sind Erkrankungen des blutbildenden Systems, die zu einer stark erhöhten Bildung meist funktionsuntüchtiger Vorläuferzellen bei Leukozyten führen. Durch die Expansion dieser Blasten wird die normale Hämatopoese gestört und verdrängt. Dies führt durch den Mangel an funktionstüchtigen Blutzellen zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie. Leukämien werden nach ihrem Krankheitsverlauf in akute oder chronische und nach dem beteiligten Zelltyp in myeloische oder lymphatische Formen eingeteilt. Akute Leukämien sind mit einem Blastenanteil im Knochenmark oder Blut von über 20% aller Zellen definiert und von Anfang an lebensbedrohliche Erkrankungen, die in wenigen Wochen bzw. Monaten zum Tode führen können. Chronische Leukämien verlaufen dagegen über mehrere Jahre und sind anfangs symptomarm. Die AML gehört zu den myeloischen Neoplasien, d.h. die entarteten Zellen gehören zur myeloischen Zellreihe und entstammen dem Knochenmark. Die AML wird zytomorphologisch nach der FAB-(French-American-British)-Klassifizierung in verschiedene Subtypen (M0-M7) eingeteilt [2]. Über die letzten Jahre wurden zytogenetische und molekularbiologische Analysen entwickelt um die einzelnen Subtypen besser zu definieren und somit durch eine bessere Spezifizierung der Therapieansätze die Überlebenschancen der Patienten zu erhöhen. Die Ergebnisse dieser Analysen und die FAB-Klassifizierung wurden in die neue WHO-Klassifizierung integriert, wodurch vier Kategorien unterschieden werden (siehe Tabelle 1.1) [3, 4]. Tabelle 1.1 zeigt neben der AML die WHO-Klassifizierung der anderen myeloischen Neoplasien auf:

Beim myelodysplastischen Syndrom handelt es sich um Knochenmarkserkrankungen, bei der funktionsunfähige Blutzellen aus genetisch veränderten Stammzellen entstehen.

Bei myeloproliferativen Neoplasien kommt es zu einer klonalen Expansion einer Zellreihe.

Myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien zeigen sowohl eine dysplastische Zellveränderung als auch eine effektive Proliferation einer oder mehrerer Zellreihen.

Außerdem gibt es myeloische Neoplasien, die verbunden sind mit Eosinophilie und Abnormalitäten in den Rezeptoren „platelet-derived growth factor receptor alpha“ (PDGFRA),

„platelet-derived growth factor receptor beta“ (PDGFRB) oder „fibroblast growth factor 1 receptor“ (FGF1R).

Tabelle 1.1: Klassifizierung der myeloischen Neoplasien. Einteilung nach der WHO (World Health Organization) 2008-Klassifizierung [2].

Kategorien	Leukämieformen
Akute myeloische Leukämie (AML)	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen • AML mit Myelodysplasie induzierten Veränderungen • Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes MDS • AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit
Myelodysplastische Syndrome (MDS)	<ul style="list-style-type: none"> • Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD) • Refraktäre Anämie (RA) • Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS) • Refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB) • Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD) • MDS mit isolierter Deletion 5q • Unklassifizierbare MDS
Myeloproliferative Neoplasien (MPN)	<ul style="list-style-type: none"> • Chronische myeloische Leukämie (CML) • Polycythemia vera (PV) • Essentielle Thrombozythämie (ET) • Primäre Myelofibrose (PMF) • Chronische neutrophile Leukämie (CNL) • Chronische eosinophile Leukämie (CEL-NOC) • Hypereosinophiles Syndrom (HES) • Mastozytose • Unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien (MPN-u)
Myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN)	<ul style="list-style-type: none"> • Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) • Juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) • Atypische chronische Leukämie (aCML) • Unklassifizierbare MDS/MPN
Myeloische Neoplasien verbunden mit Eosinophilie und PDGFRA-, PDGFRB- oder FGFR1-Abnormalitäten	

Die zwei häufigsten somatischen Genmutationen in der AML betreffen das Nucleophosmin (*NPM1*)-Gen und das Gen für die Rezeptor-Tyrosinkinase „fibroblast-macrophage stimulating factor receptor (FMS)-like tyrosine kinase 3“ (FLT3) mit 35% bzw. 30% aller AML-Fälle [3-6]. Die Mutationsanalyse dieser zwei Gene ist in der AML von großer prognostischer Bedeutung. In den letzten Jahren wurden immer mehr Genmutationen in myeloischen Neoplasien gefunden z.B. in Genen, die bei der epigenetischen Regulation der Gentranskription beteiligt sind, wie *IDH1/2*, *TET2* und *DNMT3A* [7]. Für viele seltenere Genmutationen, z.B. im „casitas B-lineage lymphoma“-(*CBL*)-Gen bei ca. 1% aller AML-Patienten ist ein prognostischer Nutzen noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen [8]. Die ersten

CBL-Mutationen wurden bei AML-Patienten gefunden, treten aber generell in myeloischen Neoplasien auf - am häufigsten in der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) und in der juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML) [9, 10]. Insbesondere Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), wie FLT3, haben eine lange und große Bedeutung bei vielen humanen Krankheiten.

1.2 Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3

1.2.1 Aufbau der FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3)

Proteintyrosinkinasen (PTK) sind Enzyme, die den Transfer des γ -Phosphats des Adenosintriphosphats (ATP) zu einem Tyrosin eines Polypeptids katalysieren. Tyrosinkinasen werden in zwei große Familien eingeteilt: Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rezeptor-Tyrosinkinasen. Im humanen Genom kodieren 58 Gene die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), die wiederum in 20 Familien aufgeteilt werden [11]. Einige Familien sind in Abbildung 1.2.1.1 schematisch dargestellt.

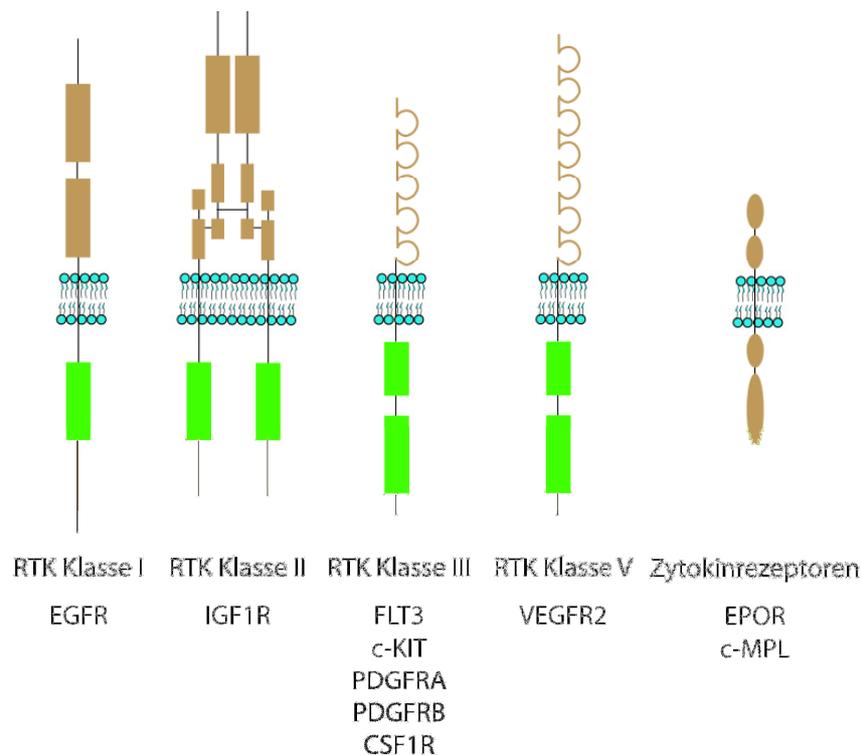


Abb. 1.2.1.1: Rezeptorfamilien. Die in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren sind ihren Rezeptorfamilien zugeteilt. In Grün sind die intrazellulären Kinasedomänen der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) gezeigt.

RTKs sind Proteine, die die Membran einmal durchspannen und zumindest eine zytoplasmatische intrinsische Kinasedomäne besitzen. Diese Kinasedomäne unterscheidet diese Rezeptorengruppe von anderen Rezeptoren, wie z.B. Zytokinrezeptoren, die keine eigene Kinasedomäne besitzen und daher mit zytosolischen Kinasen assoziieren müssen. Dabei unterscheidet vor allem die extrazelluläre ligand-bindende Domäne die verschiedenen RTKs voneinander. Die darauffolgenden transmembranösen-(TM)-Domänen der RTKs teilen eine gemeinsame α -helikale Struktur und verankern die Rezeptoren in der Zellmembran, spielen aber auch bei der Rezeptoraktivierung eine wichtige Rolle. Die juxtamembranöse-(JM)-Domäne trennt die TM-Domäne von der Kinasedomäne und ist zwischen den einzelnen RTK Familien sehr verschieden, jedoch innerhalb einer Familie stark konserviert. Die Kinasedomäne ist generell die am stärksten konservierte Domäne der RTKs. Hanks und Kollegen definierten 12 Untereinheiten von hoher Homologie, die zumindest neun unveränderliche Aminosäuren besitzen, die das aktive Zentrum bilden [12]. Durch kristallographische Arbeiten hat sich eine konservierte Struktur der Kinasedomäne aus acht α -Helices und acht β -Faltblättern herausgestellt [13]. Alle Tyrosinkinase-Domänen bestehen aus drei großen Proteindomänen, die einige der oben genannten unabdingbaren Aminosäuren beinhalten. Das ist zum Einen die Aktivierungsschleife, zum Zweiten die Nukleotidbindungsdomäne und zum Dritten die katalytische Schleife. Durch die Konformation der Aktivierungsschleife wird die Kinase-Aktivität reguliert und diese wiederum durch Phosphorylierungen spezifischer Tyrosine kontrolliert.

Der FLT3-Rezeptor wurde erstmals 1991 von zwei Gruppen über einen Hybridisierungs- bzw. PCR-Ansatz isoliert [14-16]. Das humane FLT3 besteht aus 993 Aminosäuren und kommt als ein schwach glykolisiertes unreifes Protein mit 130-140 kDa und als ein stärker glykolisiertes, in der Zellmembran lokalisiertes Protein mit 155-160 kDa in der Zelle vor [17]. Es wird hauptsächlich in dendritischen Zellen, hämatopoetischen Stamm- und frühen Vorläuferzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei Überleben und Wachstum dieser Zellen. Die Expression von humanen FLT3 nimmt dann mit Zunahme der Zelldifferenzierung ab und verschwindet nach der Stufe der lymphoiden bzw. granulozytär-monozytären Vorläufer komplett [16, 18].

Der FLT3-Rezeptor gehört zu den Klasse-III-RTKs. Sie sind charakterisiert durch 5 extrazelluläre immunglobulin-ähnliche Domänen, einer JM-Domäne und zweier Proteintyrosinkinase-Domänen (PTKs), die durch eine Interkinase-Domäne (KI) getrennt sind [19] (Abb. 1.2.1.2). Diese Rezeptorfamilie beinhaltet die Proteine FLT3, Stammzellfaktorrezeptor (KIT), „colony-stimulating factor 1“-Rezeptor (CSF1R), PDGFRA und PDGFRB. Wie die Rezeptoren der RTK-Klasse-III sind auch deren Liganden in ihrer Aminosäuresequenz und Struktur stark homolog [20].

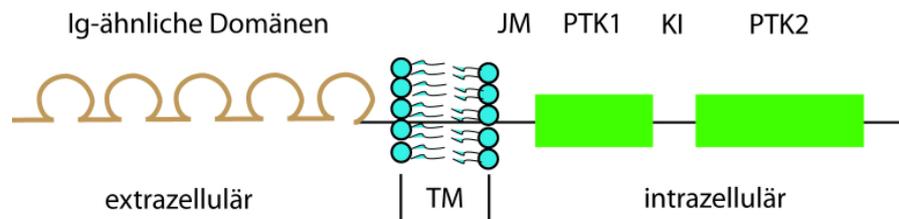


Abb. 1.2.1.2: Struktur einer Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinase. Klasse-III-RTKs bestehen extrazellulär aus fünf immunglobulin-ähnlichen Domänen, aus einer transmembranösen Domäne (TM), sowie intrazellulär aus einer juxtamembranen Domäne (JM) und zwei Proteintyrosinkinase-Domänen (PTK), die durch eine Interkinase-Domäne (KI) getrennt sind.

1.2.2 Mutationen und Signalwege des FLT3-Rezeptors

Inaktive RTKs sind meist als Monomere in der Membran lokalisiert. Aktiviert werden sie durch die Bindung ihres spezifischen Liganden. Der bewirkt eine ligand-induzierte Oligomerisation und eine Tyrosin-Autophosphorylierung der Rezeptoruntereinheiten [21]. Einige Liganden sind Dimere, z.B. FLT3-Ligand (FL), andere sind Monomere mit zwei Rezeptorbindungsdomänen, z.B. „epidermal growth factor“ (EGF). Die Bindung des jeweiligen Liganden führt zu einer Rotation der RTKs innerhalb des Ligand-Rezeptoren Komplexes, so dass konservierte hydrophobe Reste der TM-Domänen Wasserstoffbindungen eingehen und die Rezeptordimere fixieren [22]. Dadurch interagieren die Kinase-Domänen der einzelnen Rezeptoren. Die Aktivierungsschleifen werden in den aktiven Zustand gebracht und eine Transphosphorylierung ermöglicht [23]. Das wiederum aktiviert die katalytische Aktivität und erzeugt phosphorylierte Tyrosinreste, die als Bindungsstellen für zytoplasmatische Signalproteine mit Src-Homologie-2 (SH2) und Proteintyrosinbindungs-Domänen (PTB) dienen.

Wachstumsfaktorrezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Apoptose, Stoffwechsel, Zellzyklus und Differenzierung und unterliegen einer strengen Regulation. Aufgrund ihrer großen Bedeutung ist es nicht verwunderlich, dass die meisten RTKs als Proto-Onkogene Zellen transformieren können. Klasse-III-RTKs sind häufig in hämatologischen Tumoren mutiert. PDGFRA-Fusionen werden in atypischer chronischer Leukämie (aCML), hypereosinophiler Leukämie (HES) und in der Mastozytose gefunden. Fusionen des *PDGFRB*-Gens sind in der AML, aCML, chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) und in myeloischen Neoplasien mit Eosinophile beschrieben. Punktmutationen und der Verlust eines Allels sind im Falle des *CSF1R*-Gens in der AML, CMML und im myelodysplastischen Syndrom (MDS) beschrieben. KIT-Punktmutationen und Deletionen treten in der AML, MDS und in Mastozytosen auf.

Insertionen und Punktmutationen des FLT3-Rezeptors sind in der AML, MDS und der akuten lymphblastischen Leukämie beschrieben [24, 25].

Die häufigsten FLT3-Mutationen stellen Duplikationen von Aminosäuren der juxtamembranösen Domäne dar, die „internal tandem duplication“ (ITD)-Mutationen genannt werden. Die Länge und Position der ITDs variiert. Alle bisher untersuchten Mutationen bewirken jedoch eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors [26, 27]. Ungefähr 20-25% aller AML Patienten tragen zumindest auf einem Allel eine ITD-Mutation. Der ITD-Status korreliert deutlich mit einer schlechten Prognose und einer höheren Gefahr eines Rezidivs [28, 29]. Eine weitere häufige FLT3-Mutation betrifft die zweite Kinasedomäne, bei der das Aspartat 835 meist gegen ein Tyrosin ausgetauscht wird. Diese Mutation in der Tyrosinkinasedomäne (TKD) ist in 5-7% aller AML-Patienten zu finden und bewirkt eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors. Eine prognostische Relevanz ist für diese Mutation jedoch bisher nicht bewiesen [30, 31].

Neben dem Rezeptor sind Mutationen in vielen nachgeordneten Signalwegen von FLT3 in der AML und anderen leukämischen Erkrankungen nachgewiesen worden (Abb. 1.2.2). Der Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K)-Signalweg ist einer der Signalwege, der durch RTKs aktiviert wird. PI3-Kinasen sind Lipidkinasen, die das membrangebundene Lipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zum Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) phosphorylieren. RTKs aktivieren Klasse-1A-PI3Ks. Diese sind heterodimere Komplexe aus der katalytischen Untereinheit p110 und der regulatorischen Untereinheit p85, die zwei Src-Homologie-2-(SH2)-Domänen besitzen [32]. Die ungebundene p85-Untereinheit bindet tyrosin-phosphorylierte Proteine durch ihre SH2-Domänen und hat dadurch mehr Funktionen. Ein Hauptziel nach PI3K-Aktivierung ist die Serin/Threonin-Kinase oder Proteinkinase B (AKT). Diese vermittelt das Überleben und die Proliferation der Zellen. AKT wird über dessen Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domäne von PIP₃ zur Zellmembran rekrutiert und am Threonin 308 durch die 3-phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) phosphoryliert [33, 34]. Eine zweite Phosphorylierung des Serin 473 durch den „mammalian target of rapamycin complex 2“ (mTORC2) ist nötig, um AKT zu aktivieren. AKT selbst aktiviert viele Proteine, die eine Rolle in Apoptose und Proliferation spielen [35]. Viele RTKs binden direkt an die p85-Untereinheit - andere, unter Anderem FLT3, besitzen kein direktes Bindungsmotiv. Diese Rezeptoren aktivieren PI3K über Gab1, Gab2 oder Ras [36, 37].

Das Signalprotein STAT5 „signal transducer and activator of transcription 5“ spielt eine entscheidende Rolle bei der Transformation durch FLT3-ITD und trägt zu der Entstehung von AML und Polycythemia vera bei [38, 39]. Das Protein ist als Monomer im Zytoplasma lokalisiert. Durch Phosphorylierung bildet es Dimere und gelangt in den Nukleus. Dort bindet es an DNA und leitet die Gentranskription ein. STAT5 ist in Verbindung gebracht worden mit

einer erhöhten Expression der antiapoptotischen Proteine BCL-XL und PIM-1 und der proliferativen Proteine CyclinD1 und c-myc [40].

Die E3-Ubiquitin-Ligase CBL, ein negativer Regulator von FLT3 und anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen, bindet an phosphorylierte Tyrosine des aktivierten Rezeptors. Durch Ubiquitinierung des Rezeptors leitet sie die Internalisierung und schließlich den Abbau des Rezeptors ein. Das „SETA binding protein 1“ (SB1) interagiert während der Endozytose mit CBL und CIN85 („CBL-interacting protein of 85 kDa“).

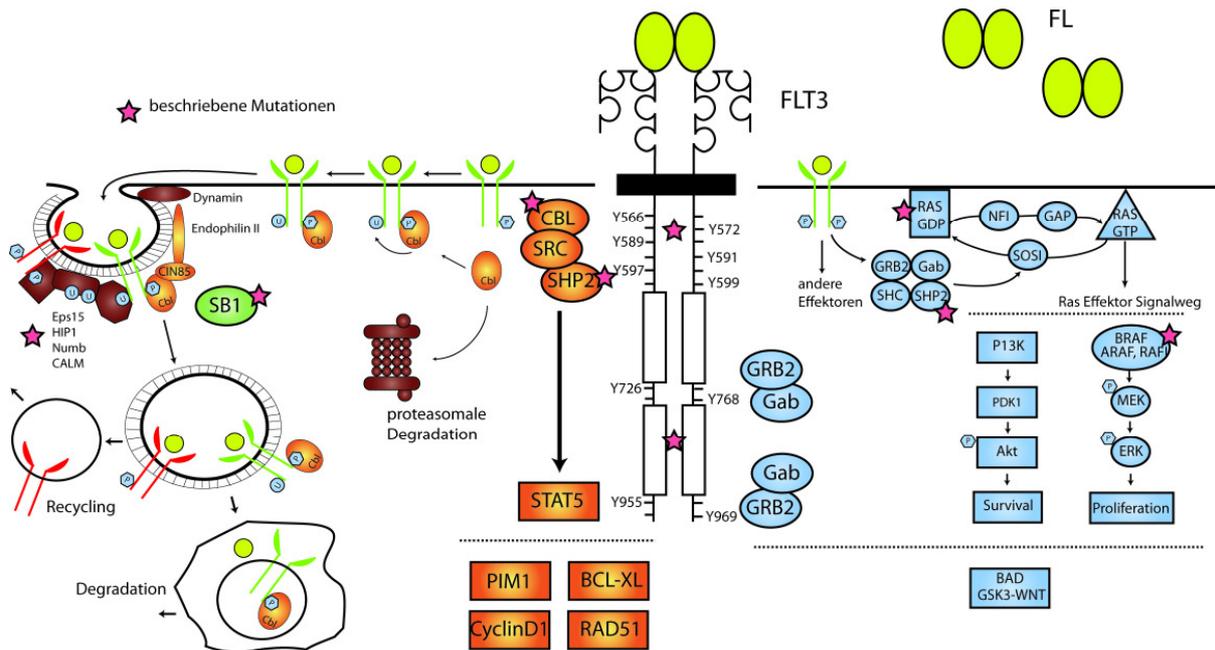


Abb. 1.2.2: Onkogene im FLT3-Signalweg. Der aktivierte FLT3-Rezeptor ist der Ausgangspunkt vieler Signalwege, die neben dem Rezeptor selbst in vielen leukämischen Entitäten durch Mutationen in verschiedenen Genen aberrant aktiviert sind.

FLT3 ist ein bedeutendes Therapieziel in der AML. In klinischen AML-Studien befinden sich mehrere FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), für die bewiesen wurde, dass sie spezifisch auf AML-Blasten wirken [41-43]. Jedoch haben Monotherapien nicht den erhofften Effekt. Daher werden sie in Kombination mit anderen Substanzen getestet, z.B. konventioneller Chemotherapie oder epigenetische Krebstherapeutika wie Histondeacetylasen-Inhibitoren. Ein generelles Problem der Krebstherapie ist es neben den Blastenzellen auch die Krebs-Stammzellen zu eliminieren. Diese Zellen besitzen die gleichen Eigenschaften wie normale Stammzellen, sie können sich unbegrenzt teilen und differenzieren und stellen somit die Quelle des Tumors dar. Da diese Zellen sich häufig in Ruhephasen und in einer schützenden Stammzellnische befinden, sind sie kaum angreifbar [44]. Die ersten Krebs-Stammzellen wurden in der AML beschrieben [45], dieses Krebsstammzell-Modell wird für alle Tumoren angenommen und ist seitdem in vielen Entitäten nachgewiesen worden. Die Krebs-

Stammzellen sind der Grund warum trotz erfolgreicher Therapie häufig nach einer gewissen Zeit ein Rezidiv eintritt. Denn die meisten angewandten Therapien zielen auf die Zerstörung von Zellen mit einer hohen Proliferationsrate ab und vermögen nicht die ruhenden Stammzellen auszulöschen. Eine große Herausforderung ist es daher, diese Zellen näher zu charakterisieren und Therapiestrategien zu entwickeln.

1.3 Casitas B-lineage lymphoma (CBL)

1.3.1 Aufbau und Funktion der E3-Ubiquitin-Ligase c-CBL

Die Übertragung von Ubiquitin und Ubiquitin-ähnlichen Polypeptiden an zelluläre Proteine ist ein Schlüsselmechanismus zur Regulation von vielen Prozessen in der Zelle [46]. Ubiquitinierung findet durch drei aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen statt. E3 Ubiquitin-Ligasen sind dabei für den letzten Schritt, den Transfer des Ubiquitins auf das Substrat, zuständig. E3-Ubiquitin-Ligasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen anhand der für die Ubiquitinierung notwendigen Domäne. RING „really interesting new gene“ E3-Ligasen mit RING-Finger und HECT „homologous to the E6-AP carboxyl terminus“ E3-Ligasen mit HECT-Domäne. RING-E3-Enzyme bestehen aus einem einzelnen Protein oder einem Proteinkomplex und können gleichzeitig E2-Enzym und Substrat binden und ohne eine Zwischenstufe Ubiquitin übertragen. Je nachdem, ob dem Substrat einzelne Ubiquitinmoleküle (Monoubiquitinierung) oder Ubiquitinketten (Polyubiquitinierung) angeheftet werden, ist es für die Endozytose oder den proteasomalen Abbau markiert. Das „casitas B-lineage lymphoma“ (CBL) Protein ist eine RING-E3-Ubiquitin-Ligase und gehört bei Säugetieren zu einer Familie aus drei Proteinen, CBL (c-CBL), CBL-b und CBL-3 [47, 48]. CBL ist ein 120 kDa großes und hoch konserviertes Protein in mehrzelligen Organismen und ein negativer Regulator von Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und Kinase-assoziierten Rezeptoren [49, 50]. Das aus 906 Aminosäuren bestehende Protein ist im Zytoplasma lokalisiert und weist die höchste Expression in hämatopoietischen Zellen und im Hoden auf.

Das Protein besteht aus mehreren konservierten Domänen mit unterschiedlichen Funktionen (Abb. 1.3.1). Am N-Terminus befindet sich die stark konservierte Tyrosinkinase-Bindungsdomäne (TKB), über diese Domäne bindet CBL an phosphorylierte Tyrosine der aktivierten Rezeptoren [51]. Es bindet auch an CIN85; dieses wiederum ist konstitutiv-assoziiert mit Endophilinen - einer Proteinfamilie, die die Invagination der Plasmamembran bei der Internalisierung kontrollieren [52-55]. CBL bleibt bis zu den späten Endosomen an den Rezeptor gebunden und gewährleistet durch Ubiquitinierungen den clathrin-abhängigen

Rezeptorabbau [56-58]. Die TKB-Domäne selbst besteht aus drei Unterdomänen: einem Bündel aus vier α -Helices, einer Kalzium-bindenden EF-Hand (EF) und einer Src-Homologie-2-(SH2)-Domänenvariante. Alle drei sind an der Stabilisierung der Protein-Protein-Interaktion beteiligt. Sowohl die LINKER- als auch die RING-Finger-Domäne von CBL sind essentiell für die Ubiquitin-Ligase (E3)-Aktivität. Der RING-Finger rekrutiert Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und vermittelt den Ubiquitintransfer auf das Zielprotein [59]. Die LINKER-Region ist entscheidend für die korrekte Positionierung der TKB-Domäne zum RING-Finger, um einen effizienten Ubiquitintransfer zu gewährleisten [60]. Durch die Prolin-reiche Region und C-terminale Phosphorylierungsstellen fungiert CBL als multi-Adaptorprotein und dient als Plattform für viele Signalmoleküle [61]. Es rekrutiert z.B. die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K durch Tyrosin 731 zur Zellmembran und kann somit einen positiven Einfluss auf die Aktivität der PI3K nehmen [62]. Andere Interaktionspartner der Prolin-reichen Region sind, der bei der clathrin-vermittelten Endozytose beteiligte CIN85-Endophilin Komplex [63], das Adaptorprotein Grb2 [64] und Mitglieder der Src-Kinase-Familie [65-68]. Am C-Terminus des Proteins befinden sich die „ubiquitin-assoziierte“ (UBA)-Domäne und eine Leuzin-Zipper (LZ)-Domäne, welche eine Dimerisierung von CBL ermöglicht [69, 70].

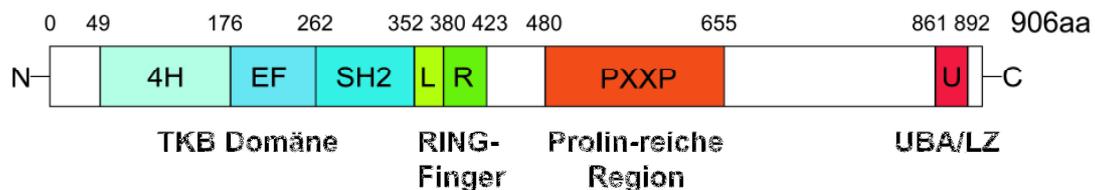


Abb. 1.3.1: Domänen des CBL Proteins. Die N-terminale Tyrosinkinasebindungs-Domäne (TKB) besteht aus einem Bündel von 4 Helices (4H), einer Kalzium-bindenden EF-Hand (EF) und einer Src-Homologie-2 (SH2)-Domänenvariante. Die TKB-Domäne wird durch eine Linker-Region (L) von einer Zink-bindenden C3HC4-RING Finger-Domäne (R) getrennt. Danach folgt eine Prolin-reiche-Region (PXXP) und C-terminal eine Ubiquitin-assoziierte (UBA)- und eine Leuzin-zipper-Domäne (LZ).

1.3.2 Das Onkogen CBL

Das Proto-Onkogen CBL wurde zuerst in hämatologischen Tumoren von Mäusen identifiziert, die mit dem Cas-NS1-Retrovirus infiziert waren, das pro-B-Lymphome und myeloische Leukämien induziert [71]. Dieses virale CBL (v-CBL) ist ein verkürztes Protein, das nur noch aus der TKB-Domäne besteht und in seiner Funktion als Ubiquitin-Ligase beeinträchtigt ist [69]. Das transformierende Potential von v-CBL geht durch eine Punktmutation in der TKB-Domäne (G306E) verloren [51, 72]. Ein weiteres onkogenes CBL, CBL-70Z, wurde aus der murinen 70Z/3 pro-B-Zell-Lymphom-Zelllinie isoliert [69]. In CBL-70Z sind Teile der LINKER- und RING-Finger-Domäne deletiert.

Im Menschen wurden Mutationen im *CBL*-Gen in myeloproliferativen Neoplasien (MPN), im myelodysplastischen Syndrom (MDS) aber auch im epithelialen Lungenkrebs gefunden [73-86]. Die erste humane CBL-Mutation wurde in einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) gefunden [87]. Ungefähr 15% der Patienten mit chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) und juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML) haben CBL-Mutationen [74, 76-79, 83, 88]. Der überwältigende Teil aller CBL-Mutationen befindet sich in der LINKER- oder RING-Finger-Domäne [10]. Die häufigsten humanen Mutationen sind in der Abbildung 1.3.2 abgebildet. CBL ist ein bekannter negativer Regulator von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen [61, 89, 90]. Die Expression von onkogenen CBL-Mutanten induziert einen ähnlichen Phänotyp wie aktivierende RTK-Mutanten *in vitro* [8, 87]. Das onkogene Potential von CBL ist neben dem Verlust der E3-Aktivität wohl auch auf eine kompetitive Inhibition des Wildtyp-Proteins und eine verlängerte Signalgebung zurückzuführen. Somit handelt es sich bei onkogenen CBL-Mutationen sowohl um „loss of function“-Mutationen – Verlust von WT-Funktionen – als auch um „gain of function“-Mutationen – Erwerb von neuen Funktionen.

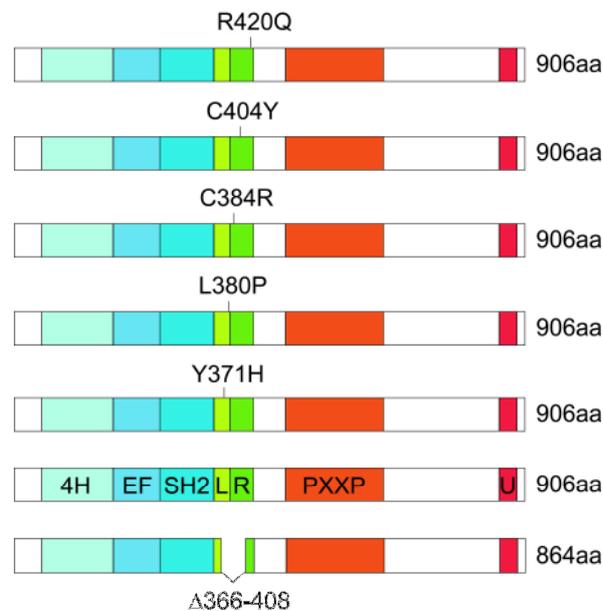


Abb. 1.3.2: Humane CBL-Mutationen. Häufig im *CBL*-Gen gefundene Mutationen. Punktmutationen von Aminosäuren in der LINKER-Region (L380P, Y371H), RING-Finger-Domäne (C384R, C404Y, R420Q) und Deletionen, die beide Domänen betreffen (Δ366-408).

1.4 Zielsetzung

Krebserkrankungen können genetische Ursachen haben. Daher ist die zytogenetische Charakterisierung der verschiedenen Entitäten für die Prognose und zielgerichtete Therapie von großer Bedeutung. Durch moderne Sequenzierungsmethoden werden kontinuierlich neue Genmutationen gefunden. Dabei stellt sich die Frage, ob alle diese Mutationen zur Initiierung oder Aufrechterhaltung des Tumors beitragen (sogenannte Driver-Mutationen) und in welchen Tumorarten welche Mutationen von Bedeutung sind.

Eine Aufgabe der Dissertation ist es, beschriebene Mutationen im Proto-Onkogen CBL funktionell zu charakterisieren. CBL ist ein negativer Regulator von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), greift aber auch in die Signalgebung von Zytokinrezeptoren ein. CBL ist bei der Endozytose, Ubiquitinierung und Degradierung von Rezeptoren beteiligt. Das ubiquitär exprimierte Protein ist somit in sehr vielen Signalkaskaden involviert. Mutationen in CBL wurden als erstes von unserer und anderen Arbeitsgruppen in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und myelodysplastischen Syndrom (MDS) beschrieben. Wir konnten zeigen, dass CBL-Mutationen FLT3-exprimierende Zellen transformieren und, dass das transformierende Potential durch den FLT3-Rezeptor vermittelt wird. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob CBL hauptsächlich mit FLT3 kooperiert, um Zellen zu transformieren, oder ob die Transformation durch CBL einen Mechanismus auch für andere Rezeptoren darstellt. Im Zellmodell wird die Kooperation von CBL-Mutanten mit verschiedenen Rezeptoren untersucht und der kritische Signalweg für CBL-induzierte Transformation identifiziert. Weitere darauf aufbauende Fragestellungen sind die Bestimmung der Interaktionsstellen zwischen CBL und FLT3 durch Einführung von Mutationen in Domänen beider Proteine und die Testung möglicher Therapiestrategien.

Des Weiteren sollten neu gefundene Mutationen des Onkogens FLT3 funktionell charakterisiert werden. Der FLT3-Rezeptor gehört zu der Familie der Klasse-III-RTKs und spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung von Leukämie. Er liegt in gut einem Drittel aller AML-Patienten mutiert vor. Neben der AML treten FLT3-Mutationen auch in der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) auf - dort hauptsächlich Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne (TKD). Für diese TKD-Mutationen ist keine prognostische Bedeutung erwiesen und es fehlen Leukämiezelllinien als Zellmodell. Eine andere Gruppe von FLT3-Mutationen, sogenannte „internal tandem duplications“ (ITD), sind mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Da FLT3-Inhibitoren als Monotherapie bisher nicht den erhofften Erfolg in klinischen Studien zeigen, sollen kooperierende Substanzen für Kombinationstherapien getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

Tabelle 2.1.1: Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Größe	Eigenschaften/Verwendung	Resistenz	Herkunft
pcDNA6A	5,4 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	Invitrogen
pGEM [®] -T Easy	3,0 kb	Klonierung von PCR-Produkten, <i>lacZ</i> in der <i>multiple cloning site</i>	Ampicillin	Promega
pcDNA3.1	5,0 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	Invitrogen
pMSCV-IRES-EGFP	6,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	R.K. Humphries, (Vancouver, CAN)
pMSCV-IRES-EYFP	6,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	R.K. Humphries, (Vancouver, CAN)
Ecopack	12 kb	Retrovirale Transfektion	Ampicillin	Clontech
pRK5 PDGFRA	8,0 kb	Expresssionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
pRK5 PDGFRB	8,1 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
pCDNA3.1 EGFR	8,3 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY BCR ABL	12,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY FLT3wt	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY FLT3 D835Y	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY FLT3 w51	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spierkermann, KKG Leukämie
MIY FLT3 NPOS	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spierkermann, KKG Leukämie
MIY FLT3 N676K	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY FLT3 NPOS N676K	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY FLT3 Y589F	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY FLT3 Y591F	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY FLT3 YY589/591FF	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY FLT3 D839N	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit

MIG FLT3 D839N	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY PDGFRA	9,6 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY PDGFRB	9,7 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY c-Mpl	8,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY c-Kit	9,3 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY EpoR	9,0 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIG CSF1R	9,3 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Joan Brugge (Boston, USA)
MIY CSF1R	9,3 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY IGF1R	10,5 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIY EGFR	9,7 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY EF	9,7 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY FE	9,7 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY EFTC	9,7 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIY FETC	9,7 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
pCDNA3 VEGFR2	9,0 kb			Ballmer-Hofer (Villigen, SUI)
MIY VEGFR2	10,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBLwt	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIG CBL R420Q	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIG CBL 70Z	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIG CBL Δ exon8	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann, KKG Leukämie
MIG CBL G306E	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBL Y371F	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBL Y731F	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBL G306E Y731F	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBL Y371H	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBL YY368/371FF	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBL Δ exon8 G306E	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit
MIG CBL Δ exon8 Y731F	10,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Diese Arbeit

2.1.2 Oligonukleotide

Tabelle 2.1.2: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Annealing-Temperatur	Verwendung
CBLG306E_sense	GGTCAGTGGGCTATTGAGTATGTT ACTGCTGATGG	60 °C	CBL Mutagenese
CBLG306E_antisense	CCATCAGCAGTAACATACTCAATAG CCCCTGACC	60 °C	CBL Mutagenese
CBLY371H_sense	AGTGACCCAGGAACAATATGAATTA CACTGTGAGATGGG	60 °C	CBL Mutagenese
CBLY371H_antisense	CCCATCTCACAGTGTAAATTCATATT GTTCTGGGTCCTACT	60 °C	CBL Mutagenese
CBLY371F_sense	GGAACAATATGAATTATTCTGTGAG ATGGGCTCCACA	60 °C	CBL Mutagenese
CBLY371F_antisense	TGTGGAGCCCATCTCACAGAATAA TTCATATTGTTCC	60 °C	CBL Mutagenese
CBLY731F_sense	CAGCAGATTGATAGCTGTACGTTT GAAGCAATGTATAAT	60 °C	CBL Mutagenese
CBLY731F_antisense	ATTATACATTGCTTCAAACGTACAG CTATCAATCTGCTG	60 °C	CBL Mutagenese
CBLYY368/371F F_sense	AGTGACCCAGGAACAATTTGAATTA TTCTGTGAGATGGGCTCC	60 °C	CBL Mutagenese
CBLYY368/371F F_antisense	GGAGCCCATCTCACAGAATAATTC AAATTGTTCTGGGTCCTACT	60 °C	CBL Mutagenese
FW CBL_Exon8del	TCCCTCACAATAAACCTCTCTTCC	60 °C	CBL Amplifikation
RV CBL_Exon8del	GCCATGGAGAATGGAGASGGC	60 °C	CBL Amplifikation
CBL_Sequ1	CTGCTTCTCTCCCTCGCTC	60 °C	CBL Sequenzierung
CBL_Sequ2	CACTATTGATCTGACCTGCASTGA	60 °C	CBL Sequenzierung
CBL_Sequ3	GGCTGGTGCCASGGTGGAS	60 °C	CBL Sequenzierung
CBL-Seq4	CCTCTACGGCCTTTGGATACAT	60 °C	CBL Sequenzierung
CBL-1431rev	CTTGGCACCAGCCAATTCCTTCAT	60 °C	CBL Sequenzierung
CSF1R_514rev	TCTGAATGAACTTGGCCCTGTGGA	60 °C	CSF1R Sequenzierung
CSF1R_209fwd	GCACCAACAACGCTACCTTCCAAA	60 °C	CSF1R Sequenzierung
CSF1R_716fwd	ACAACAACACCAAGCTCGCAATCC	60 °C	CSF1R Sequenzierung
CSF1R_1175fwd	TGACGTTTGAGCTCACCCCTTCGAT	60 °C	CSF1R Sequenzierung
CSF1R_1827fwd	TGTCCTGAAGGTGGCTGTGAAGAT	60 °C	CSF1R Sequenzierung
CSF1R_2306fwd	TCGCTTCCAAGAATTGCATCCACC	60 °C	CSF1R Sequenzierung
EGFR_289rev	ACTGTGTTGAGGGCAATGAGGACA	60 °C	Sequenzierung EGFR

EGFR_999rev	AAGGCCCTTCGCACTTCTTACACT	60 °C	Sequenzierung EGFR
EGFR_1755rev	GCACACTGGATACAGTTGTCTGGT	60 °C	Sequenzierung EGFR
EGFR_2473rev	TTTGCGATCTGCACACACCAGTTG	60 °C	Sequenzierung EGFR
EGFR_3187rev	TTCCTTGATGGGACAGCTTTGCAG	60 °C	Sequenzierung EGFR
EGFR_2926fwd	CAGCGCTACCTTGTCATTCA	59 °C	EGFR Amplifikation
EGFR_3120rev	TGCACTCAGAGAGCTCAGGA	59 °C	EGFR Amplifikation
EpoR_510fwd	TGAGACACCCATGACGTCTCACAT	60 °C	EpoR Amplifikation
EpoR_1180rev	ATAGTGGCCATGGATGAAGGCTCA	60 °C	EpoR Amplifikation
EpoR_1202rev	TGAGCCTTCATCCATGGCCACTAT	60 °C	EpoR Amplifikation
mEpoR_384fwd	TTCTCCTCGCTATCACCGCATCAT	60 °C	EpoR murin Sequenzierung
mEpoR_884fwd	TCTTCACCACCCACAAGGGTAACT	60 °C	EpoR murin Sequenzierung
mEpoR_1485rev	AGTCTGGGACAAGGCTGTTCTCAT	60 °C	EpoR murin
mEpoR_1202fwd	AACATCTTCCTGCCCGTCTGACTT	60 °C	EpoR murin Sequenzierung
FLT3c2028a_sense	AGCCACGAGAATATTGTGAAACTG CTGGGGGC	60 °C	FLT3 Mutagenese
FLT3c2028a_antisense	GCCCCAGCAGTTTCACAATATTCT CGTGGCT	60 °C	FLT3 Mutagenese
FLT3D839N_sense	GGCTCGAGATATCATGAGTAATTC CAACTATGTTGTCAG	60 °C	FLT3 Mutagenese
FLT3D839N_antisense	CTGACAACATAGTTGGAATTA TGATATCTCGAGCC	60 °C	FLT3 Mutagenese
FLT3Y589F_sense	GGCTCCTCAGATAATGAGTTCTTCT ACGTTGATTTCA	60 °C	FLT3 Mutagenese
FLT3Y589F_antisense	TCTGAAATCAACGTAGAAGAACTCA TTATCTGAGGAGCC	60 °C	FLT3 Mutagenese
FLT3-Seq1	GCGGGCACCGTGCCGCTGCTC	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq2	GCTGGTTCGATGCCCCAGGG	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq3	GAGAGCGTTCCAGAGCCGATC	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq4	GCTGTTTCATGTGAACCATGG	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq5	GCCTACCCACAAATCAGATG	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq6	CCCAACTGCACAGAAGAGATC	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq7	CTCATTCTATGCAACAATTGG	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq8	GCTCTGAAAGAGAGGCACTC	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq9	CCTGGTTCAAGAGAAGTTCAG	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq10	GGATTGGCTCGAGATATCATG	60 °C	FLT3 Sequenzierung
FLT3-Seq11	GCAATCCTGCTGGGCTTTTGA	60 °C	FLT3 Sequenzierung

IGF1R_586rev	TGGTCTTCTCACACATCGGCTTCT	60 °C	IGF1R Sequenzierung
IGF1R_476fwd	TGATCCTGGATGCGGTGTCCAATA	60 °C	IGF1R Sequenzierung
IGF1R_1179fwd	TCATGCCTTGGTCTCCTTGTCTT	60 °C	IGF1R Sequenzierung
IGF1R_1736fwd	TTTACGTCAAGGCTGTGACCCTCA	60 °C	IGF1R Sequenzierung
IGF1R_2220fwd	AGATGTCATGCAAGTGGCCAACAC	60 °C	IGF1R Sequenzierung
IGF1R_2907fwd	TGGAGTGCTGTATGCCTCTGTGAA	60 °C	IGF1R Sequenzierung
IGF1R_3733fwd	ATGCGCATGTGCTGGCAGTATAAC	60 °C	IGF1R Sequenzierung
KIT_535fwd	TACCATCGGCTCTGTCTGCATTGT	60 °C	c-KIT Sequenzierung
KIT_1265fwd	TGAATGGCATGCTCCAATGTGTGG	60 °C	c-KIT Sequenzierung
KIT_1890fwd	TTTGACAGAACGGGAAGCCCTCAT	60 °C	c-KIT Sequenzierung
KIT_2480fwd	AGGAAACGCTCGACTACCTGTGAA	60 °C	c-KIT Sequenzierung
MIGfwd	CCCTTGASCCTCCTCGTTCG	60 °C	MIG/MIY Sequenzierung
MPL_66fwd	AGTCAGCAGCCAAGATGTCTCCTT	60 °C	MPL Amplifikation
MPL_320fwd	TGCACCTCTGGGTGAAGAATGTGT	60 °C	MPL Sequenzierung
MPL_1045fwd	TTCTCTCGCTGCCACTTCAAGTCA	60 °C	MPL Amplifikation Sequenzierung
MPL_1788rev	AGGCTGCAATCTTCGGTAGTCCAT	60 °C	MPL Amplifikation
MPL_1863_fwd	TGCCAACCATTCTACCTACCACT		MPL Sequenzierung
PDGFRA_2389fwd	AGCTTCACCTATCAAGTTGCCCGA	55 °C	PDGFRA Amplifikation
PDGFRA_3160rev	AACCCGTCTCAATGGCACTCTCTT	54 °C	PDGFRA Amplifikation
PDGFRA_242fwd	TTGTGACGGTCTTGGAAAGTGAGCA	60 °C	PDGFRA Sequenzierung
PDGFRA_967fwd	CAGTTGGAAGCTGTCAACCTGCAT	60 °C	PDGFRA Sequenzierung
PDGFRA_1592fwd	TCCTGGTGCTGTTGGTGATTGTGA	60 °C	PDGFRA Sequenzierung
PDGFRA_2389fwd	AGCTTCACCTATCAAGTTGCCCGA	60 °C	PDGFRA Sequenzierung
PDGFRA_3209fwd	TCGACATGATGGATGACATCGGCA	60 °C	PDGFRA Sequenzierung
PDGFRB_1583fwd	TGCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCT	55 °C	PDGFRB Amplifikation Sequenzierung
PDGFRb_2284rev	TGACGTCTCCTTTCATGTCCAGCA	53 °C	PDGFRB Amplifikation
PDGFRB_149rev	AAGGTGCTGGAGACATTGAGGACA	60 °C	PDGFRB Sequenzierung
PDGFRB_342fwd	ACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGA	60 °C	PDGFRB Sequenzierung

PDGFRB_1043f wd	TCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCA	60 °C	PDGFRB Sequenzierung
PDGFRB_2219f wd	ACATGGACATGAGCAAGGACGAGT	60 °C	PDGFRB Sequenzierung
PDGFRB_2810f wd	TGCAGAAGTGCTGGGAAGAGAAGT	60 °C	PDGFRB Sequenzierung
PDGFRB_3157f wd	AACACCTCCTCAACCATCTCCTGT	60 °C	PDGFRB Sequenzierung
T7-Promotor- Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	50 °C	Sequenzierung pGEM [®] -T Easy
VEGFR2_1023r ev	TTCCACCAGAGATTCCATGCCACT	60 °C	VEGFR2 Sequenzierung
VEGFR2_575fw d	TCAGCTATGCTGGCATGGTCTTCT	60 °C	VEGFR2 Sequenzierung
VEGFR2_1000f wd	AGTGGCATGGAATCTCTGGTGGAA	60 °C	VEGFR2 Sequenzierung
VEGFR2_1587f wd	ATGTGAAGCGGTCAACAAAGTCGG	60 °C	VEGFR2 Sequenzierung
VEGFR2_2142f wd	ATTGAAGGATGGGAACCGGAACCT	60 °C	VEGFR2 Sequenzierung
VEGFR2_2856f wd	TGGAGCAATCCCTGTGGATCTGAA	60 °C	VEGFR2 Sequenzierung
VEGFR2_3501f wd	TGCTCAGCAGGATGGCAAAGACTA	60 °C	VEGFR2 Sequenzierung
FLT3-TKD MC 17F	CCGCCAGGAACGTGCTTG	60 °C	FLT3-TKD PCR <i>Real-Time</i> -PCR
FLT3-TKD MC 17R	ATGCCAGGGTAAGGATTCACACC	60 °C	FLT3-TKD PCR <i>Real-Time</i> -PCR
FLT3-TKD MC 835A	CAGGCAGACGGGCATTGCCCTG- Flou		FLT3-TKD <i>Real-Time</i> -PCR
FLT3-TKD MC 835S	Red705 GTTGGAACTCACTCATGAT AT CTCGAG-P		FLT3-TKD <i>Real-Time</i> -PCR
FW-Exon6-10	ATGACGAAGTGAAAGCTCGG	56 °C	CBL exon 6-10 PCR
RV-Exon6-10	GCAGAAGCACGGGAGGGAAC	56 °C	CBL exon 6-10 PCR

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 2.1.3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bemerkungen	Herkunft
HEK-293	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, adhären	Graham, 1977[91] DSMZ
Phoenix Eco	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, modifizierte HEK-293, adhären	Orbigen (San Diego, CA, USA)
HL-60	Humane akute myeloische Leukämie-Zelllinie aus peripherem Blut einer 35-jährigen Frau mit AML FAB M2, nicht adhären	Collins, 1977[92] DSMZ

MOLM-13	Humane akute myeloische Leukämie-Zelllinie aus peripherem Blut eines 20-jährigen Mannes mit AML FAB M5a etabliert, nicht adhärent	Matsuo, 1997[93] DSMZ
MV4-11	Humane akute monozytäre Leukämie-Zelllinie aus peripherem Blut eines 10-jährigen Jungen mit AML FAB F5, nicht adhärent	Lange, 1987[94] DSMZ
GDM-1	Humane akute myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie aus peripherem Blut einer 66-jährigen Frau etabliert, nicht adhärent	Ben-Bassat, 1982[95] DSMZ
SD-1	Humane B-Lymphoblasten Zelllinie aus peripherem Blut einer Frau mit akuter lymphoblastischen Leukämie, nicht adhärent	Dhut, 1991[96] DSMZ
K-562	Humane chronische myeloische Leukämie-Zelllinie aus einer Pleural Effusion einer 53-jährigen Frau etabliert, nicht adhärent	Lozzio, 1973[97] DSMZ
Ba/F3	Murine IL-3 abhängige pro-B-Zelllinie aus dem peripherem Blut einer BALB/c Maus, nicht adhärent	Palacios, 1984[98] DSMZ
WEHI-3B	Murine IL-3 produzierende myelomonocytäre Leukämie-Zelllinie aus peripherem Blut einer BALB/c Maus, größtenteils adhärent	Warner, 1969[99] DSMZ

2.1.4 Antikörper

Tabelle 2.1.4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Bemerkungen	Herkunft
$\tilde{\alpha}$ - β -Actin (AC-15) (A5441)	Maus, monoklonal	Sigma (Taufkirchen)
α -AKT (#9272)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -CBL (C-15) (sc-170)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
CD117-PE(IgG1) (#332785)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
CD135-PE (IgG1) (IM2234U)	Maus	Immunotech (Marseille, FRAU)
CD140a-PE (IgG2a) (#556002)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
CD140b-PE (IgG2a) (#558821)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
CD221-PE (IgG1) (#555999)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
α -cKIT (C-19) (sc-168)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -cMPL (G-20) (sc-13189)	Ziege, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -CSF1R (C-20) (sc-692)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -EGFR (1005) (sc-03)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
EGFR-PE (IgG1) (#555997)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
α -EPOR (M-20) (sc-697)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -FLT3 (S-18) (sc-480)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -GAPDH (6C5) (sc-32233)	Maus, monoklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -HA Probe (Y-11) (sc-805)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)

IgG1-PE Isotyp Kontrolle (A07796)	Maus	Immunotech (Marseille, FRA)
IgG1-PE Isotyp Kontrolle (#555749)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
IgG2a-PE Isotyp Kontrolle (#559319)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
IgG2b-PE Isotyp Kontrolle (#555743)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
α -IGF1R b (#3027)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Sigma (Taufkirchen)
α -44/42 MAP-Kinase (#9102)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -Maus IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz (CA, USA)
α -pAKT (Ser473) (#9271)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -pAKT (Ser473) (D9E) (#4060S)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -pAKT (Thr308) (C31E5E) (#2965)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -PDGFR β (958) (sc-432)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -PDGFR α (951) (sc-431)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -pIGF1R (Tyr1161) (sc-101703)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -p44/42 MAP-Kinase (#9101)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -pSTAT5 (Tyr694) (#9351)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
α -pTyr (PY99) (sc-7020)	Maus, monoklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α -STAT5 (C-17) (sc-835)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
α - α -Tubulin (T6199)	Maus, monoklonal	Sigma
α - β -Tubulin (D10) (sc-5274)	Maus, monoklonal	Santa Cruz (CA, USA)
$\tilde{\alpha}$ V5 (46-075)	Maus, monoklonal	Invitrogen (Darmstadt)

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1.5: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Herkunft	Verwendung
Agarosegel 1%	1% Agarose in 1-fach TAE-Puffer	DNA-Gelelektrophorese
AXI-Platten	LB _{Amp} -Platten mit 50 μ l X-Gal (8% in DMF) und 50 μ l 1 M IPTG	Blau-Weiß-Screening
Calciumchlorid	2 M CaCl ₂	Transfektion
DMEM 1x (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	PAN (Furth im Wald)	Zellkultur
Elektrophorese-Puffer 10x	5 l: 151,4 g Tris, 720,65 g Glycin, 50 g Natriumdodecylsulfat, ad Aqua dest., pH 8,3	SDS-Gelelektrophorese
G-NET	1 l: NET 1x mit 2,5 g Gelatine aufkochen	Western-Blot
GTE-Puffer	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH8, 10 mM EDTA pH 8	Plasmid-Minipräparation
HBS Puffer	50 ml: 5,96 g Hepes, 8,16 g NaCl, 0,133 g Na ₂ HPO ₃ ·2H ₂ O, ad Aqua dest.	Transfektion

KCM 5x	13 ml: 5 ml 3 M KCl, 4,5 ml 1 M CaCl ₂ , 7,5 ml 1 M MgCl ₂ , ad Aqua dest.	Transformation
Lämmli-Puffer (2x)	187,5 mM Tris; 6% SDS, 30% Glycin, Spatelspitze Bromphenolblau	SDS-Gelelektrophorese
LB Agar	32 g in 1l Aqua dest., autoklaviert Invitrogen (Darmstadt)	Bakterienkultur
LB _{Ampicillin} -Platten	LB-Agar mit 100 µg/ml Amp	Bakterienkultur
Ligasepuffer	10-fach von NEB	Ligation
Luria Broth Base	25 g in 1 l Aqua dest., autoklaviert Invitrogen (Darmstadt)	Bakterienkultur
Lysispuffer für Western-Blot	500 ml: 25 ml 1 M Hepes pH 7,5, 15 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 200 mM EGTA, 100 ml Glycerol 50%, 5 ml Triton X-100, 2,1 g NaF, 2,23 g Na ₄ P ₂ O ₇ ·x10H ₂ O	Zellyse
NET 10x	5 l: 438,3 g NaCl, 93,6 g Na ₂ EDTA, 802,85 g Tris, 25 g Triton X-100, ad Aqua dest., pH 7,7	Western-Blot
Ponceau Lösung	100 ml: 0,5 g Ponceau S, 1 ml Eisessig, ad Aqua dest.	Western-Blot
Rotiphorese Gel 30	Acrylamid/Bisacrylamid Lösung, Roth	SDS-Gelelektrophorese
RPMI 1640 + Glutamax	GIBCO (Invitrogen, Darmstadt)	Zellkultur
Semi-Dry-Blotting-Buffer	1 l: 80 ml Transblot, 200 ml Methanol, ad Aqua dest.	Western-Blot
S.O.C. Medium	Invitrogen (Darmstadt)	Transformation
Stripping Puffer	1 l: 70 ml 2-Mercaptoethanol, 7,56 g Tris, 20 g Natriumdodecylsulfat, ad Aqua dest., pH 6,7	Western-Blot
TAE-Puffer	5 l: 242,3 g Tris, 57,1 ml Essigsäure 100%, 18,61 g EDTA 2Na·2H ₂ O	DNA-Gelelektrophorese
TB-Puffer	125 ml: 0,298 g Hepes, 0,275 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 2,33 g KCl, 1,12 g MnCl ₂ x 2 H ₂ O	Herstellung kompetenter Bakterien
TBS 10x	5 l: 12,11 g Tris, 87,66 g NaCl, ad Aqua dest., pH 8,0	Western-Blot
TBST	TBS 1x mit 0,1% Tween20	Waschen bei Western-Blot
Transblot ohne Methanol	5 l: 72,75 g Tris, 36,63 g Glycin, 0,475 g Natriumdodecylsulfat	Western-Blot
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	5 l: 908,55 g Tris, ad Aqua dest., pH 6,8	SDS-Gelelektrophorese
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	5 l: 908,55 g Tris, ad Aqua dest., pH 8,8	SDS-Gelelektrophorese

Das Autoklavieren der Medien wurde bei 120°C und 2 bar für 20 min durchgeführt. Bei Platten zur Selektion von plasmidtragenden Bakterien wurde das Antibiotikum vor dem Gießen bei einer Temperatur von maximal 50°C zugegeben.

2.1.6 Chemikalien, Enzyme, Inhibitoren und Zytokine

Tabelle 2.1.6.1: Verwendete Chemikalien

Standards	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	SDS-Gelelektrophorese	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Agarosegelelektrophorese	Sigma (Taufkirchen)
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	SDS-Gelelektrophorese	BioRad (München)
Aprotinin	SDS-Gelelektrophorese	Sigma (Taufkirchen)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagenz	Proteinbestimmung über Bradford-Test	BioRad (München)
Bovinseryumalbumin (BSA)	Wasserszusatz zum Lösen von Zytokinen	Fluka (Buchs, Schweiz)
BM Cyclin	Mykoplasmen Behandlung	Roche (Mannheim)
Coulter Clenz Cleaning Agent	Zellzahlbestimmung	Beckman Coulter (Krefeld)
Coulter Isoton II Diluent	Zellzahlbestimmung	Beckman Coulter (Krefeld)
Dimethylsulfoxid	Einfrieren von Zellen	Sigma (Taufkirchen)
100 bp-DNA-Leiter	Größenstandard für Agarosegelelektrophorese	Promega (Madison, WI, USA)
1 kb-DNA-Leiter	Größenstandard für Agarosegelelektrophorese	Promega (Madison, WI, USA)
ECL Plus Detection Reagenz	Western-Blot	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Ethanol	Desinfizierung	Merck (Darmstadt)
Fötales Kälberserum (FKS)	Zusatz für Zellkulturmedien	Sigma (Taufkirchen) PAN (Aidenbach)
Glycerin	Puffer	Sigma (Taufkirchen)
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Puffer	Sigma (Taufkirchen)
High Performance Chemiluminescence Film	Western-Blot	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Blau-Weiß-Screening	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
2-Mercaptoethanol	Western-Blot	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	Western-Blot	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat		Sigma (Taufkirchen)
Natriumazid	Western-Blot, Internalisierung	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Zellzyklus	Sigma (Taufkirchen)
Natriumfluorid	Zellyse	Sigma (Taufkirchen)
Natriumvanadat		Sigma (Taufkirchen)
N-Ethylmaleimid	Zellyse	Sigma (Taufkirchen)
Nitrocellulose-Membran	Western-Blot	Schleicher&Schüll (Dassel)
Penicillin-Streptomycin Lösung	Zellkultur	Invitrogen (Darmstadt)

peqGold Protein Marker VI	Größenstandard für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	Peqlab (Erlangen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Zellyse	Sigma (Taufkirchen)
Ponceau	Western-Blot	Sigma (Taufkirchen)
Polyfect Transfektions-Reagenz	Transfektion	Qiagen (Hilden)
Polybren	Transduktion	Sigma (Taufkirchen)
Protein G-Agarose	Immunpräzipitation	Roche (Mannheim)
Protein A-Agarose	Immunpräzipitation	Roche (Mannheim)
2-Propanol	Zellzahlbestimmung	Roth (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Durchflusszytometrie	Sigma (Taufkirchen)
Rainbow Marker	Größenstandard für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	BioRad (München)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Serva (Heidelberg)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Merck (Darmstadt)
Triton-X-100	Zellyse	Sigma (Taufkirchen)
Trypan Blau	Zellzahlbestimmung	Invitrogen (Darmstadt) Sigma (Taufkirchen)
Trypsin mit EDTA	Zellkultur	Invitrogen (Darmstadt)
Tween 20	Western-Blot	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Agarosegelelektrophorese	Fluka (Buchs, Schweiz)
SYBR Safe DNA gel stain	Agarosegelelektrophorese	Invitrogen (Darmstadt)
X-Gal	Blau-Weiß-Screening	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Tabelle 2.1.6.2: Verwendete Enzyme

Standards	Bemerkungen	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme	Plasmidverdau	New England Biolabs (Frankfurt)
Rnase	RNA-Verdau	Roth (Karlsruhe)
Taq-DNA-Polymerase	Polymerasenkettenreaktion	Roche (Mannheim) Peqlab (Erlangen)
T4-DNA-Ligase	Ligation	New England Biolabs (Frankfurt)
T4-DNA-Ligase	Ligation	Fermentas (St. Leon-Rot)

Tabelle 2.1.6.3: Verwendete Inhibitoren

Standards	Bemerkungen	Bezugsquelle
AG220	FLT3-Inhibitor	SYNthesis med chem (Cambridge, UK)
Erlotinib	EGFR-Inhibitor	L.C. Laboratories (Woburn, MA, USA)
Imatinib	ABL-Inhibitor	L.C. Laboratories (Woburn, MA, USA)
LY294002	PI3-Kinase-Inhibitor	Calbiochem (Schwalbach)

MG-132	Proteasom-Inhibitor	Calbiochem (Schwalbach)
MK2206	AKT-Inhibitor	Selleck Chemicals (Houston, TX, USA)
PD98059	MAPK-Inhibitor	Calbiochem (Schwalbach)
PKC412	FLT3-Inhibitor	Novartis (Basel, Schweiz)
Rapamycin	mTOR-Inhibitor	Calbiochem (Schwalbach)
SU5614	FLT3-Inhibitor	Calbiochem (Schwalbach)
SU6656	Src-Inhibitor	Calbiochem (Schwalbach)
LBH589	HDAC-Inhibitor	Selleck Chemicals (Houston, TX, USA)

Tabelle 2.1.6.4: Verwendete Zytokine

Standards	Bemerkungen	Bezugsquelle
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Rekombinant human	Biomol (Hamburg)
Erythropoietin (EPO)	Rekombinant murin	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
FLT3-Ligand (FL)	Rekombinant human	Promocell (Heidelberg) Immunotools (Friesoythe)
<i>Insulin-like growth factor-1</i> (IGF1)	Rekombinant human	Immunotools (Friesoythe)
Interleukin-3 (IL-3)	Rekombinant murin	Biosource (Camarillo, CA, USA) Immunotools (Friesoythe)
<i>Macrophage colony stimulating factor</i> (M-CSF)	Rekombinant human	Immunotools (Friesoythe)
<i>Platelet-derived growth factor-AB</i> (PDGF-AB)	Rekombinant human	Biomol (Hamburg)
<i>Platelet-derived growth factor-AB</i> (PDGF-BB)	Rekombinant human	Immunotools (Friesoythe)
Thrombopoietin (TPO)	Rekombinant human	Biomol (Hamburg)
<i>Vascular endothelial growth factor A</i> (VEGF-A)	Rekombinant human	Immunotools (Friesoythe), Prof. Ballmer-Hofer (Villigen, CH)

Inhibitoren und Zytokine wurden im lyophilisiertem Zustand erworben und nach Herstellerangaben gelöst. Aliquots wurden bei -20°C bzw. -80°C aufbewahrt.

2.1.7 Kitsysteme

Tabelle 2.1.7: Verwendete Kitsysteme

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I	Apoptose	Beckton Dickinson (Heidelberg)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems (Darmstadt)
Endofree Plasmid Maxi Kit	Plasmid-Extraktion	Qiagen (Hilden)

MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Mykoplasmen Test	Lonza (Rockland, ME, USA)
PCR Mycoplasma Test Kit	Mykoplasmen Test	AppliChem (Darmstadt)
pGEM®-T Easy Vector System	T/A Klonierung	Promega (Madison, WI, USA)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Plasmid-Extraktion	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	DANN-Isolierung aus Agarosegelen	Qiagen (Hilden)
QIAspin Mini Kit	Plasmid-Extraktion	Qiagen (Hilden)
QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Mutagenese	Stratagene (Waldbronn)
RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit	cDNA Synthese	Fermentas (St. Leon-Rot)
Rneasy MiniKit	RNA-Isolierung	Qiagen (Hilden)

2.1.8 Laborausstattung und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.1.8.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage 2001 MP2	Sartorius (Göttingen)
Bakterien Brutschrank	Heraeus (Osterode)
CO ₂ -Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Computer	Rechenzentrum (Neuherberg)
DNA-Thermocycler	Peqlab (Erlangen)
Drucker	Hewlett Packard GmbH (Böblingen)
Entwicklermaschine	Kodak (Stuttgart)
Expositionskassetten	Amersham Pharmacia (Freiburg)
FACS Calibur	Beckton Dickinson (Heidelberg)
FACS Sorter	Beckton Dickinson (Heidelberg)
FAX / Kopierer	Konica Minolta Business Solutions Deutschland GmbH (Langenhagen)
Flüssigstickstofftank	Cryoson (Schöckrippen)
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr (Ochsenhausen), Bosch (Gerlingen Schillerhöhe)
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus (Osterode)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock BT 130-2	Heap Labor Consult (Bovenden)
Heiz Drehrad	Innova
Kühlschränke (4°C)	Liebherr (Ochsenhausen), Bosch (Gerlingen Schillerhöhe)
Kühlzentrifuge 5424R, 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems (Pforzheim)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gilson (Limburg)
Präzisionswaage 440-45	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)

Proteingelelektrophoresekammer (Xcell SureLock Mini Cell)	Invitrogen (Darmstadt)
Probenkämme für SDS-PAGE	Invitrogen (Darmstadt)
Sequenzierer (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Spektralphotometer (Nanodrop 1000)	Peqlab (Erlangen)
Sterilbank	BDK Luft und Reinraumtechnik Bio Flow Technik (Meckenheim)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Rotanta	Hettich (Tuttlingen)
Ultrazentrifuge 3K30	LTF Labortechnik
Vi-Cell XR, Vi-Cell AS	Beckman Coulter (Krefeld)
Vortexer	Cenco (Breda, NL)
Wasserbad	Haske (Karlsruhe)

Tabelle 2.1.8.2: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Glaswaren	Schott Duran (Wertheim), Simax (Bohemia Cristal, Selb)
Küchentücher	WEPA Professional (Arnsberg)
Medizinische Handschuhe	Sempermed (Wien, AUT)
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman (Dassel)
Petrischalen	Sarstedt (Nümbrecht)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 2 ml	Eppendorf (Hamburg)
SDS-Gelkassetten	Invitrogen (Darmstadt)
Sterilfilter	Millipore (Billerica, MA, USA)
Vi-Cell 4ml Sample Vials	Beckman Coulter (Krefeld)
Vollpipetten	Greiner Bio-One (Frickenhäuser), Corning Incorporated (Corning, NY, USA)
Zellkulturflaschen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen (6-well)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen (24/48/96-well)	Nunc (Thermo Electron LED, Langenselbold)
Zellkulturschale 96-well, unbehandelt	Corning Incorporated (Corning, NY, USA)
Zellkultur Petrischale	Corning Incorporated (Corning, NY, USA)
Zellsieb 40µm	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen 14/5 ml	Becton Dickinson Labware (Meylan Cedex, FRA)
Zentrifugenröhrchen 50/15 ml	BD Biosciences (Erembodegen, BEL)

2.1.9 Software

Tabelle 2.1.9: Verwendete Software

Software	Verwendung	Hersteller
Adobe Illustrator	Abbildungen	Adobe Systems (Unterschleißheim)
BioEdit 7.0	Sequenzen	ISIS Pharmaceutica (Carlsbad, USA)
Cellquest 3.3	Durchflusszytometrie	Beckton Dickinson (Heidelberg)
E-capt 15.06	DNA-Gelelektrophorese	Vilber Lourmat
Image J	Western-Blot	Wayne Rasband
Microsoft Office 2003/2007/2010	Daten	Microsoft (Redmond, WA, USA)
PyMOL	Abbildungen	Schrödinger (München)
Sigma Plot 11.0	Diagramme	SPSS Incorporated (Chicago, USA)
Vector NTI Advance 10	Sequenzen	Invitrogen (Darmstadt)
WinMDI 2.9	Durchflusszytometrie	Joseph Trotter

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α verwendet. Zur Expansion der Bakterien wurden diese auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 10-12 Kolonien eine 50 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit der Vorkultur wurden 250 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Bakterienkultur wurde ca. 5 h bei RT und 200-250 rpm im Bakterienrüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden für 10 min auf Eis abgekühlt, dann auf fünf 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 15 min bei 1000 g und 4°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 64 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und dann für 15 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 16 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und nach einer Zugabe von 1,2 ml DMSO 5-6 Mal invertiert. Schließlich wurde 10 min auf Eis inkubiert und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, welche sofort schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt wurden.

2.2.1.2 Chemische Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Für die chemische Transformation des DH5 α -*E.coli*-Stamms wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Einem 50 μ l Ansatz wurden 5 μ l 5xKCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂) zugefügt, um die Zellmembran der kompetenten Bakterien kurzzeitig chemisch durchlässig zu machen. Dadurch können Plasmidvektoren aufgenommen werden. Für einen Transformationsansatz wurden 10 μ l Ligationsansatz oder 1 μ l Plasmid-DNA 5 μ l 5xKCM zugefügt, mit Aqua dest. auf 25 μ l aufgefüllt und dann mit 25 μ l kompetenten Bakterien versetzt. Der Ansatz wurde zunächst 20 min auf Eis und dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden der Bakterien-Suspension 250 μ l LB- oder S.O.C.S-Medium ohne Antibiotika-Zusatz zur Expression des Resistenzgens, meist β -Lactamase zugefügt und dann 1 h bei 37°C im Bakterienschüttler oder Thermomixer geschüttelt. Vom Transformationsansatz wurden 100 μ l zur Selektion positiver Klone auf eine LB-Agarplatte - meist mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt - ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Falle eines verwendeten Ligationsansatzes wurden die Bakterien abzentrifugiert, in 100 μ l Medium resuspendiert und dann ausplattiert. Am nächsten Tag konnten Einzelkolonien zur Präparation von Plasmid-DNA weiterexpandiert werden.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Das Prinzip der alkalischen Lyse wurde angewendet, um aus Bakterien Plasmid-DNA zu isolieren [100].

2.2.1.3.1 Plasmid-Minipräparation

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinerem Maßstab zu isolieren, wurde zunächst eine einzelne Kolonie transformierter Bakterien in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum, meist Ampicillin, über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Die eigentliche Plasmid-DNA Präparation wurde entweder mit dem QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben, oder, wie nachfolgend beschrieben, nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) [101] durchgeführt. Die Bakterien der Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und in GTE-Puffer resuspendiert. Der GTE-Puffer wurde mit 1 μ l RNase A (1 mg/ml) versetzt, um RNA zu entfernen. Durch Zugabe einer alkalischen SDS-Lösung wird der pH-Wert ins Alkalische verschoben, was zur Denaturierung der DNA und der Proteine führt. Nach folgender Neutralisation durch Zugabe einer Acetatlösung

renaturiert sich aufgrund ihrer Konformation nur die Plasmid-DNA. Durch Zentrifugation setzen sich Proteine und chromosomale DNA ab. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde mit 100% Ethanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde letztlich in 50 bzw. 30 µl H₂O gelöst. Die Aufbewahrung fand bei -20°C statt.

2.2.1.3.2 Plasmid-Maxipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine einzelne Kolonie in einer 2 ml Vorkultur tagsüber für ca. 8 h bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Die gesamte Vorkultur wurde dann in 100 ml LB-Medium mit enthaltenem Antibiotikum gegossen und über Nacht erneut bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe des QIAgen-Plasmid-Maxi-Kit oder Endofree-Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die präparierte DNA wurde in 200 µl Aqua dest. aufgenommen und die Ausbeute im Spektralphotometer Nanodrop 1000 (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

2.2.1.4 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Die enthaltenen DNA-Konstrukte wurden über einen enzymatischen Restriktionsverdau auf Identität und Orientierung überprüft. Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) verwendet und die Bedingungen und Puffer entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Bei diesem diagnostischen Verdau betrug das Reaktionsvolumen 20 µl und die Reaktionszeit betrug 2 h. Verdaute Plasmidelemente, die für weitere Klonierungsschritte nötig waren, wurden durch einen präparativen Ansatz in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 3 h verdaut. Beide Ansätze wurden anschließend über ein 1%-iges Agarosegel aufgetrennt und durch zugesetztes Ethidiumbromid oder Syber-Safe unter UV-Licht detektiert.

2.2.1.5 Elektrophoretische DNA-Auftrennung

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer unterschiedlichen Größe (und somit unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld) wurde in 1%igen Agarosegelen durchgeführt, denen 0,2 mg/l des Fluoreszenz-Farbstoffs Ethidiumbromid oder Syber Safe beigefügt wurden. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 6x Gel-Ladepuffer

versetzt. Zur Größenorientierung wurde zusätzlich ein Standardmarker auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 90-130 Volt mit 1x TAE als Elektrophoresepuffer.

2.2.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach dem Ausschneiden der gewünschten Bande aus dem Agarosegel unter UV-Licht erfolgte die Aufreinigung des Fragments mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen entsprechend dem beiliegenden Protokoll. Eluiert wurde mit 30 bzw. 50 μl H_2O .

2.2.1.7 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Nach einem Restriktionsverdau wurden die Restriktionsenzyme 20 min bei 65°C inaktiviert. Danach wurde der Lösung alkalische Phosphatase (CIAP), CIAP-Puffer und EDTA zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Bei dieser Temperatur ist die Phosphatase aktiv und dephosphoryliert die Phosphatreste an den 5' Enden des Vektors, wodurch eine Religation des Vektors verhindert wird. Durch abschließende 5 min bei 70°C wurde die Phosphatase inaktiviert. Nach Auftragen auf ein Agarosegel konnte der dephosphorylierte Vektor extrahiert werden.

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Das molare Verhältnis von Insert:Vektor betrug bei Ligationen 2:1 bis 10:1. Die Ligation erfolgte über Nacht oder bis zu 3 Tage bei 16°C in einem Reaktionsvolumen von 20 μl .

2.2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde folgender PCR-Standard-Ansatz verwendet:

Matrize (ca. 100 ng)	x μl
10x Low Salt Buffer	2,5 μl
25 mM MgCl_2	1,5 μl
10 mM dNTPs	2,0 μl
10 μM 5'Primer	0,5 μl

10 μ M 3'Primer	0,5 μ l
Taq-Polymerase	0,13 μ l
ddH ₂ O	ad 25 μ l

Nach anfänglicher Denaturierung für 3-5 min bei 95°C erfolgte die Amplifikation im T3 Thermocycler der Firma Biometra durch 30 Zyklen des folgenden Programms:

- 30 sec, 95°C (Denaturierung)
- 30 sec, 50-62°C (Annealing, je nach Primer-Schmelzpunkt)
- 30 sec bis 6 min, 72°C (Elongation, 30 sec pro 500 bp des Fragments)

Nach einer abschließenden Elongation für 5-10 min bei 72°C wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt und daraufhin auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.1.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Um Punktmutationen in DNA einzufügen, wurde das QuickChange-II-XL-Site-Directed-Mutagenesis-Kit von Stratagene (Waldbronn) nach Herstellerangaben verwendet. 50 ng doppelsträngige Plasmid-DNA wurde über eine PCR-Reaktion mit Oligonukleotiden, die die gewünschte Mutation enthalten, amplifiziert. Die komplementären Oligonukleotide hatten eine Länge zwischen 30 und 45 Basen und eine Annealing-Temperatur von 60°C.

2.2.1.11 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde die DNA-Probe und Primer zur Firma Sequiserve (Vaterstetten) geschickt oder der BigDye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Beim zuletzt erwähnten Kit wurde in folgendes PCR-Programm ca. 1 μ g DNA und 10 pmol Primer eingesetzt: 29 Zyklen mit 96°C 10 sec, 45-65°C 5 sec (je nach Primer), 60°C 4 min; 4°C 4 min, 4°C ∞ . Danach wurde dem PCR-Produkt 1 μ l 3 M Natriumacetat Lösung (pH 5,2) und 24 μ l Ethanol zugegeben und gemischt. Die Lösung wurde für 20 min bei 4000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 100 μ l 70% Ethanol dazugegeben und gemischt, um entstandene Salze zu entfernen. Nach 10-minütigen Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, 5 min bei 50°C getrocknet und dann in 20 μ l Aqua dest. aufgenommen. 10 μ l der DNA wurden in ein Sequenzierrohrchen gegeben und im ABI-Prism-310-Genetic-Analyzer sequenziert.

2.2.1.12 Extraktion genomischer DNA aus Zellen

Zur Extraktion genomischer DNA aus Zellen wurde die Lösung DNAzol (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Pro Ansatz wurden 2×10^7 Zellen lysiert und DNA nach den Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.13 Isolation von mRNA aus Zellen

Aus den Zellen wurde mRNA mit Hilfe des Rneasy MiniKit und der Verwendung von Qias shredder Säulchen (Qiagen, Hilden) isoliert. Pro Ansatz wurde die RNA aus 6×10^5 Zellen isoliert.

2.2.1.14 Synthese von cDNA

Die reverse Transkription der isolierten RNA wurde mit Hilfe des RevertAid-Premium-First-Strand-cDNA-Synthese-Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach beiliegender Anleitung durchgeführt.

1 µg RNA	x µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Oligo (dT) ₁₈ primer	1 µl
H ₂ O	ad 15 µl

Der Ansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert anschließend wurde der reverse Transkriptase Ansatz dazugegeben:

RevertAid™ Premium Enzyme Mix	1 µl
5x RT Puffer	4 µl

Nach 30 min bei 50°C zum Synthetisieren der cDNA und 5 min bei 85°C zum Denaturieren der Enzyme wurde die gebildete cDNA bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.15 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde mit dem LightCycler-System der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Das Vorhandensein von FLT3-TKD-Mutationen wurde durch einen auf Schmelzkurven beruhenden LightCycler-assay überprüft.

Die PCR-Reaktion wurde in einem 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt mit 2 µl der cDNA, jeweils 0,5 µM des 5`Primers (FLT3-TKD MC 17F) und des 3`Primers (FLT3-TKD MC 17R), 4 mM MgCl₂, 2 µl LightCycler-FastStart DNA Master Hyb-Probes, und 0,75 µM der Hybridisationsproben FLT3-TKD MC 835A (sensor) und FLT3-TKD MC 835S (anchor). Amplifiziert wurden 40 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 60°C und die Analyse der Schmelzkurve begann bei 40°C zu 85°C mit einem Anstieg von 0,2°C pro sec.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle unter 2.1.3. angegebenen Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.2.1.1 Kultur von adhärennten Zellen

Die humanen embryonalen Nierenepithel-Zelllinien HEK-293 und Phoenix-Eco wurden in DMEM-Medium („Dulbecco´s Modified Eagle Medium“) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin gehalten (Vollmedium). Alle drei Tage wurden die Zellen 1:5 verdünnt. Um die adhärennten Zellen von ihrem Kulturgefäß zu lösen, wurden sie einmal mit DPBS gewaschen, 5 min mit Trypsin behandelt und dann mit DMEM-Vollmedium verdünnt und durch Auf- und Abpipettieren vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Die Zellen wurden daraufhin in ein Zentrifugationsgefäß überführt, einmal zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Vollmedium aufgenommen.

Die zum überwiegenden Teil adhärennt wachsende murine myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie WEHI-3B wurde in RPMI-1640 Medium unter Zusatz von 10% FKS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet. Da die Zellen Trypsin-empfindlich sind, erfolgte das Ablösen der Zellen nach 10 minütiger Inkubation in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ durch mechanisches Abschaben mit

einem Zellschaber. Der Zellüberstand der WEHI-3B-Zellen wurde sterilfiltriert und diente als IL-3-Quelle für die Kultivierung der IL-3-abhängigen Zelllinie Ba/F3.

2.2.2.1.2 Kultur von Suspensionszellen

Die IL-3 abhängige murine pro-B-Zelllinie Ba/F3 wurde in RPMI-1640-Medium, zugesetzt mit 10% FKS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 10% WEHI-3B-konditionierten Medium kultiviert. Die Zellen wurden alle drei Tage im Verhältnis 1:20 gesplittet.

Die AML-Zelllinien, HL60, MV4-11 und MOLM-13 wurden in RPMI-1640 Medium mit 20% FKS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert und alle drei Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet.

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für zukünftige Verwendung können Zellstocks bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Dazu werden 6×10^6 Zellen bei Suspensionszellen bzw. 3×10^6 Zellen bei adhärennten Zellen pelletiert und in 1 ml Einfriermedium, das aus 90% FKS und 10% DMSO besteht, resuspendiert. Die Zellsuspension wird in 1,5 ml Einfriergefäße (Nunc-Cryotube™) transferiert und in einem speziellen Einfriercontainer (Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container) bei -80°C eingefroren. Der Einfriercontainer enthält Isopropanol und gewährleistet eine langsame Abkühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute. Nach zwei Tagen wurden die Zellen aus dem Einfriercontainer in den Lagerplatz einsortiert.

Um Zellen aufzutauen, wurde das Zellen enthaltende Einfriergefäß in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Die DMSO enthaltene Zellsuspension wurde 5 ml vorgewärmten Medium zugegeben, einmal abzentrifugiert und mit frischen Vollmedium resuspendiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mindestens drei Tage in Kultur gehalten, bevor sie für ein Experiment verwendet wurden.

2.2.2.3 Transiente Transfektion von Zellen

Die adhärennten Verpackungszelllinien HEK-293 oder Phoenix-Eco wurden entweder mit Polyfect®-Reagenz von Qiagen (Hilden) oder über die $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Kopräzipitation transient transfiziert. Ziel der transienten Transfektion ist die Überprüfung der Proteinexpression und die Produktion von virus-enthaltendem Medium (engl. virus containing medium, VCM) für die stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen. Zur Überexpression von

Proteinen musste die gewünschte cDNA in eukaryotischen Expressionsvektoren (z.B. pCDNA6) vorliegen. Um die Ba/F3-Zellen über retroviralen Gentransfer stabil zu transduzieren, wurde die cDNA in die „multiple cloning site“ (MCS) des pMSCV-IRES-EGFP/EYFP-Vektors kloniert.

Für die Kalziumphosphat-Methode wurden nachmittags am Vortag der Transfektion 6×10^6 Zellen in eine 10 cm Kulturschale (Corning, NY, USA) für adhärenente Zellen ausgesät, so dass am Tag der Transfektion die Platte zu ca. 80% konfluent war. Etwa 4 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium nochmals vorsichtig gewechselt. Der erste Schritt der Transfektion war die Zugabe von 13 µg Plasmid zu sterilem Aqua dest. zu einem Gesamtvolumen von 450 µl. Im Falle der HEK-293-Zellen musste noch zusätzlich der Ecopack-Vektor zur Bildung der viralen Verpackungsproteine transfiziert werden. Zu den 450 µl wurden 50 µl einer sterilen 2 M CaCl_2 -Lösung zugegeben und gemischt. Die tröpfchenweise Zugabe der DNA-Lösung zu dem phosphathaltigen HBS-Puffer, darauffolgendes vorsichtiges Mischen und einer Inkubation von 3-4 min bei RT ergab ein feines Präzipitat. Dieser DNA-Calziumphosphat-Komplex wurde anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft und erleichterte die Aufnahme der DNA über Endozytose in die Zellen. Am folgenden Vormittag wurde das Medium vorsichtig gewechselt, um die entstandenen Kalziumkristalle zu entfernen. Nach 48-72 h der Transfektion konnte der VCM abgenommen werden und die Zellen lysiert werden. Zuvor wurde bei Vektoren mit Fluoreszenzmarkern die Transfektionseffizienz über ein Fluoreszenzmikroskop überprüft.

2.2.2.4 Stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen

Für die stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 3 ml RPMI-Vollmedium aufgenommen, und mit einer Polybrene-Lösung (Endkonzentration 8 µg/ml) versetzt und dann gemischt. Der Zellsuspension wurde daraufhin dieselbe Menge an eingefrorenem oder frischem, steril filtriertem VCM (siehe 2.2.2.3) zugegeben und gleichmäßig auf zwei Kammern einer 6-well Kulturschale gegeben. Die Zellen wurden für 90 min bei 32°C und 2500 rpm in einer Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die Zellen für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubiert und danach wurde ein halber Mediaustausch durchgeführt oder frisches RPMI-Vollmedium zugegeben. Bis zur Sortierung nach GFP- bzw. YFP-Fluoreszenz im FACS („Fluorescence Activated Cell Sorter“) - vier bis fünf Tage nach Transduktion - wurden die Zellen in Zellkulturflaschen expandiert. Für die Fluoreszenz-Sortierung mittels des FACS-Vantage-SE-Durchflusszytometers (Becton Dickinson, Heidelberg) und der Cellquest-3.3-Messsoftware wurden die Zellen einmal abzentrifugiert und in PBS mit 1 µg/ml Propidiumjodid, zur

Markierung toter Zellen, aufgenommen. Die sortierten YFP/GFP-positiven Zellen wurden expandiert und die Woche darauf ein zweites Mal sortiert, um eine zu >95% reine Population zu erhalten.

Zur stabilen Transduktion wurde der retrovirale eukaryotische Expressionsvektor pMSCV-IRES-EGFP oder pMSCV-IRES-EYFP verwendet. Strangabwärts der MCS des Vektors befindet sich eine IRES-(internal ribosome entry site)-Sequenz und die codierende Sequenz für GFP oder YFP („green fluorescent protein“ bzw. „yellow fluorescent protein“). Die IRES-Sequenz gewährleistet, dass das „gene of interest“ und das Reportergen (GFP bzw. YFP) auf einer mRNS transkribiert und somit simultan exprimiert wird. Umschlossen werden die drei codierenden Sequenzen von den regulatorischen Sequenzen, LTRs („long terminal repeats“). Der 5'LTR fungiert als Promotor und der 3'LTR als Transkriptionsterminator.

2.2.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Bei vielen Experimenten muss zu Beginn die Lebendzellzahl bestimmt werden, um eine bestimmte Zellzahl auszusäen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypan-Blau-Exklusions-Test verwendet. Der Farbstoff Trypanblau kann nur durch die poröse Zellmembran toter Zellen eindringen, dadurch erscheinen tote Zellen blau im Lichtmikroskop und lebende farblos. Die lebenden Zellen wurden dann über die Neubauer-Zählkammer oder den Vi-Cell-Zellzähler (Beckman Coulter, Krefeld) ausgezählt. In die Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl eines definierten Verhältnisses von Zellsuspension und Trypanblau gefüllt und über folgende Formel wurde die Lebendzellzahl bestimmt: Lebendzellzahl/ml = Anzahl lebender Zellen / 4 x Verdünnungsfaktor x 10.000. Bei den Vi-Cell-Zellzählern wurde auch eine definierte Verdünnung der Zellsuspension in die Messbehälter gegeben und über Trypanblau-Exklusion ausgezählt.

Für Proliferationsexperimente mit Ba/F3-Zellen über 72 h wurden 4×10^4 Zellen pro ml Medium ausgesät und nach 72 h die Lebendzellzahl bestimmt. Für Langzeitproliferationen wurden anfänglich 2×10^5 Zellen pro ml ausgesät und die Zellzahl alle 48 h bestimmt und ab einer Zelldichte über $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml verdünnt. Vor der anfänglichen Zellzahlbestimmung wurden die Ba/F3-Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das IL-3 im RPMI-Vollmedium zu entfernen, und dann in RPMI mit 10% FKS, 50 u/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin aufgenommen. Den Proliferationsansätzen wurden dann festgelegte Mengen an Zytokinen und Inhibitoren zugegeben. Für die statistische Auswertung der kombinatorischen Wirkung zweier Substanzen wurde die „fractional product“-Methode nach Webb verwendet [102].

2.2.2.6 Apoptose-Test mit Annexin-V- und 7-AAD-Färbung

Für die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Kultur wurde das 'Annexin V-PE Apoptosis Detektion Kit I' (Beckton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die apoptotischen bzw. toten Zellen werden mit Annexin V-PE (Annexin V konjugiert mit Phycoerythrin) und 7-AAD (7-Amino-actinomycin D) gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Ein erstes Merkmal apoptotischer Zellen ist das Zusammenbrechen der Plasmamembran-Asymmetrie, indem Phosphatidylserin (PS) des inneren Membran-Blattes an das äußere umgelagert wird. Annexin V bindet Ca^{2+} -abhängig an PS und ist damit ein frühapoptotischer Marker und kann durch das konjugierte Fluorochrom PE detektiert werden. Der Vitalfarbstoff 7-AAD färbt tote Zellen an, da er deren beschädigten Membranen durchdringen kann.

Für Apoptoseexperimente mit Ba/F3-Zellen wurden für den Ansatz mit IL-3 40.000 Zellen und für den Ansatz ohne IL-3 200.000 Zellen pro ml für 72 h kultiviert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden sie zweimal gewaschen, bevor sie in RPMI mit 10% FKS, 50 u/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin aufgenommen wurden, um das im RPMI-Vollmedium enthaltene IL-3 auszuwaschen. Nach der 72-stündigen Inkubation wurden die Zellen in ein 5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl 1x Annexinbindungspuffer resuspendiert und mit Annexin V-PE und 7-AAD für 10 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Danach wurden die Proben bis zur direkt anschließenden Analyse im FACS-Calibur-Durchflusszytometer über das Cellquest-3.3-Programm dunkel auf Eis gestellt.

2.2.2.7 Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie

Die Expression der membrangebundenen Rezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Dafür wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei RT mit spezifischen Phycoerythrin-markierten (PE) Antikörper inkubiert, z.B. CD135-PE für FLT3. Um unspezifische Antikörperfärbung auszuschließen, wurde ein zweiter Ansatz mit der Isotyp-Kontrolle des entsprechenden Antikörpers inkubiert (im Falle des CD135-PE murines IgG1-PE). Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 250 µl FACS-Puffer (PBS mit 1 µg/ml Propidiumiodid) aufgenommen. Die Fluoreszenz der Zellen wurde im FACS-Calibur-Durchflusszytometer gemessen. Die Expressionsstärke wurde über WinMDI 2.9 ausgewertet und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Expresssionsstärke} = \frac{\frac{GM(\text{Probe})}{CV(\text{Probe})}}{\frac{GM(\text{Isotyp})}{CV(\text{Isotyp})}}$$

geometrischer Mittelwert (GM),
Variationskoeffizient (CV)

2.2.2.8 Internalisierung von Rezeptoren

Zur Analyse der Internalisierung von Rezeptoren wurden pro Ansatz 3×10^5 Zellen in ein 5 ml Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson Labware) gegeben, für 5 min bei 1100 rpm in einer Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) abzentrifugiert und in 100 μ l PBS mit 5% FKS aufgenommen. Die Zellen wurden für verschiedene Zeitintervalle (5, 10, 30 min) mit 100 ng des entsprechenden Rezeptors im Inkubator inkubiert. Ein Ansatz wurde nicht stimuliert und diente als 0 min Wert. Die Internalisierung wurde durch Zugabe von 1 ml PBS mit 0,1% Natriumazid gestoppt. Natriumazid stört die Elektronen-Transportkette der Atmungskette, was zu einem Erliegen der ATP-Produktion führt. Jeder Ansatz wurde dreimal mit dem Natriumazidpuffer gewaschen und danach in 100 μ l PBS aufgenommen und, wie in 2.2.2.7 beschrieben, mit dem entsprechenden Oberflächenantikörper gefärbt. Die Messung erfolgte im FACS-Calibur-Durchflusszytometer, die Auswertung mit Hilfe des WinMDI-2.9-Programms.

2.2.2.9 Hungern und Stimulation der Zellen vor Zellyse

Zur Analyse phosphorylierter Signalproteine von spezifischen Signalwegen der transduzierten Ba/F3-Zellen wurden die Zellen vor der Lyse gehungert, um den Hintergrund an phosphorylierten Proteinen zu reduzieren. Dafür wurden $2-3 \times 10^7$ Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Hungermedium (RPMI mit 0,3% FKS, 50 u/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin) aufgenommen und für 24 h im Inkubator inkubiert.

Um die Aktivierung der Signalproteine unterhalb der Rezeptoren zu überprüfen, wurden die Zellen vor der Zellyse mit dem entsprechenden Ligand/Zytokin stimuliert.

2.2.2.10 Zell-Test auf Mykoplasmen und Behandlung

Mykoplasmen sind kleine zellwandlose Bakterien und eine häufige Ursache von Kontaminationen in der Zellkultur. Um eine Kontamination mit Mykoplasmen in der laufenden

Zellkultur nachzuweisen wurde der PCR-Mykoplasma-Test-Kit von AppliChem oder der MycoAlert®-Mykoplasma-Detection-Kit von Lonza verwendet. Bei beiden Test-Kits wurden zunächst 500 µl der Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß bei 250 g für 5 min zentrifugiert.

Für die Probenvorbereitung des PCR-Mykoplasma-Test-Kits wurde der Mykoplasmen enthaltende Überstand in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und dann bei 20.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, um die sedimentierten Mykoplasmen in 12,5 µl der Kit eigenen Pufferlösung aufzunehmen. Nach gründlicher Resuspension wurde die Probe für 3 min bei 95°C inkubiert. Die Probe kann für späteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt werden. Folgender PCR-Ansatz wurde auf Eis angesetzt:

7,5 µl	H ₂ O
2,5 µl	Reaktions Mix
2,5 µl	Probe

Der Reaktionsmix beinhaltet neben der Polymerase ein mykoplasmen-spezifisches 16S-rRNA-Primerpaar. Zu Beginn erfolgte eine Anfangsdenaturierung für 30 sec bei 94°C. Die Amplifikation der Probe wurde im T3-Thermocycler der Firma Biometra über 35 Zyklen nach folgendem Programm durchgeführt:

- 30 sec, 94°C (Denaturierung)
- 120 sec, 60°C (Annealing)
- 60 sec, 72°C (Elongation)

Nach einem abschließenden Zyklus mit einer 5-minütigen Elongation bei 72°C wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt und daraufhin mit einer Positiv-Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Primer-spezifische Bande ist bei 270 bp.

Der MycoAlert®-Assay ist ein biochemischer Test der die Aktivität von bestimmten Mykoplasmen-Enzymen misst, deren Aktivität zu einem Anstieg an ATP führt. Über das Enzym Luciferase wird das ATP unter anderem zu AMP und Licht umgewandelt, dieses Licht wird über ein Luminometer gemessen. Nachdem die im Test-Kit enthaltenden Lösungen auf Raumtemperatur gebracht wurden, wurden 25 µl des Mykoplasmen enthaltenden Überstandes in eine Zellkulturplatte gegeben, die für Lumineszenz-Messungen geeignet ist. Daraufhin wurden 25 µl der MycoAlert Reagenz 5 min zugegeben, wodurch die Zellen lysiert werden. Nach den 5 min wurde die erste Messung im Luminometer unternommen (Messung A). Messung B wurde nach einer 10 minütigen Inkubation mit 25 µl des MycoAlert Substrats durchgeführt. Sind Mykoplasmen vorhanden, haben Mykoplasmen-Enzyme durch das Substrat ATP gebildet. Dieses ATP wird über das Enzym Luciferase unter anderem zu AMP

und Licht umgewandelt. Ergibt der Bruch Messung B / Messung A einen Wert >1 , dann ist die Zellkultur mit Mykoplasmen kontaminiert.

Mit Mykoplasmen befallene Zellen können unter Verwendung von BM Cyclin (Roche) behandelt werden. Dafür müssen die Zellen über 2-3 Zyklen mit 10 µg/ml BM Cyclin 1 für 3 Tage und 5 µg/ml BM Cyclin 2 für 4 Tage behandelt werden.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Zelllysaten

Um die Expression zellulärer Proteine nachzuweisen, wurden $2-3 \times 10^7$ Ba/F3- oder 1×10^7 Phoenix-Eco- bzw. 293-Zellen in 500 µl Lysispuffer aufgenommen. Direkt vor der Lyse wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Gefäß auf Eis abgekühlt. Adhärenz Zellen wurden zuvor mit Trypsin vom Kulturgefäß gelöst. Nachdem die Zellen im Lysispuffer resuspendiert wurden, wurden die Lysate bei 4°C 30 min auf einem Drehrad inkubiert, um eine vollständige Zelllyse zu gewährleisten. Anschließend wurden die Lysate 30 min bei 4°C und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um die Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde dann für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976)[103]. Der Assay verwendet eine saure Lösung des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G-250, dessen Absorptionsmaximum sich bei Bindung an basische und aromatische Gruppen eines Proteins von 465 nm auf 595 nm erhöht. Die Intensität des Farbstoffs korreliert direkt mit der Konzentration an Protein im Lysat und kann im Spektralphotometer gemessen werden.

Die Lysate wurden 1:10, das BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, München) 1:5 mit Wasser verdünnt. 20 µl des Lysats und 980 µl des BioRad-Dyes wurden gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gegen eine Blank-Kontrolle (BioRad-Dye mit Zusatz von Wasser) gemessen. Zur Bestimmung der absoluten Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA (200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml) hergestellt und diese als Standard

in gleicher Weise gemessen. Die Konzentration von Zelllysaten sollte je nach Zelltyp und Zellzahl zwischen 2 und 10 mg/ml Protein liegen.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wurde ein 7,5% - 18% Trenngel verwendet, für niedrig molekulare Proteine ein höher prozentiges Gel. Zunächst wurde die Trenngellösung in die Gelkassette (Invitrogen, Darmstadt) gegossen, mit Wasser überschichtet für eine ebene Trennlinie und auspolymerisiert. Anschließend wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Wenn auch das Sammelgel auspolymerisiert war, konnte das SDS-Polyacrylamidgel verwendet oder bis zur Verwendung wenige Tage feucht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Gellösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

Trenngel (Bsp. 12,5%):

Aqua dest	1,52 ml
1,5M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8	3 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	3,33 ml
10% SDS-Lösung	100 µl
10% APS-Lösung	50 µl
TEMED	5 µl

Sammelgel (4%):

Aqua dest	3 ml
1,5M Tris-HCl-Puffer, pH 6,8	1,25 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	0,65 ml
10% SDS-Lösung	50 µl
10% APS-Lösung	25 µl
TEMED	5 µl

Gewonnene Zelllysate wurden vor der Gelelektrophorese 1:1 mit 2-fachen Lämmlieluffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Proben und ein Protein-Größenstandard wurden dann in die Geltaschen pipettiert und bei konstanten 60-80 mA in einer Proteingelelektrophoresekammer (Xcell-SureLock-Mini-Cell, Invitrogen, Darmstadt) aufgetrennt, die mit Elektrophoresepuffer befüllt wurde.

2.2.3.4 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine 90 min bei konstanten 250 mA nach der *semi-dry*-Blot-Methode (Towbin, 1979)[104] auf eine Nitrocellulose-Transfer-Membran mit Transblot-Puffer transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau angefärbt, um den erfolgreichen Proteintransfer und die Beladung der Taschen zu überprüfen. Alle folgenden Wasch- und Färbeschritte geschahen unter Schütteln. Anschließend wurde die Membran dreimal 20 min mit G-NET blockiert, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in G-NET. Phospho-spezifische Antikörper wurden in einer entsprechenden Verdünnung in Albumin angesetzt. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper mit TBST dreimal 10 min ausgewaschen und die Membran dann für 60 min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:20.000 in G-NET, HRP „horse radish peroxidase“-gekoppeltes anti-Kaninchen- oder anti-Maus-Immunglobulin) bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde dann ebenfalls dreimal 10 min mit TBST ausgewaschen. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS wurden die Proteine mit dem Chemolumineszenz-Reagenz ECL-Plus-Western-Blot-Detection-System (Amersham, Freiburg) auf einem Hyperfilm (Amersham, Freiburg) detektiert. Die Expression der Proteine wurde mit der Software Image J quantifiziert.

2.2.3.5 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden 400-500 µg Protein eines Ganzzelllysates eingesetzt. Die Zelllysate wurden mit Lysispuffer auf dasselbe Volumen (500-1000 µl) eingestellt und über Nacht mit 1-2 µg spezifischem Antikörper auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zur Bindung des Protein-Antikörper-Komplexes 35 µl Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Sepharose zugegeben und für weitere 3 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden dreimal mit Lysispuffer durch Zentrifugieren für 2 min bei 2500 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge gewaschen und letztlich in 35 µl Lämmli-Puffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C denaturiert und dann über SDS-PAGE analysiert.

2.2.3.6 Strippen der Nitrocellulose-Membran

Nitrocellulose-Membranen von Western-Blots können mehrmals mit Antikörpern gegen unterschiedliche Proteine inkubiert werden. Dazu muss der zuvor verwendete Antikörper durch „Strippen“ der Membran entfernt werden. Dafür wurde die Membran mit Strippingpuffer für 40 min bei 56 °C auf einem Drehrad inkubiert. Zur Entfernung des Strippingpuffers wurde die Membran dreimal 20 min mit TBST gewaschen und anschließend dreimal 20 min mit G-NET blockiert. Danach konnte die Nitrocellulose-Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Charakterisierung von CBL-Mutanten in rezeptor-exprimierenden Zellen

CBL ist ein negativer Regulator von Rezeptoren, insbesondere von Rezeptor-Tyrosinkinasen. Um den biologischen Phänotyp von CBL-Mutanten zu untersuchen, wurden Ba/F3-Zelllinien generiert, die verschiedene Rezeptoren und CBL-Konstrukte exprimieren. Bei der Ba/F3-Zelllinie handelt es sich um eine aus murinen lymphatischen pro-B-Zellen generierte IL-3-abhängige Zelllinie (Palacios, 1984)[105]. Diese eignet sich insbesondere für die Analyse von Onkogenen (Hayakawa, 2000)[106], da nur eine Transduktion transformierender Gene sie zu wachstumsfaktor-(IL-3)-unabhängigen Wachstum befähigt.

3.1.1 Unterschiedliches ligand-induziertes Wachstum bei rezeptor-exprimierenden Zellen

Zunächst wurden die cDNAs, die in Abbildung 1.2.1.1 gezeigten humanen Rezeptoren in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV-IRES-EYFP-(MIY)-Vektor kloniert. Die Tabelle 3.1.1 zeigt neben der Einteilung der Rezeptoren auch die jeweiligen verwendeten Liganden. Nach Überprüfung der vollständigen Nukleotidsequenz wurden die Rezeptoren stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert.

Die Expression der Rezeptor-Tyrosinkinasen und Zytokinrezeptoren wurde mittels spezifischen Antikörpern über Durchflusszytometrie und/oder Western-Blot nachgewiesen. Die Analyse der Rezeptorexpression über fluoreszenzmarkierte Antikörper mittels Durchflusszytometrie ergab eine unterschiedlich starke Oberflächenexpression, die in Abbildung 3.1.1.1 gezeigten Rezeptor-Tyrosinkinasen im Vergleich zur Isotypkontrolle. FLT3 zeigte die geringste Expression mit einem 3,5-fach höheren geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzstärke als beim Isotyp, und IGF1-R mit 150,6-fach den höchsten. Keiner der Rezeptoren wird in nativen Ba/F3-Zellen exprimiert.

Um die Funktionalität der Rezeptoren zu zeigen, wurden die Rezeptoren mit sättigenden Konzentrationen der jeweiligen Liganden inkubiert und deren Wachstumssignal untersucht.

Tabelle 3.1.1: Rezeptoren und Liganden

Rezeptoren	Liganden
RTK Klasse I „epidermal growth factor receptor“ (EGFR)	„epidermal growth factor“ (EGF)
RTK Klasse II „insulin-like growth factor 1 receptor“ (IGF1R)	„insulin-like growth factor 1 (IGF-1)
RTK Klasse III <ul style="list-style-type: none"> • „Fms-like tyrosine kinase 3“ (FLT3) • Stammzellfaktor-Rezeptor (KIT) • „platelet-derived growth factor receptor alpha“ (PDGFRA) • „platelet-derived growth factor receptor beta“ (PDGFRB) • „colony stimulating factor 1 receptor“ (CSF1R) 	FLT3-Ligand (FL) Stammzellfaktor (SCF) „platelet-derived growth factor AB“ (PDGF-AB) „platelet-derived growth factor BB“ (PDGF-BB) „colony stimulating factor 1“ (CSF-1)
RTK Klasse V „vascular endothelial growth factor receptor 2“ (VEGFR-2)	„vascular endothelial growth factor A“ (VEGF-A)
Typ I Zytokinrezeptor <ul style="list-style-type: none"> • Erythropoietin Rezeptor (EPOR) • Thrombopoietin Rezeptor (MPL) 	Erythropoietin (EPO) Thrombopoietin (TPO)

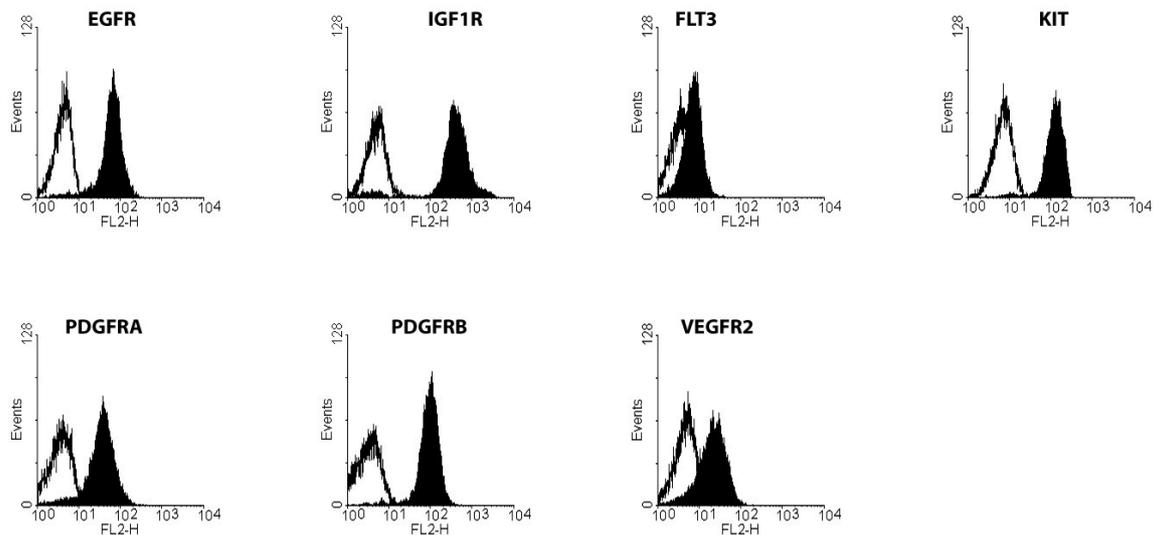


Abb. 3.1.1.1: Expression von Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Expression der Rezeptoren in den etablierten Ba/F3-Zellen wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Histogramme zeigen die Expression, der in die Zellen stabil eingebrachten Rezeptoren (schwarz) im Vergleich zur Isotypkontrolle (weiß). Die Expression von Rezeptoren folgender Rezeptor-Tyrosinkinasen Familien ist gezeigt: RTK-Klasse-I (EGFR), RTK-Klasse-II (IGF1R), RTK-Klasse-III (FLT3, KIT, PDGFRA, PDGFRB), RTK-Klasse-V (VEGFR-2).

Den Zellen wurden meist 100 ng/ml Ligand in das Zellkulturmedium dazugegeben; nur bei Erythropoietin mit 5 units/ml und M-CSF mit 50 ng/ml wurden andere Konzentrationen verwendet. Interessanterweise zeigten die rezeptor-exprimierenden Zellen je nach Rezeptor ein anderes liganden-induziertes Wachstum. Abbildung 3.1.2 zeigt die ligand-abhängige Proliferation der Zellen, relativ angegeben zu IL-3-stimuliertem Wachstum in Prozent. Dabei fällt auf, dass die mit den Rezeptoren FLT3 (6,58% des IL-3-Wachstums), KIT (1,98%), PDGFRA (2,01%) und PDGFRB (3,36%) transduzierten Zellen nur schwach durch ihre jeweiligen Liganden stimulierbar waren. Dagegen ließen sich die CSF1R- (79,77%), EGFR- (70,63%), IGF1R- (75,12%), EPOR- (102,15%) und MPL- (87,78%) exprimierenden Ba/F3-Zellen durch die entsprechenden Liganden zu einer der IL-3-Kontrolle vergleichbaren Proliferation anregen. Native sowie leervektor-exprimierende Zellen waren mit keinem der Liganden zu einer Proliferation zu stimulieren. Das variierende liganden-induzierte Wachstum konnte nicht in Zusammenhang mit der Expressionstärke der Rezeptoren gebracht werden. Nur die beiden Rezeptor-Tyrosinkinasen EGFR und IGF1R zeigten sowohl eine starke Expression als auch ein starkes ligand-induziertes Wachstum und FLT3 eine schwache Expression und ein schwaches Wachstum. VEGFR-2-transduzierte Zellen konnten in wiederholten Experimenten durch Zugabe von verschiedenen rekombinanten humanen (rh) VEGF nicht zu einer Proliferation gebracht werden.

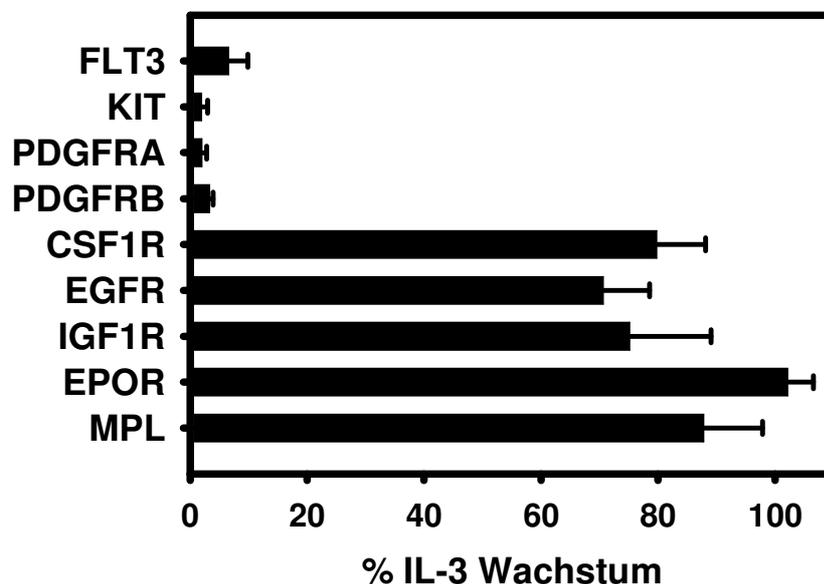


Abb. 3.1.1.2: Rezeptor-Stimulation. Die Proliferation von rezeptor-exprimierenden Ba/F3-Zellen über 72 h unter Zugabe des jeweiligen Liganden, angegeben in Prozent des IL-3-induzierten Wachstums. Rezeptoren aus folgenden Rezeptorfamilien wurden verwendet: Typ-I-Zytokinrezeptoren (EPOR, MPL); RTK-Klasse-I (EGFR); RTK-Klasse-II (IGF1R); RTK-Klasse-III (FLT3, KIT, PDGFRA, PDGFRB, CSF1R). Mindestens je 3 Replikate.

3.1.2 Unterschiedlich starker pro-proliferativen Phänotyp in rezeptor-exprimierenden Zellen durch CBL-Mutanten

Im Weiteren wurden schließlich CBL-Wildtyp (WT) und andere CBL-Konstrukte mit den verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und Zytokinrezeptoren in Ba/F3-Zellen koexprimiert, um den biologischen Phänotyp der CBL-Mutanten im Zusammenspiel mit den verschiedenen Rezeptoren zu untersuchen.

Die Expression der pMSCV-IRES-EGFP (MIG) CBL-Konstrukte wurde über deren Protein-Tag im Western-Blot nachgewiesen. Neben CBL-WT wurden die RING-Finger-Punktmutante CBL-R420Q und die LINKER-RING-Finger-Deletionsmutanten CBL-70Z über den Hämagglutinin (HA)-Tag und CBL Δ exon8 über den V5-Tag, einem Epitop des Simian-Virus 5 detektiert. In Abbildung 3.1.2.1 ist die Expression der CBL-Konstrukte stellvertretend für alle rezeptor-exprimierenden Zellen in EPOR- (A) und EGFR- (B) exprimierenden Zellen gezeigt. Die CBL-Konstrukte CBL-R420Q und CBL-70Z wurden nur mit EGFR kotransduziert.

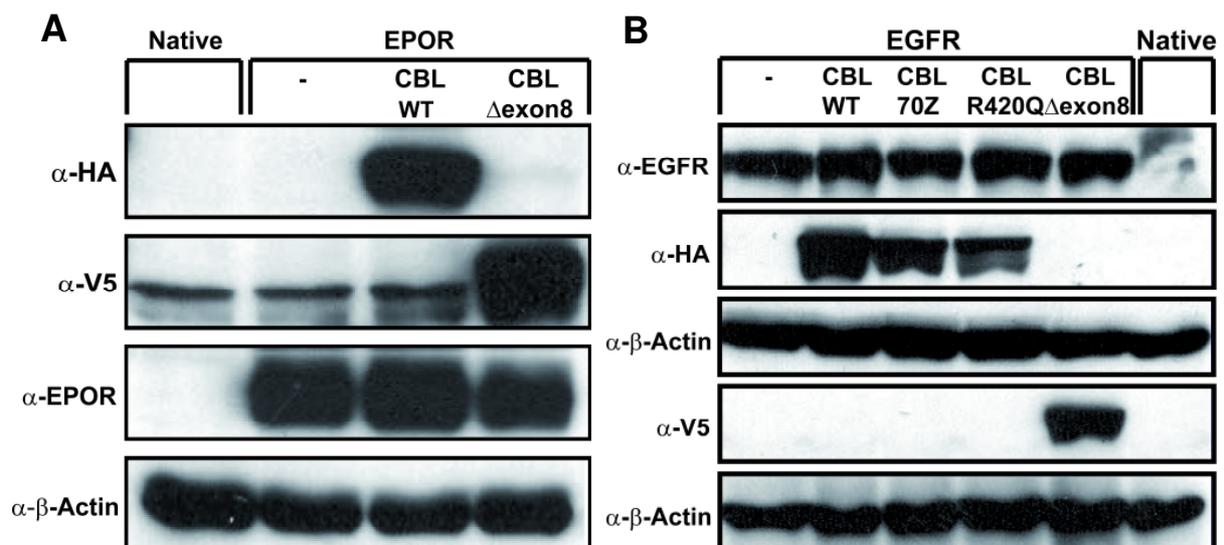


Abb. 3.1.2.1: Koexpression der CBL-Konstrukte. Ba/F3 Ganzzelllysate wurden auf die Expression der transduzierten Konstrukte hin untersucht. (A) Der EPO-Rezeptor wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen den Rezeptor detektiert. Die Expression des transduzierten CBL-WT wurde über dessen HA-Tag und CBL Δ exon8 über dessen V5-Tag nachgewiesen. Als Ladungskontrolle diente β -Actin. (B) Die Expression des EGF-Rezeptors wurde mit einem EGFR-spezifischen Antikörper nachgewiesen und die Konstrukte CBL-WT, CBL70Z und CBLR420Q wurden mit deren HA-Tag und CBL Δ exon8 mit dem V5-Tag detektiert.

Ein Phänotyp von Onkogenen ist ein erhöhtes Zellwachstum. Die Koexpression von CBL-R420Q zeigte in Proliferationsversuchen in Gegenwart von EGF mit EGFR-exprimierenden Zellen eine mit Leervektor und CBL-WT vergleichbare Proliferationsrate. Nur die beiden LINKER/RING-Finger-Deletionsmutanten CBL-70Z und CBL Δ exon8 wiesen ein signifikant stärkeres EGF-induziertes Wachstum auf (Abb. 3.1.2.2 A). Da die Deletionsmutanten den stärksten pro-proliferativen Phänotyp zeigten, wurde die von uns in AML-Patienten gefundene CBL Δ exon8-Mutante [8] für die weiteren Experimente verwendet und mit den anderen Rezeptoren kotransduziert.

Um auszuschließen, dass schon die alleinige Expression der CBL-Konstrukte die Zellen transformiert, wurden zuvor in native Ba/F3-Zellen CBL-WT und CBL Δ exon8 stabil retroviral transduziert. Die Expression der Proteine wurde wieder über deren Protein-Tag im Immunblot nachgewiesen. Im Proliferationsexperiment führten beide Konstrukte allein zu keinem zytokin-unabhängigen Wachstum der Ba/F3-Zellen (Abb. 3.1.2.2 B).

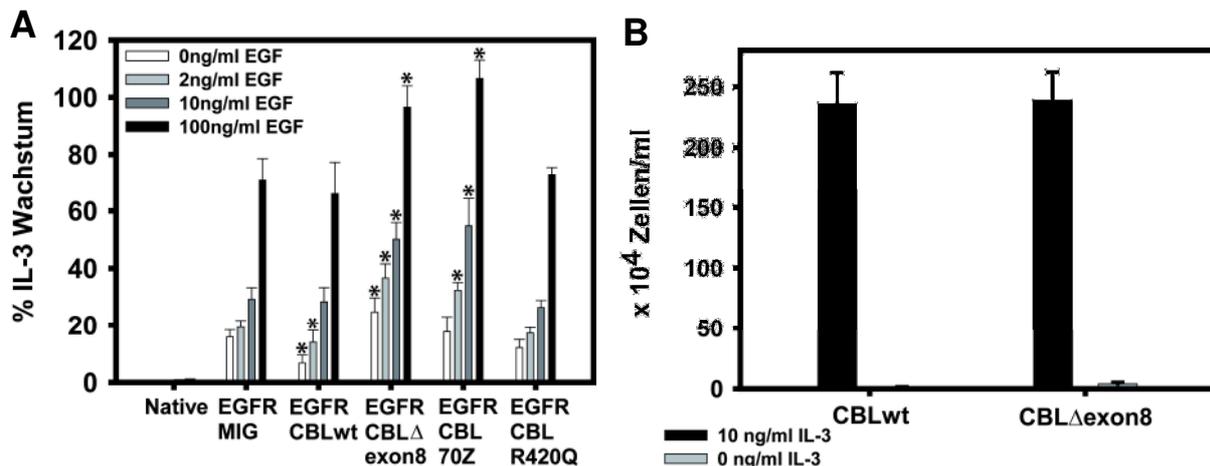


Abb. 3.1.2.2: Proliferation von EGFR/CBL- und CBL-exprimierenden Zellen. (A) EGFR-exprimierende Zellen wurden mit verschiedenen CBL-Varianten (WT, Δ exon8, 70Z, R420Q) stabil transduziert und über 72 h mit bis zu 100 ng/ml EGF und 10 ng/ml IL-3 inkubiert. Das EGF-induzierte Wachstum ist in Prozent des IL-3-Wachstums angegeben (drei biologische Replikate, $*p < 0,003$ im Vergleich zu EGFR/MIG-Zellen, t-Test). (B) Ba/F3-Zellen, die CBL-WT bzw. CBL Δ exon8-exprimieren wurden über 72 h mit bzw. ohne 10 ng/ml IL-3 stimuliert. Angegeben ist die absolute Zellzahl.

3.1.3 Verstärkung der Proliferation von RTK-Klasse-III-exprimierenden Zellen durch CBL-Mutanten

Die verschiedenen Rezeptoren waren im Ba/F3-Zellmodell durch die verwendeten Liganden stimulierbar und zeigten eine ligand-induzierte Proliferation. Nun wurde die Ansprechbarkeit der Rezeptor/CBL Δ exon8-Zellen auf die Liganden untersucht. Dafür wurden alle Rezeptoren sowohl mit CBL-WT als auch CBL Δ exon8 transduziert. Die Koexpression von CBL-WT führte mit allen Rezeptoren zu keiner bzw. einer nur marginalen Änderung der Wachstumsrate. Die Koexpression der Mutante CBL Δ exon8 hingegen führte in Kooperation mit allen kotransduzierten Rezeptoren zu einer gesteigerten Proliferation in Gegenwart der Liganden. Abbildung 3.1.3 C zeigt die Proliferationsrate der Rezeptor/CBL Δ exon8-Zellen als Vielfaches der entsprechenden Rezeptor/CBL-WT-Zellen. Dabei konnten die einzelnen Rezeptoren nach dem CBL Δ exon8-induzierten Wachstumsvorteil in zwei Gruppen eingeteilt werden: Gruppe I mit einer stark gesteigerten Proliferationsrate (10-13-fach) im Vergleich zu CBL-WT-exprimierenden Zellen oder Gruppe II mit einem nur marginalen Wachstumsvorteil (1-1,5-fach). Die Gruppe I besteht aus den RTK-Klasse-III-Rezeptoren FLT3, KIT, PDGFRA und PDGFRB. Diese Zellen zeigten auch einen deutlichen IL-3-unabhängigen Wachstum im Zusammenspiel mit CBL Δ exon8 (Abb. 3.1.3 A). Zur zweiten Gruppe gehören die Rezeptoren CSF1R, EGFR, IGF1R, EPOR und MPL (Abb. 3.1.3 B). Neben den Rezeptoren der Gruppe I zeigten auch die EGFR- und IGF1R-exprimierenden Zellen IL-3-unabhängigen Wachstum, was aber wahrscheinlich auf die Zusammensetzung der verwendeten FKS-Charge zurückzuführen ist. Bei den VEGFR-2-Zellen kam es zu keinem Wachstum, die VEGFR-2/CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen wiesen zwar im Vergleich zu den anderen VEGFR-2-exprimierenden Zellen eine höhere Zellzahl nach 72 h Stunden auf; jedoch war auch diese Zellzahl geringer als die anfänglich ausgesähte.

Der unterschiedliche pro-proliferative Phänotyp der CBL-Mutante im Zusammenspiel mit den Rezeptorgruppen wurde noch deutlicher bei Beobachtung der Proliferation über einen längeren Zeitraum. KIT-, KIT/CBL Δ exon8- als Beispiel der Gruppe I und EGFR-, EGFR/CBL Δ exon8-Zellen als Beispiel der Gruppe II wurden in einer Langzeitproliferation von 20 ng/ml SCF bzw. 10 ng/ml EGF und 10 ng/ml IL-3 inkubiert (Abb. 3.1.3 D/E). Die Zellzahl wurde alle 3 Tage bestimmt und die Zellen bei einer Zellzahl über 2×10^6 Zellen/ml verdünnt. Mit IL-3 wuchsen alle Zelllinien von anfangs 4×10^4 Zellen auf 2×10^8 Zellen nach 15 Tagen. In Anwesenheit von SCF erreichten die KIT/CBL Δ exon8-Zellen eine Zellzahl von 1×10^7 . Die KIT-Zellen wuchsen dagegen nicht. Die EGFR/CBL Δ exon8-Zellen wuchsen mit EGF in 15 Tagen auf $1,5 \times 10^8$, die EGFR-exprimierenden Zellen auf $2,7 \times 10^7$ Zellen. Auch dieser Versuch zeigte die deutlich stärkere Kooperation der CBL-Mutante mit einem Rezeptor der Gruppe I bei der ligand-induzierten Proliferation.

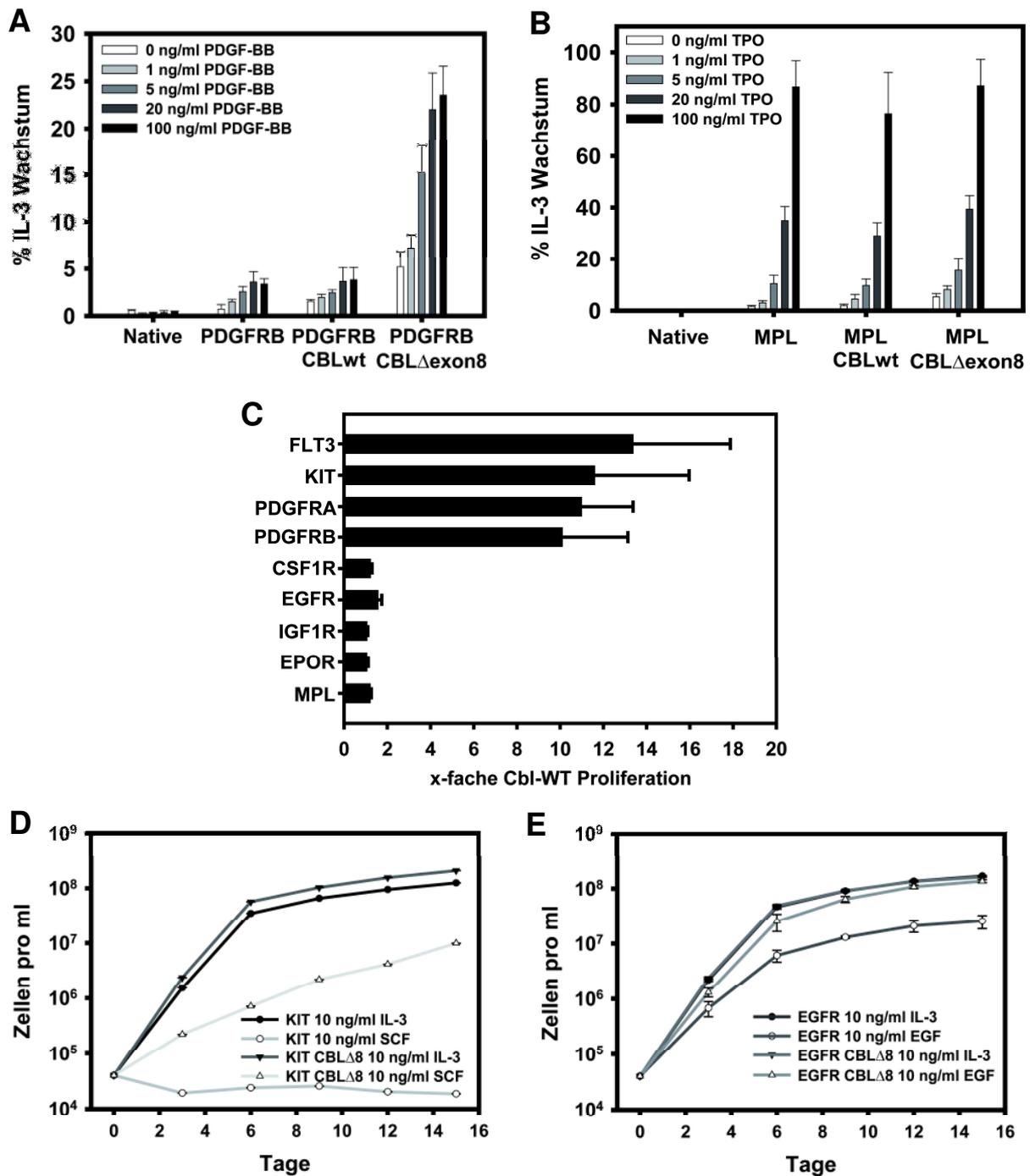


Abb. 3.1.3: Proliferation von Rezeptor-WT/CBL-exprimierenden Zellen. Ba/F3-Zellen wurden mit angegebenen Wildtyp-Rezeptoren und CBL-WT bzw. CBL Δ exon8 kotransduziert. Mit den stabilen Zelllinien wurden Proliferationsexperimente in Gegenwart von aufsteigenden Ligandkonzentrationen und 10 ng/ml IL-3 über 72 h durchgeführt. Native Ba/F3-Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. (A) Proliferation der PDGFRB-exprimierende Zellen. (B) Proliferation der MPL-exprimierenden Zellen. (C) Die Wachstumsrate der Rezeptor-WT/CBL Δ exon8-Zellen ist als x-faches der Rezeptor-WT/CBL-WT-Zellen in Gegenwart sättigender Ligandkonzentrationen angegeben. (D) Zellen, kotransduziert mit KIT und CBL-WT bzw. CBL Δ exon8, wurden in Gegenwart von 10 ng/ml IL-3 bzw. 20 ng/ml SCF über 15 Tage kultiviert. (E) EGFR- und EGFR/CBL Δ exon8-exprimierende Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-3 bzw. EGF über 15 Tage kultiviert.

3.1.4 Apoptoseresistenz nach Zytokin-Entzug durch CBL-Mutanten

Im Folgenden wurde der Einfluss der CBL-Mutante auf die Apoptose untersucht - einen weiteren biologischen Prozess, in den Onkogene eingreifen. Dafür wurden die etablierten Zellen 72 h ohne Zytokinzusatz inkubiert und dann mit 7-AAD und Annexin-V gefärbt, um mittels Durchflusszytometrie die Apoptoserate zu bestimmen. Die Apoptoserate betrug bei den nativen Zellen 90% und bei den rezeptor- und rezeptor/CBL-WT-exprimierenden Zellen 70-90% (gezeigt für FLT3, Abb. 3.1.4 A). Das zusätzlich exprimierte CBL-WT führte zu einem marginalen Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen in rezeptor-exprimierenden Zellen (für FLT3 $p=0,07$; KIT $p<0,001$; VEGFR2 $p=0,05$). Die alleinige Expression der CBL-Mutante führte zu einem 40%-igen Apoptoseschutz (Abb. 3.1.4 B). Zellen, die FLT3 und CBL Δ exon8-koexprimierten hatten eine deutlich niedrige Apoptoserate von unter 20% (Abb. 3.1.4 B). In Anwesenheit von 10 ng/ml IL-3 waren ca. 5% der Zellen apoptotisch. Die Apoptoseresistenz durch die CBL-Mutante war in KIT-exprimierenden Zellen etwas weniger stark ausgeprägt als bei FLT3. Im Zusammenspiel mit KIT reduzierte sich die Apoptoserate von 90% auf 50%. Generell war die Apoptoserate der rezeptor-exprimierenden Zellen in Anwesenheit der Rezeptorliganden niedriger. Auch die nicht proliferierenden VEGFR2-exprimierenden Zellen erlangten durch die CBL-Mutante eine erhöhte Apoptoseresistenz. Dieser Apoptoseschutz erklärte auch die höhere Zellzahl der VEGFR-2/CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen im Proliferationsexperiment (3.1.3).

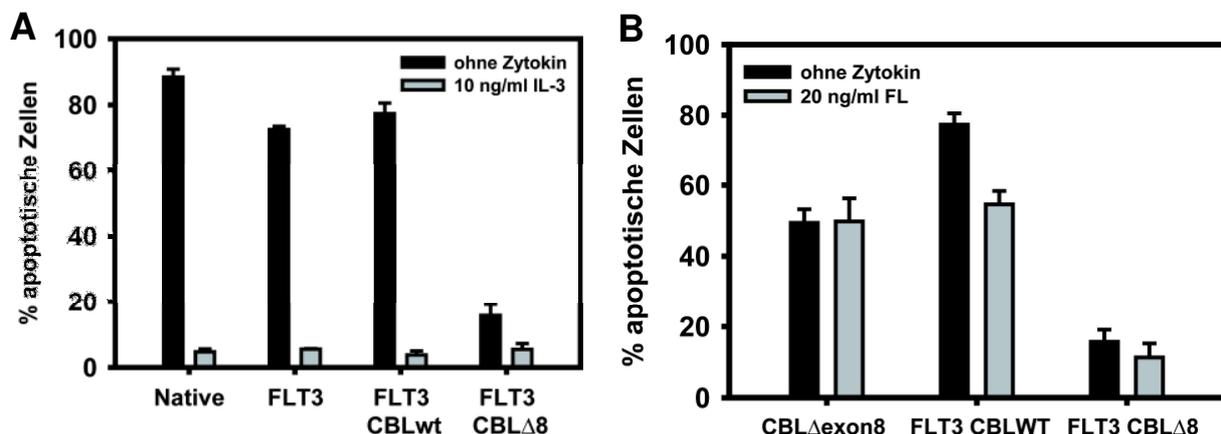


Abb. 3.1.4: Apoptose von FLT3-WT/CBL-exprimierenden Zellen. Mit FLT3- und CBL-transduzierte Zellen wurden über 72 h ohne Zytokinzusatz bzw. mit 10 ng/ml IL-3 inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an apoptotischen Zellen über Annexin-V- und 7-AAD-Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.1.5 Verzögerung der Internalisierung der Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinasen durch CBL Δ exon8

CBL ist ein Bestandteil des Ubiquitin-Systems. Durch Ubiquitinierung initiiert CBL die Internalisierung und die Degradierung über clathrin-umhüllte Vesikel von aktivierten Rezeptoren [58].

Über Durchflusszytometrie wurde der Einfluss der CBL-Mutante auf die Internalisierung von Rezeptoren der Gruppe I und Gruppe II analysiert. In den Zellen, die einen Rezeptor der Gruppe I exprimierten (starker Wachstumsvorteil mit CBL-Mutante) wurde die Internalisierung nach Ligandstimulation des Rezeptors deutlich verlangsamt, wie es in Abbildung 3.1.5 im Falle von PDGFRA (A) und FLT3 (B) zu sehen ist. Der Expressionsverlust von IGF1R (Rezeptor der Gruppe II) an der Zelloberfläche ist dagegen nur minimal verzögert in den CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen (Abb. 3.1.5 C).

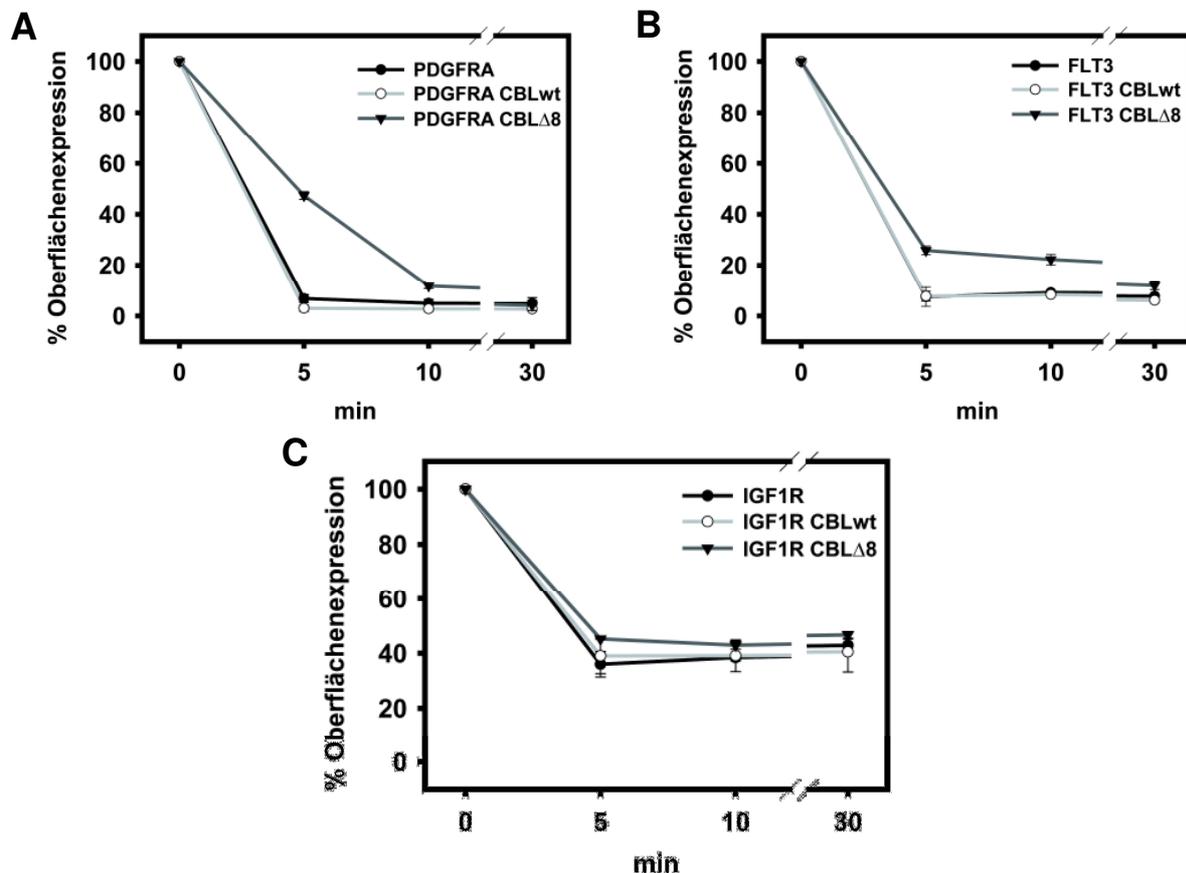


Abb. 3.1.5: Internalisierung von rezeptor-WT/CBL-exprimierenden Zellen. Mit Rezeptoren und CBL transfizierten Zellen wurden mit 100 ng/ml Ligand für 0,5,10 bzw. 30 min stimuliert. Danach wurde über einen natriumazid-enthaltenden Puffer die Internalisierung gestoppt und die Rezeptorexpression über Antikörperfärbung an der Zelloberfläche durch Durchflusszytometrie gemessen. Der Prozentwert der Oberflächenexpression des Rezeptors wurde relativ zur unstimulierten Probe nach Abzug der Isotyp-Kontrolle bestimmt. (A) PDGFRA-exprimierende Zellen; (B) FLT3-exprimierende Zellen; (C) IGF1R-exprimierende Zellen.

3.1.6 Verstärkung der Phosphorylierung der RTK-Klasse-III nach Ligandstimulation durch die CBL-Deletionsmutante

Das verstärkte Wachstum, die vermittelte Apoptoseresistenz und die Verzögerung der Rezeptor-Internalisierung durch onkogenes CBL könnte mit einer erhöhten Aktivität der RTK-Klasse-III zusammenhängen. Um dem auf den Grund zu gehen, wurden die Rezeptoren aus Ganzzelllysaten von unstimulierten und stimulierten Zellen immunpräzipitiert und mit einem Phospho-Tyrosin-Antikörper detektiert. Immunblot-Analysen der RTK/CBL-koexprimierenden Zellen ergaben auch eine stärkere Phosphorylierung der Rezeptoren nach Ligandstimulation in CBL Δ exon8-exprimierenden Zellen im Vergleich zu CBL-WT-exprimierenden Zellen. Zudem war die Phosphorylierung bei Rezeptoren der Gruppe I deutlich ausgeprägter als bei Rezeptoren der Gruppe II, wenn die CBL-Mutante koexprimiert wurde. In KIT/CBL Δ exon8-koexprimierten Zellen war der Rezeptor 3,7-mal (relative Bandenstärke) stärker phosphoryliert als in KIT/CBL-WT-Zellen. In CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen war FLT3 3,0-mal und der IGF1-Rezeptor dagegen nur 1,4-mal stärker phosphoryliert (Abb. 3.1.6). Als Positiv-Kontrolle wurde auch ein Ganzzelllysate von IL-3-stimulierten nativen Ba/F3-Zellen aufgetragen, die eine starke Phosphorylierung des IL-3-Rezeptors zeigten.

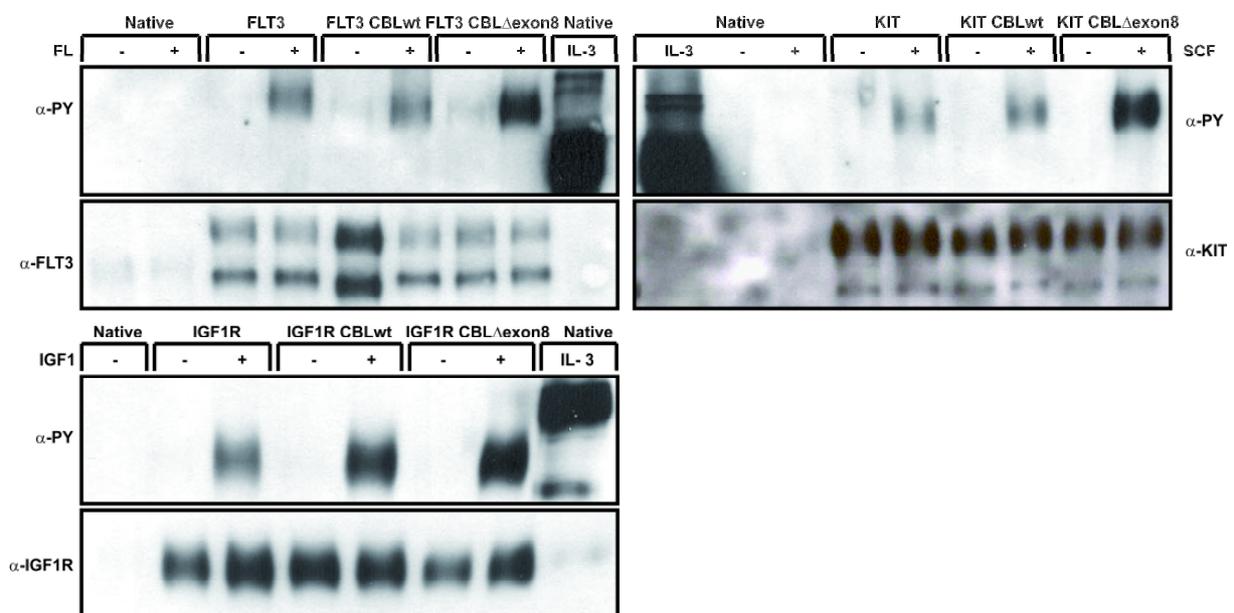


Abb. 3.1.6: CBL-Deletionsmutante führt zu einer stärkeren Phosphorylierung von RTK-Klasse-III-Rezeptoren. Es wurden Ganzzelllysate aus mit 100 ng/ml Ligand stimulierten bzw. unstimulierten Rezeptor/CBL-exprimierenden Zellen hergestellt. Das Rezeptorprotein wurde mit Rezeptor-Antikörper immunpräzipitiert, mittels SDS-Page aufgetrennt und mit Phospho-Tyrosin-Antikörper analysiert. Die Blots wurden gestrippt und mit Rezeptor-Antikörpern inkubiert.

3.1.7 Verhinderung der CBL-induzierten Proliferation durch pharmakologische Inhibition der Rezeptoren

Da die Rezeptor/CBL Δ exon8-exprimierenden Zellen ein erhöhtes ligand-abhängiges Wachstum und eine Rezeptorphosphorylierung aufwiesen, wurde überprüft, ob dieses Wachstum durch Verwendung von spezifischen Proteintyrosinkinassen (PTK)-Inhibitoren hemmbar ist. Hierfür wurden zum Einen Erlotinib, ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors, zum Anderen die selektiven PTK-Inhibitoren SU5614 und PKC412 für FLT3- und PDGF-Rezeptoren verwendet (Abb. 3.1.9). Die Proliferation sowohl der EGFR- als auch der EGFR/CBL-Zellen konnte mit nicht toxischen Konzentrationen Erlotinibs vollständig aufgehoben werden. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Substanzen wurde mit Hemmkurven bestimmt. Bei EGFR-Zellen hatte Erlotinib einen IC_{50} von 199 nM, bei EGFR/CBL Δ exon8-Zellen hingegen von 50 nM in Anwesenheit von 10 ng/ml EGF. Auch die Hyperproliferation von FLT3/CBL Δ exon8 und PDGFRA/CBL Δ exon8 Ba/F3-Zellen konnte durch die Inhibitoren SU5614 und PKC412 verhindert werden. Der IC_{50} von SU5614 betrug für FLT3-exprimierende Zellen bei 20 ng/ml FL 835 nM, für FLT3/CBL Δ exon8 1550 nM. PKC412 inhibierte das Wachstum mit einem IC_{50} von 80 nM bei FLT3-Zellen und von 19 nM bei FLT3/CBL Δ exon8-Zellen. PDGFRA Zellen wurden durch SU5614 mit einem IC_{50} von 411 nM und PDGFRA/CBL Δ exon8-Zellen von 266 nM in Anwesenheit von 100 ng/ml PDGF-AB inhibiert. Die PTK-Inhibitoren führten auch zu einer Apoptoseinduktion bei den Rezeptor/CBL-exprimierenden Zellen in Gegenwart der Liganden (Abb. 3.1.9 E/F). Die Apoptoseinduktion war etwas geringer in CBL Δ exon8-exprimierenden Zellen im Vergleich zu CBL-WT-exprimierenden Zellen.

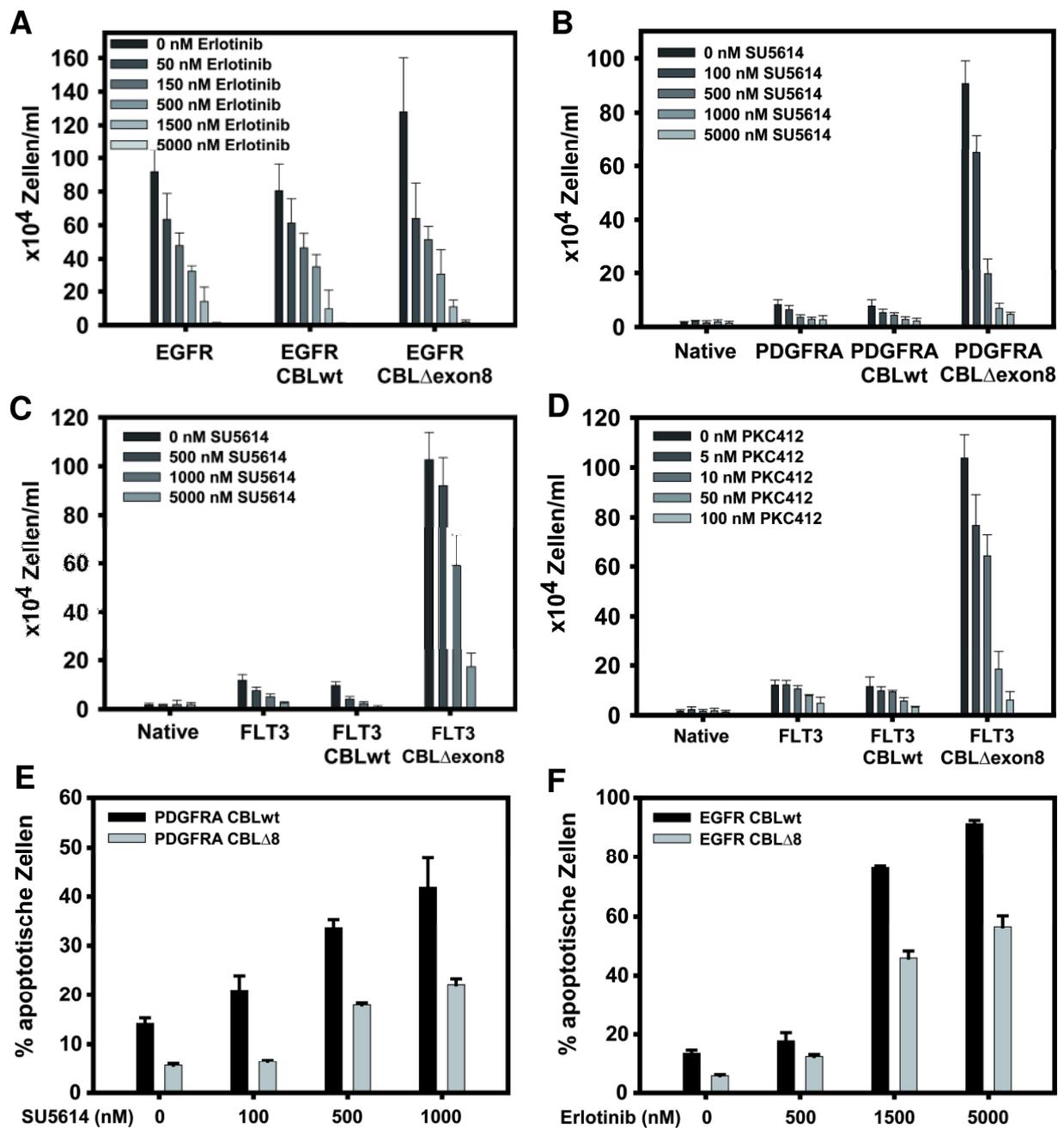


Abb. 3.1.7: PTK-Inhibition der etablierten Zelllinien. (A) EGFR/CBL-Zellen, stimuliert mit 10 ng/ml EGF, wurden mit EGFR-Inhibitor Erlotinib inkubiert und die Zellzahl nach 72 h über Trypanblaufärbung bestimmt. (B) PDGFRA/CBL-Zellen, stimuliert mit 100 ng/ml PDGF-AB, wurden mit SU5614 inhibiert und (C, D) FLT3/CBL-Zellen mit den beiden PTK-Inhibitoren SU5614 und PKC412 in Gegenwart von 20 ng/ml FL. (E) PDGFRA/CBL-Zellen wurden mit 20 ng/ml PDGF-AB und aufsteigenden Konzentrationen von SU5614 kultiviert und nach 48 h die Apoptoserate bestimmt. (F) Nach 48 h wurde die Anzahl an apoptotischen Zellen in EGFR/CBL-Zellen bestimmt, die mit 20 ng/ml EGF und aufsteigenden Erlotinib-Konzentrationen kultiviert wurden.

3.1.8 Verhinderung des pro-proliferativen Phänotyps der CBL-Mutante durch die Koexpression eines Kinase-inaktiven Rezeptors

Es wurde gezeigt, dass durch eine Inhibition der Rezeptoren das Wachstum der mit CBL-Mutante kontransduzierten Zellen komplett gehemmt werden kann. Durch Verwendung eines FLT3-Rezeptors (FLT3-K644R) mit einer nicht-funktionalen Kinasedomäne sollte bekräftigt werden, dass der transformierende Phänotyp von CBL auf einem funktionsfähigen Rezeptor beruht. Durch den Austausch des Lysin 644 zu einem Arginin wird ein Ionenpaar mit dem Glutamat 661 aufgehoben, das für die Nukleotid-Bindung am FLT3-Rezeptor essentiell ist [107]. Zu diesem Zweck wurden stabile Zelllinien hergestellt, die FLT3-WT bzw. FLT3-K644R und CBL-WT bzw. CBL Δ exon8 exprimierten. Die Expression von FLT3 und der FLT3-Kinase-inaktiven Mutante wurde über Oberflächenmarkerfärbung nachgewiesen (Abb. A1 A), die Expression von CBL-WT und CBL Δ exon8 über Western-Blot (Abb. A1 B). Um zu zeigen, dass die FLT3-K644R-Mutante nicht funktionsunfähig ist, wurde die Phosphorylierung der MAPK in FL-stimulierten Ganzzelllysaten über Western-Blot detektiert. Im Gegensatz zu den Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor war die MAPK nach Stimulation bei den FLT3-K644R-exprimierenden Zellen nicht aktiviert (Abb. A1 B).

Nachdem gezeigt wurde, dass die transduzierten Konstrukte exprimiert werden, wurden Proliferationsversuche mit den etablierten Zelllinien durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10^4 Zellen/ml ausgesät und über 72 h ohne Zytokine oder in Gegenwart von 100 ng/ml FL kultiviert (Abb. 3.1.8). Die FLT3-K644R/CBL Δ exon8-Zellen zeigten weder das zytokinunabhängige-Wachstum der FLT3-WT/CBL Δ exon8-Zellen, noch ein erhöhtes Wachstum durch den FLT3-Liganden. Damit wurde gezeigt, dass der transformierende Phänotyp der CBL-Mutante durch einen funktionsfähigen FLT3-Rezeptor vermittelt wird.

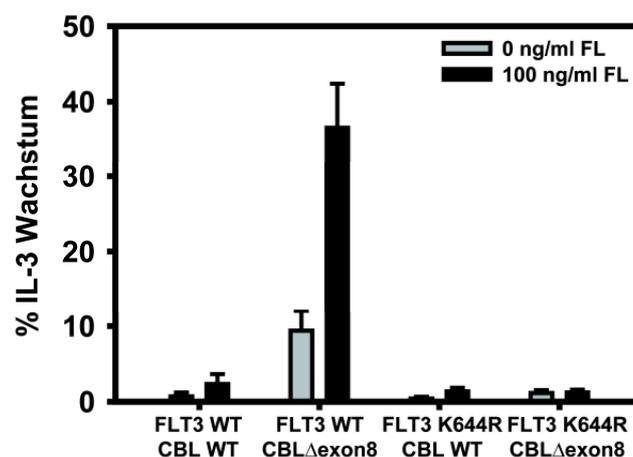


Abb. 3.1.8: Proliferation der Kinase-inaktiven FLT3-rezeptor-exprimierenden Zellen. Ba/F3-Zellen wurden mit FLT3-WT oder FLT3K644R und CBL-WT bzw. CBL Δ exon8 kotransduziert. Mit den stabilen Zelllinien wurden Proliferationsexperimente in Gegenwart von 100ng/ml FL und 10 ng/ml IL-3 über 72 h durchgeführt. Die viablen Zellen wurden anschließend über Trypanblaufärbung bestimmt.

Tabelle 3.1.8 fasst die untersuchten Phänotypen der CBL-Mutante zusammen, die zusammengenommen als transformierender Phänotyp bezeichnet werden und in Kooperation mit RTK-Klasse-III-Rezeptoren stärker ausgeprägt sind. Dieser Phänotyp ist von einem intakten Rezeptor abhängig und wird durch Inhibition des Rezeptors gehemmt.

Tabelle 3.1.8: Transformierender Phänotyp der CBL-Mutante CBL Δ exon8

<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte ligand-induzierte Proliferation • Zytokin-unabhängiges Wachstum <ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Apoptoseresistenz • Verzögerte Rezeptor-Internalisierung • Stärkere ligand-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung

3.1.9 Einfluss von CBL-LINKER-Mutanten auf Proliferation und Apoptose in FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen

Die häufigsten CBL-Mutationen betreffen die LINKER-Region und die RING-Finger-Domäne des Proteins. Um den Einfluss der LINKER-Region auf Proliferation und Apoptose zu analysieren, wurden häufige CBL-Punktmutationen zusammen mit FLT3 stabil in Ba/F3-Zellen koexprimiert. Die beiden Tyrosine Y368 und Y371 in der LINKER-Region sind von großer Bedeutung für die Funktion von CBL (Abb. 3.1.10). Beide Tyrosine wurden im HA-getaggten CBL-WT-Konstrukt zu Phenylalanin mutiert und im Falle von Y371 zusätzlich zu einem Histidin, was die häufigste Punktmutation von CBL darstellt. Die Expression der CBL-Konstrukte und FLT3 wurde über Immunblot bzw. Durchflusszytometrie nachgewiesen (Abb. 3.1.9.1).

Mit den etablierten stabilen Zelllinien wurden Proliferationsversuche über 72 h in Gegenwart von 10 ng/ml IL-3 und 0, 20, 100 ng/ml FL angesetzt. Alle CBL-LINKER-Mutanten, koexprimiert mit FLT3, erreichten in Anwesenheit von FL 6-17% des Wachstums der IL-3-Kontrolle. Das stärkste Wachstum mit 16,7% zeigte dabei die Y371H-Mutante, gefolgt von der Doppelpunktmutante YY368/371FF mit 11,6% und Y371F mit 6,6%. Jedoch sowohl das zytokinunabhängige als auch das ligand-induzierte Wachstum aller LINKER-Mutanten-koexprimierenden Zellen war deutlich schwächer als bei der LINKER-RING-Finger-Deletionsmutante (Abb. 3.1.9.2 A).

Neben dem Effekt auf die Proliferation der Zellen wurde auch der Anteil an apoptotischen Zellen nach Zytokin-Entzug untersucht. Über Annexin-V und 7-AAD wurden die apoptotischen Zellen angefärbt und über Durchflusszytometrie bestimmt. Der Anteil der apoptotischen Zellen korrelierte invers mit der Proliferation der Zelllinien. FLT3/CBL Δ exon8-

Zellen zeigten sowohl die stärkste Proliferation als auch mit 18% den geringsten Prozentsatz an apoptotischen Zellen. Bei den LINKER-Mutanten zeigten die FLT3/CBL-Y371H-Zellen mit 28% die stärkste Apoptoseresistenz, gefolgt von FLT3/CBL-YY368/371FF mit 40% und FLT3/CBL-Y371F mit 44% apoptotischen Zellen (Abb. 3.1.9.2 B). Im Gegensatz zur alleinigen Expression der CBL Δ exon8-Mutante mit 62% apoptotischen Zellen bewirkte die alleinige Expression der LINKER-Mutanten und CBL-WT keine signifikante Verringerung der 90% apoptotischen Zellen der Leervektor-exprimierenden Ba/F3. In Gegenwart von IL-3 betrug bei allen Zelllinien der Prozentsatz an apoptotischen Zellen 3-4%.

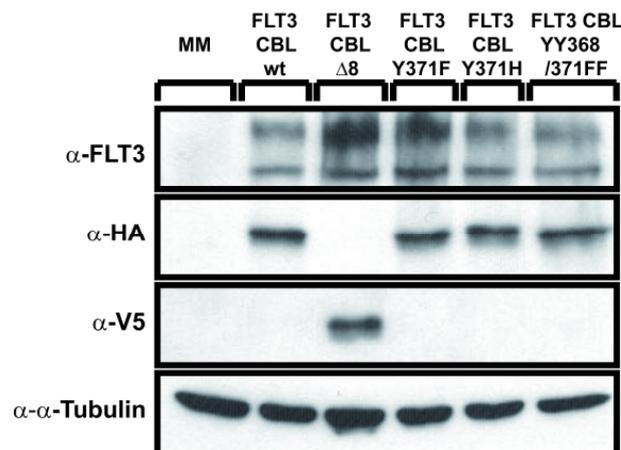


Abb. 3.1.9.1: Expression der CBL-Mutanten und FLT3. Ganzzelllysate der FLT3/CBL-transduzierten Zellen wurden über Western-Blot mit Antikörpern gegen FLT3, HA für CBL-WT und V5 für CBL Δ exon8 analysiert, um die Expression der Konstrukte nachzuweisen (MM = MIY/MIG Leervektoren). Durch Immunblotting mit einem Antikörper gegen α -Tubulin wurden vergleichbare Level an aufgetragenem Protein nachgewiesen.

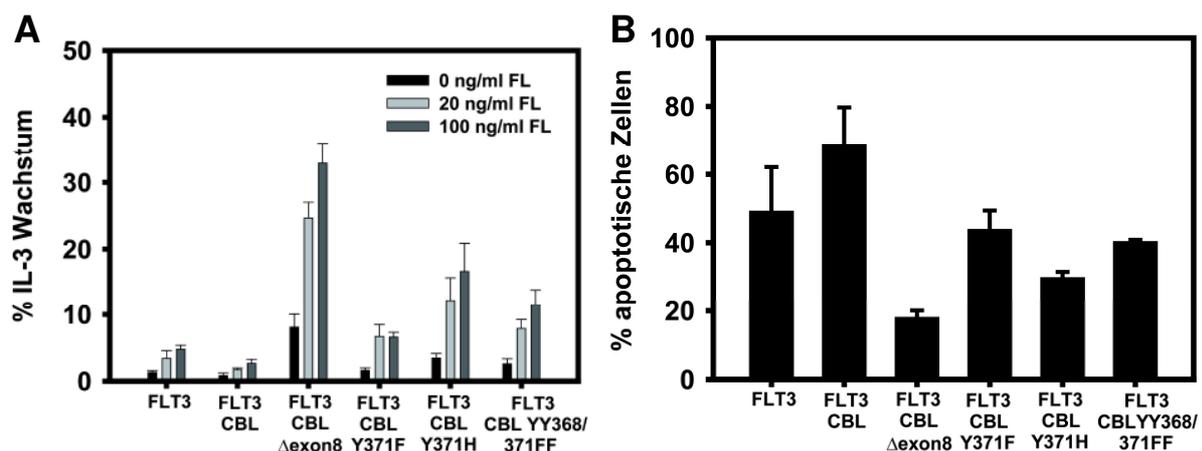


Abb. 3.1.9.2: Proliferation und Apoptose der FLT3-WT/CBL-Mutanten-koexprimierenden Zellen. (A) Ba/F3-Zellen, stabil transduziert mit FLT3-WT und angegebenen CBL-Varianten, wurden in Anwesenheit von FL (0, 20, 100 ng/ml) und 10 ng/ml IL-3 kultiviert. Nach 72 h wurde die Zellzahl der viablen Zellen über Trypanblaufärbung bestimmt. Das FL-stimulierte Wachstum ist in Prozent des IL-3-Wachstum angegeben. (B) Ba/F3-Zellen wurden 72 h ohne Zytokinzusatz und mit 10 ng/ml IL-3 inkubiert, danach mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt und über Durchflusszytometrie analysiert, um die Apoptoserate der Zellen zu bestimmen.

3.1.10 Screening von CMML-Patienten auf CBL-LINKER/RING-Finger-Mutationen

Es wurde gezeigt, dass sowohl Mutationen im LINKER- als auch in der RING-Finger-Domäne onkogenes Potential haben. Durch das Screenen dieser Domänen in primären Proben sollte die klinische Relevanz dieser Mutationen aufgezeigt werden. Da bei Patienten mit chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) mit die höchste CBL-Mutationsrate beschrieben wurde, wurden von 27 anonymisierten CMML-Patienten aus der Probenbank des Leukämie-Diagnostiklabors des Universitäts-Klinikums München die Exone 6 bis 10 des *CBL*-Gens aus cDNAs amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei 4 der 27 Patienten (14,8%) wurden heterozygote Alterationen im Exon 8 (Aminosäure 366-409) oder Exon 9 (Aminosäure 410-477) gefunden. Patient 1 hatte die häufige Punktmutante Y371H [108], Patient 2 eine Deletion des gesamten Exon 9, Patient 3 eine Deletion von Y371 [109] und Patient 4 hatte zwei Mutationen, K382Q und C404W (Tab. 3.1.10). Die Mutationen von Patient 2 und 4 sind bisher noch nicht beschrieben worden.

Tabelle 3.1.10: CBL-Mutationen in CMML-Patienten.

Patient	Mutation	Betroffendes Exon
1	c.1111T>C; p.Y371H	Exon 8
2	c.1228_1431del204; p.E410_K477del	Exon 9
3	c.1111_1113del3; p.Y371del	Exon 8
4	c.1144A>C; p.K382Q c.1212T>G; p.C404W	Exon 8 Exon 8

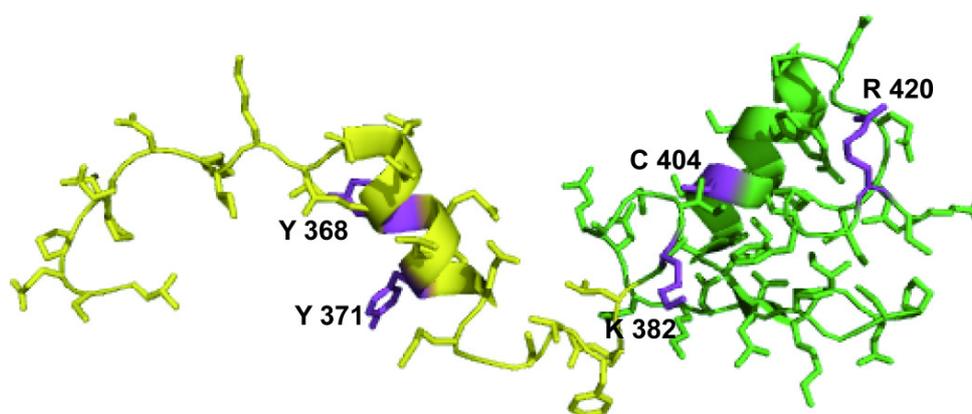


Abb. 3.1.10: Mutationen in der LINKER- und RING-Finger-Domäne. Die LINKER-Region (gelb; Exon 7/8) von CBL wird von den Aminosäuren 352 bis 380 kodiert, daran anschließend folgt die RING-Finger-Region (grün; Exon 8/9) bis zur Aminosäure 423 (modifiziert aus „Protein Data Bank“ (PDB) Nr. 1FBV). Hervorgehoben (magenta) sind die Aminosäuren, von denen in dieser Arbeit Mutationen beschrieben oder eingefügt wurden (Y368; Y371; K382; C404; R420).

3.1.11 Beeinträchtigung der E3-Aktivität durch Mutationen im LINKER und RING-Finger

Die beiden Proteindomänen LINKER und RING-Finger sind essentiell für die Funktion von CBL als negativer Regulator von aktivierten RTKs. Mutationen in diesen Domänen beeinträchtigen die Aktivität der Ubiquitin-Ligase. Im inaktiven Zustand verhüllen die TKB- und die RING-Finger-Domäne die E2-Bindungsstelle. Substratbindung bewirkt eine Rotation der TKB-Domäne, was die E2-Bindungsstelle teilweise freilegt. Durch Phosphorylierung des LINKER-Tyrosins 371 kommt es zu einer Rotation der LINKER-Domäne, die schließlich die E2-Bindungsstelle vollständig freilegt [110]. Eine Mutation der LINKER-Tyrosine verhindert diese Konformationsänderung von CBL wegen der fehlenden Phosphorylierungsstellen. Dadurch wird auch die RING-Finger-Domäne nicht richtig zum Zielprotein positioniert und ein effizienter Ubiquitintransfer verhindert (Abb. 3.1.11). Eine Mutation im RING-Finger verhindert die Bindung des Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyms und damit den Transfer des Ubiquitins. Die CBL-Mutante führt damit zu einer verlangsamteten Rezeptor-Internalisierung und einer höheren Aktivität der Rezeptor-Signalwege, was sich in einer erhöhten Proliferation und Schutz gegen den programmierten Zelltod zeigt.

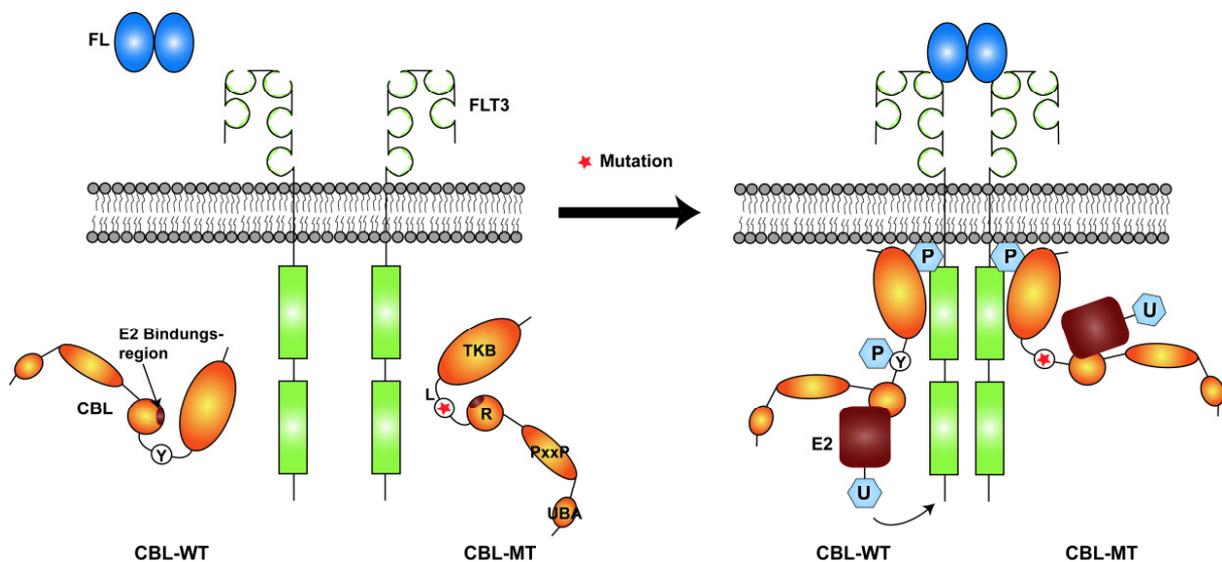


Abb. 3.1.11: Mutationen in der LINKER-Domäne beeinträchtigen E3-Aktivität. Mutationen der LINKER-Region verhindern richtige Positionierung der RING-Finger-Domäne zum Zielprotein (CBL-Mutante = CBL-MT).

3.2 AKT als Mediator der CBL-induzierten Transformation

3.2.1 Verstärkung der AKT-Phosphorylierung in CBL Δ exon8/RTK-Klasse-III-Zellen nach Ligandstimulation

Als negativer Regulator von Rezeptoren und als Adapterprotein nimmt CBL eine wichtige Rolle in zellulären Signalwegen ein. Um den verantwortlichen Signalweg für den transformierenden Phänotyp von CBL zu identifizieren wurden drei wichtige nachgeordnete Signalproteine der Rezeptoren auf ihre Aktivierung durch Phosphorylierung hin untersucht: „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT5), Proteinkinase-B (PKB bzw. AKT) und „mitogen activated protein kinase“ (MAPK). FLT3- und KIT-exprimierende Zellen wurden dabei als Repräsentanten der Rezeptorgruppe I mit IGF1-R- und EGFR-exprimierenden Zellen als Repräsentanten der Gruppe II verglichen. In den Nicht-RTK-Klasse-III-Rezeptoren war kein Unterschied bei der Phosphorylierung der Proteine in den CBL-WT- und CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen zu detektieren. Dagegen waren AKT und MAPK in FLT3- bzw. KIT-CBL Δ exon8-Zellen nach Ligandstimulation im Vergleich zu den CBL-WT-koexprimierenden Zellen stark aktiviert (Abb. 3.2.1 A). STAT5 wurde durch die CBL-Mutante dagegen nicht phosphoryliert. Die AKT-Aktivierung hielt auch länger an in FLT3/CBL Δ exon8-Zellen im Vergleich zu den CBL-WT-koexprimierenden Zellen (Abb. 3.2.1 B).

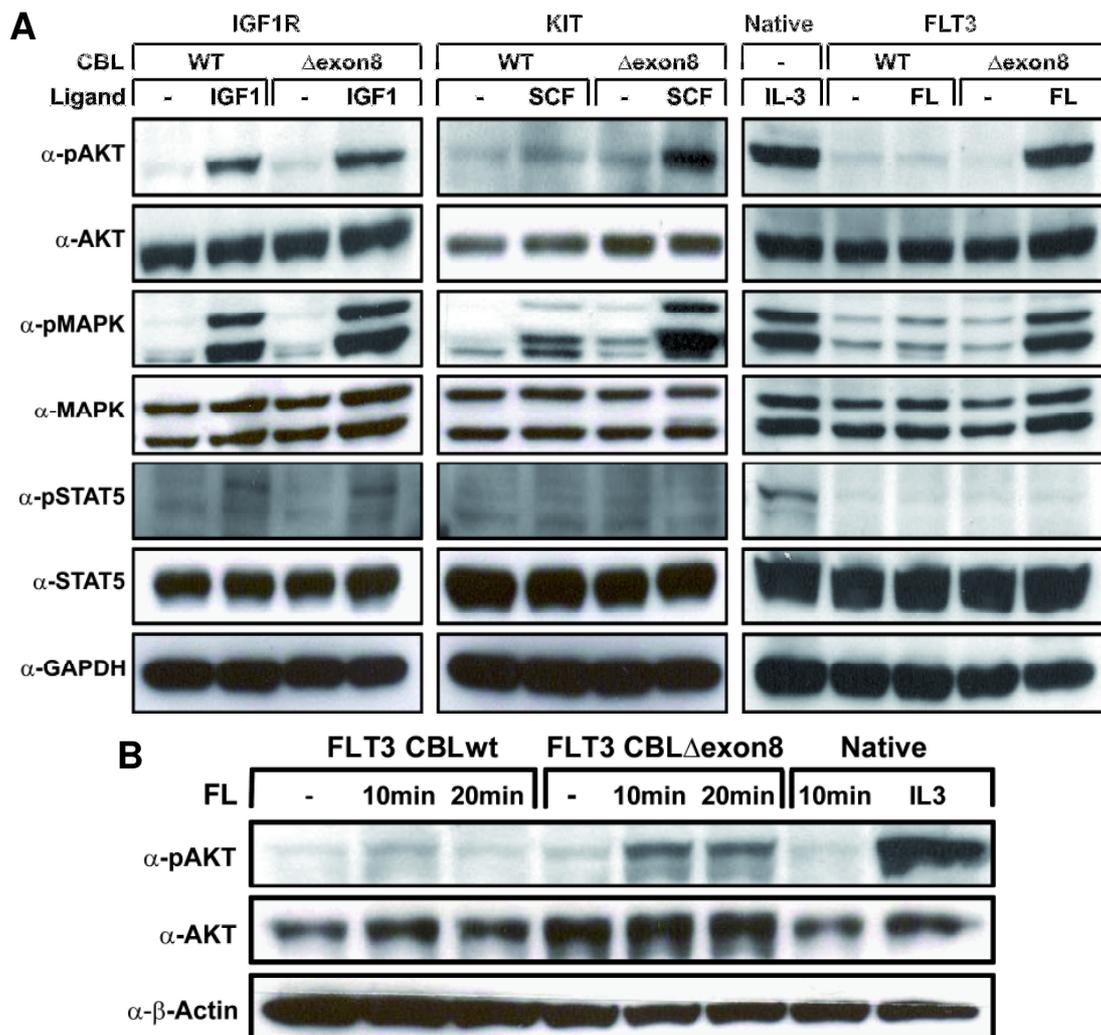


Abb. 3.2.1: AKT ist stärker aktiviert in RTK-Klasse-III- und CBL-Mutante-koexprimierenden Zellen. (A) Rezeptor/CBL-WT- und Rezeptor/CBL Δ exon8-exprimierende Zellen wurden für 24 h gehungert und anschließend für 10 min mit 100 ng Ligand/ml inkubiert oder unbehandelt gelassen. Ganzzelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und nach Phosphorylierung von Signalproteinen untersucht. (B) Für 24 h gehungerte FLT3/CBL-Zellen wurden für 0,10,20 min mit 100 ng FL/ml stimuliert und lysiert. Ganzzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Phospho-AKT-Antikörper immunoblottet, danach gestriipt und mit AKT- und β -Actin-Antikörper inkubiert.

3.2.2 Hemmung der Proliferation der CBL Δ exon8/RTKIII-WT-Zellen durch pharmakologische Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges

Um die kritischen Signalwege für den pro-proliferativen Phänotyp der CBL-Mutante zu bestätigen, wurden niedermolekulare Inhibitoren von Signalwegen in nicht toxischen Konzentrationen verwendet. Nicht toxische Konzentrationen der Substanzen sind so definiert, dass sie die Proliferation der Ba/F3-Zellen in Gegenwart von IL-3 nicht verringern. Der Src-Inhibitor SU6656 führte bei einer Konzentration von bis zu 1 μ M zu keiner Inhibition

der Proliferation in FLT3/CBL- und PDGFRA/CBL-exprimierenden Ba/F3-Zellen (Abb. 3.2.2 C) und der MAPK-Inhibitor PD98059 nur zu einer geringfügigen Proliferationshemmung bei bis zu 10 μM (Abb. 3.2.2 A). Die beiden Signalwege haben demnach keine große Bedeutung für den pro-proliferativen Phänotyp der CBL-Mutante. Eine Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges konnte dagegen die Proliferation der FLT3/CBL Δ exon8- und PDGFRA/CBL Δ exon8-Zellen deutlich hemmen. Der PI3K-Inhibitor LY294002 und der mTOR-Inhibitor Rapamycin reduzierten die Proliferation in Anwesenheit von 20 ng/ml FL bzw PDGF-AB um ungefähr 50% (Abb. 3.2.2 B, D).

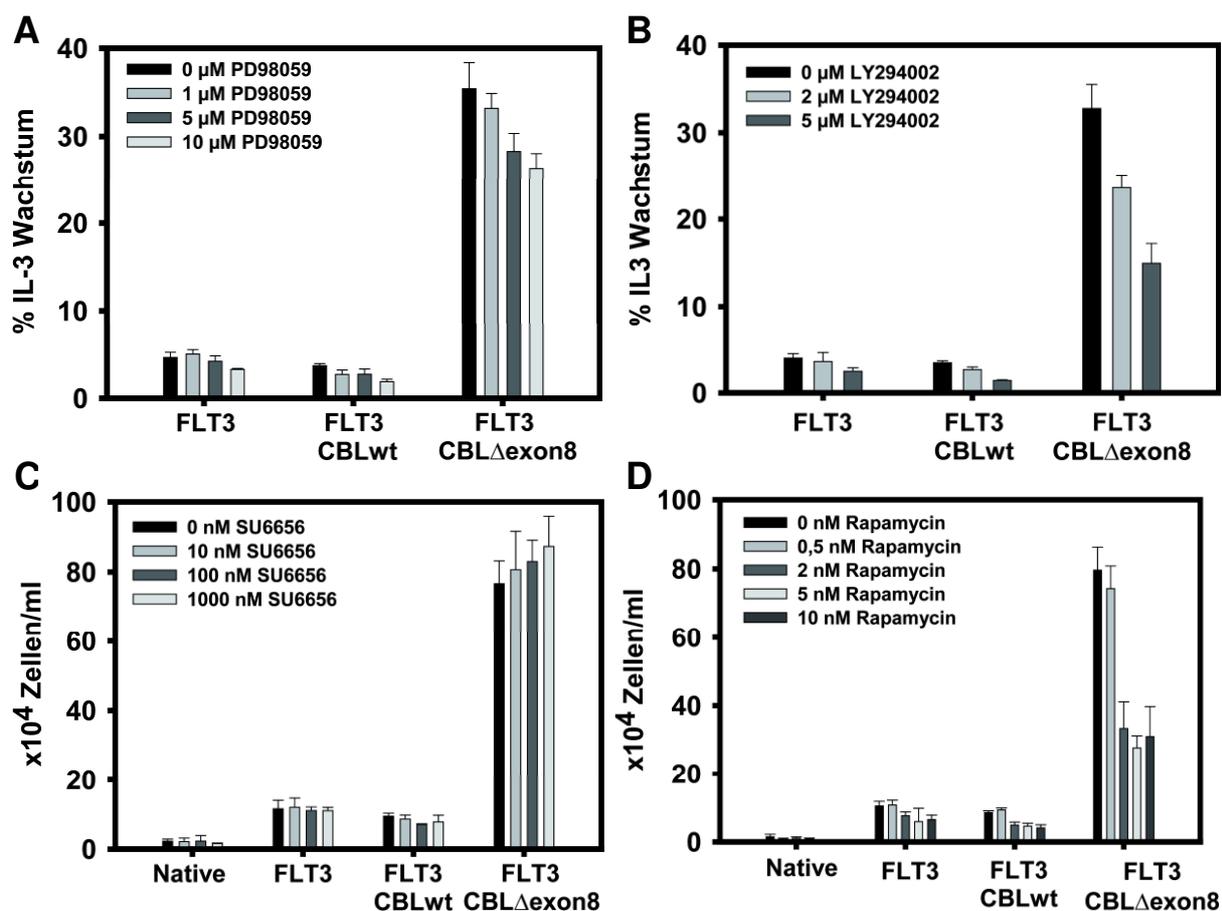


Abb. 3.2.2: Pharmakologische Inhibition der Signalwege. Ba/F3-Zellen wurden 72 h ohne Zytokinzusatz und mit 10 ng/ml IL-3 inkubiert, danach mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt und über Durchflusszytometrie analysiert. Die Apoptoserate wurde als Prozentwert der IL-3-Kontrolle berechnet.

3.2.3 Dephosphorylierung von AKT durch PI3K-Inhibitor LY294002

Die CBL-Mutation führt also zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und die erhöhte Proliferation kann durch Inhibition desselbigen geschwächt werden. Um zu bestätigen, dass die Proliferationshemmung mit einer Deaktivierung von AKT einhergeht, wurden Ganzzelllysate von mit LY294002 behandelten Zellen hergestellt. Die Zellen wurden für 2 h

oder 24 h mit 20 μ M LY294002 behandelt und vor der Lyse für 10 min mit FL stimuliert. Eine Immunblot-Analyse auf beide Phosphorylierungsstellen der AKT-Kinase (Serin 473 und Threonin 308) ergab, dass die starke AKT-Aktivierung von stimulierten FLT3/CBL Δ exon8-Zellen durch Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 komplett verhindert wurde (Abb. 3.2.3).

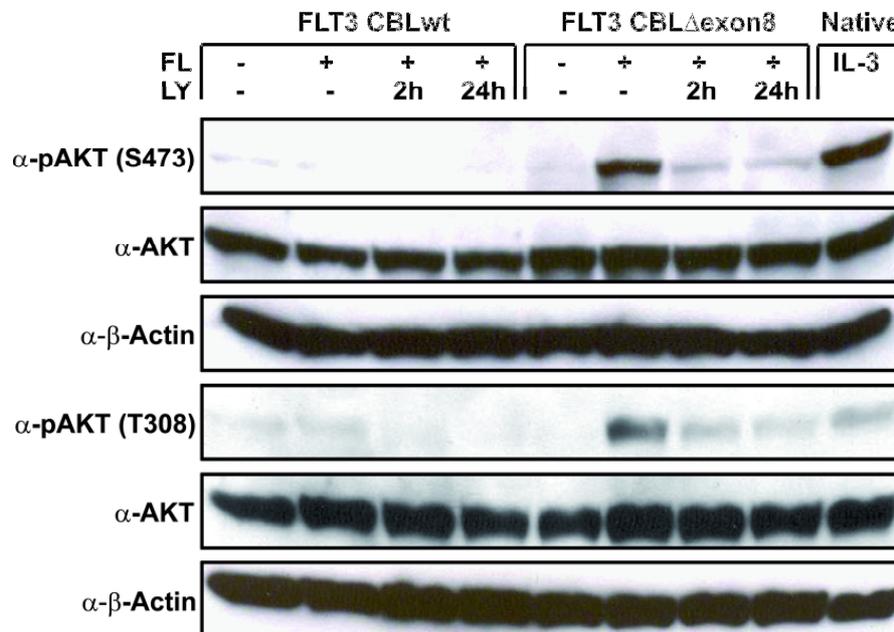


Abb. 3.2.3: Dephosphorylierung von AKT nach LY294002-Behandlung. Gehungerte FLT3/CBL-Zellen wurden für 0, 2 oder 24 h mit 20 μ M LY294002 und danach mit 100 ng FL/ml stimuliert und lysiert. Ganzzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Phospho-AKT-Antikörper immungeblottet, danach gestriipt und mit AKT- und β -Actin-Antikörper inkubiert.

3.2.4 Korrelation von AKT-Phosphorylierung mit der Proliferation der CBL-Mutanten

Die erhöhte ligand-induzierte Proliferation der CBL Δ exon8-Mutante beruhte auf einer erhöhten Aktivierung von AKT. Um zu untersuchen, ob eine stärkere Phosphorylierung von AKT generell in ligand-stimulierten CBL-Mutanten-exprimierenden Zellen zu finden ist, haben wir den Phospho-AKT-Level der verschiedenen FLT3/CBL-Mutanten-Zellen unter 3.1.12 analysiert. Ganzzelllysate der unstimulierten bzw. mit FL stimulierten Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf die Phosphorylierung von AKT und MAPK hin untersucht. Die AKT-Aktivierung korrelierte mit den Ergebnissen aus 3.1.13. Die LINKER/RING-Finger-Deletionsmutante CBL Δ exon8 zeigte die stärkste AKT-Aktivierung und hatte auch die stärkste ligand-induzierte Hyperproliferation und den höchsten Apoptoseschutz. Bei den LINKER-Punktmutanten zeigte CBL-Y371H eine etwas stärkere AKT-Phosphorylierung nach Ligandstimulation als die anderen, was auch mit den vorigen Ergebnissen korrelierte.

Dagegen spiegelte der Phosphorylierungs-Status der MAPK nicht den transformierenden Phänotyp der CBL-Mutanten wieder (Abb. 3.2.4). Alle CBL-Mutanten führten zu einer erhöhten AKT-Aktivierung und bestätigten den AKT-Signalweg als kritischen Mediator der Transformation durch CBL.

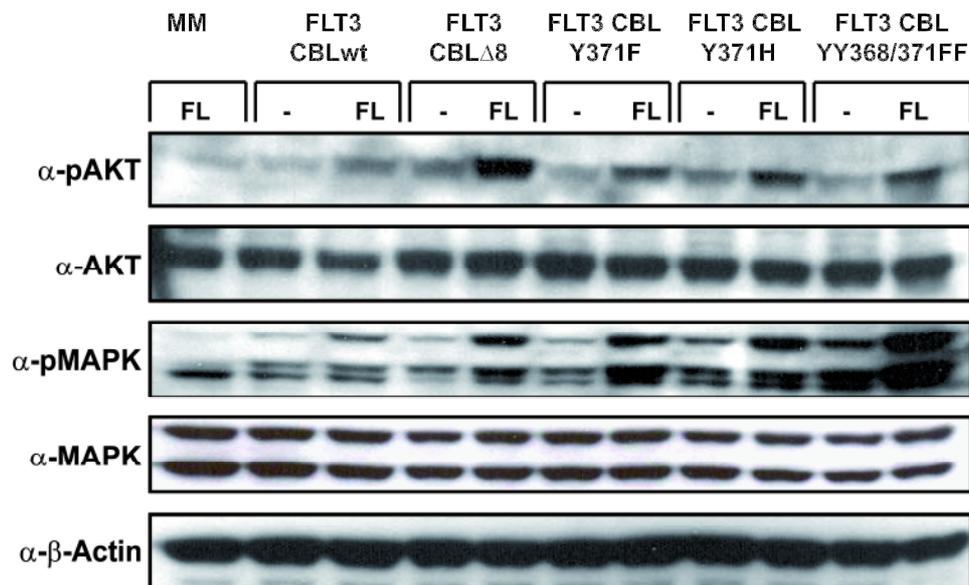


Abb. 3.2.4: Immunblot-Analyse der CBL-Mutanten. Transduzierte Ba/F3-Zellen wurden für 24 h gehungert und mit oder ohne FL (100 ng/ml) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert (MM = MIY/MIG). Ganzzelllysate der Zellen wurden über Western-Blotting mit phosphospezifischen Antikörpern gegen AKT und MAPK analysiert. Gleiche Level an aufgetragenem Protein wurden durch Immunblotting mit einem Antikörper gegen β -Actin nachgewiesen und die gleichen Level an AKT und MAPK mit Antikörpern gegen AKT und MAPK.

3.2.5 Inhibitorisch-synergistischer Effekt in FLT3-WT/CBL Δ exon8 Ba/F3-Zellen bei Kombination mit FLT3- und AKT-Inhibitoren

Da durch die Immunblot-Analyse eine starke AKT-Aktivierung in FLT3-WT/CBL Δ exon8 gezeigt werden konnte, wurden die Zellen mit dem selektiven AKT-Inhibitor MK2206 inkubiert. MK2206 inhibierte das Wachstum von FLT3/CBL Δ exon8-Zellen dosisabhängig bis zu 82% mit nicht toxischen Konzentrationen und in Gegenwart von 20 ng/ml FL mit einem IC₅₀-Wert von 0,6 μ M (Abb. 3.2.5 A). Dieses Ergebnis hebt wiederum die große Bedeutung von AKT für die Phänotypen des CBL-Onkogens hervor. Unter 3.1.7 wurde gezeigt, dass auch eine Inhibition des Rezeptors die CBL-induzierte Proliferation komplett hemmte. Daher könnte die Verwendung eines spezifischen FLT3-Inhibitors in Kombination mit einem AKT-Inhibitor eine vielversprechende Therapiestrategie sein. AC220 - ein sehr selektiver FLT3-Inhibitor der zweiten Generation - hemmte das Wachstum mit einem IC₅₀-Wert von 3,5 nM (Abb. 3.2.5 B). Wir verwendeten eine Kombination aus MK2206 (0/0,1/0,2/0,4/0,8 μ M) und

AC220 (0/0,4/0,8/1,6/3,2 nM) (Abb. 3.2.5 C) sowie aus LY294002 (0/1/1,5/2/5 μ M) und SU5614 (0/0,25/0,375/0,5/1 μ M) (Abb. 3.2.5 D) für unsere Proliferationshemmversuche in FLT3-WT/CBL Δ exon8-Zellen. Beide Kombinationen zeigten einen synergistischen Effekt in unserem Zellmodell. Die Kombination aus MK2206/AC220 unterschreitet die über die „fractional product“-Methode von Webb[102] berechnete Additivitätslinie in den niedrigeren Konzentrationen und die LY294002/SU5614-Kombination in den höheren Konzentrationen.

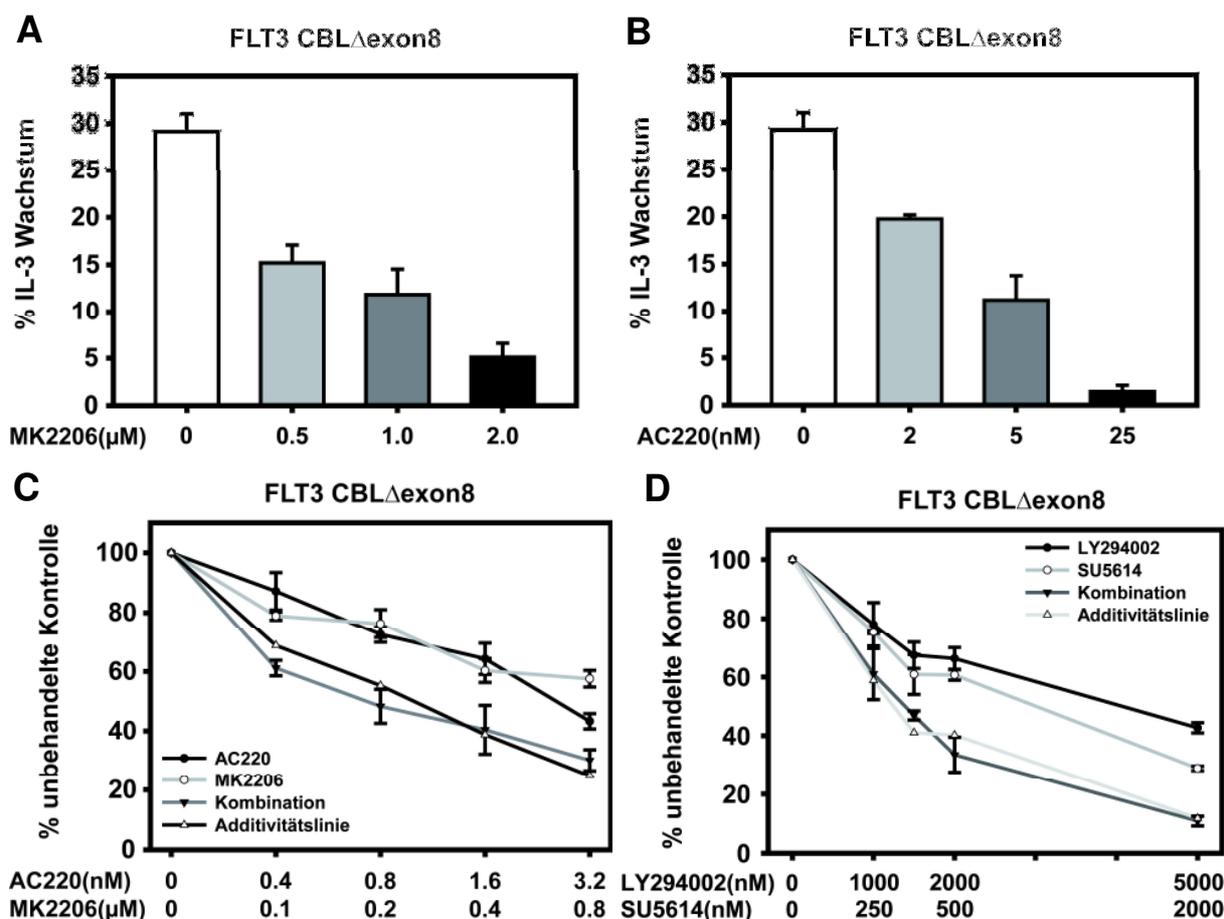


Abb. 3.2.5: Pharmakologische Inhibition von CBL Δ exon8-transformierten FLT3-Zellen. Zellen wurden in Anwesenheit von 20 ng/ml FL mit (A) dem AKT-Inhibitor MK2206 (0-2 μ M) und (B) mit dem FLT3-Inhibitor AC220 (0-25 nM) inkubiert und die Zellzahl nach 72 h bestimmt. (C) AC220 wurde auch in Kombination mit MK2206 und (D) SU5614 mit LY294002 verwendet.

3.2.6 Transformierender Phänotyp der AKT1-E17K-Mutante in FLT3-exprimierenden Zellen

Um zu zeigen, dass ein aktivierter AKT-Signalweg den FLT3-Rezeptor transformieren kann, wurden die konstitutiv aktivierte AKT1-E17K-Mutante und AKT1-WT jeweils mit FLT3 kotransduziert. Abbildung 3.2.6.1 zeigt die Expression von FLT3 und den AKT1-Konstrukten.

Die AKT1-Konstrukte wurden über ihren FLAG-Tag und mit einem AKT-Antikörper nachgewiesen und zeigen eine deutliche Überexpression von AKT1.

Der Phänotyp der AKT1-E17K-Mutante in FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen wurde durch Poliferations- und Apoptose-Experimente analysiert. Im Gegensatz zum AKT1-WT führte eine alleinige Expression der AKT-Mutante zu einem zytokin-unabhängigen Wachstum der Zellen, das durch Koexpression des FLT3-Rezeptors verstärkt wurde. FLT3/AKT1-WT-Zellen zeigten bei aufsteigenden FL-Konzentrationen ein etwas stärkeres Wachstum als FLT3-Zellen. FLT3/AKT1-E17K-Zellen erreichten bei 100 ng/ml FL 70% ($p < 0,02$) des IL-3-Wachstums und damit eine stärkere Proliferation als FLT3/CBL Δ exon8-Zellen mit 45% Wachstum (Abb. 3.2.6.2 A). Bei der induzierten Apoptose nach 72 h Zytokin-Entzug hatten die AKT1-E17K-exprimierenden Zellen einen hohen Apoptoseschutz. Nur mit der AKT-Mutante transduzierte Zellen hatten eine Apoptoserate von 18%, kotransduziert mit FLT3 von 10%. AKT-WT-Zellen hatten eine mit 76% etwas niedrigere Apoptoserate als die 88% der nativen Zellen, jedoch etwas höher als die FLT3-Zellen mit 72%. Bei den FLT3/AKT-WT-Zellen waren 40% apoptotisch, etwas weniger als die 46% der CBL Δ exon8-Zellen (Abb. 3.2.6.2 B). FLT3/CBL Δ exon8 hatten mit 14% nur etwas mehr apoptotische Zellen, als die FLT3/AKT1-E17K-Zellen. In Gegenwart von IL-3 hatten alle Zellen eine Apoptoserate von ca. 5% - lediglich die Apoptoserate der AKT1-Mutante lag bei ca. 10%.

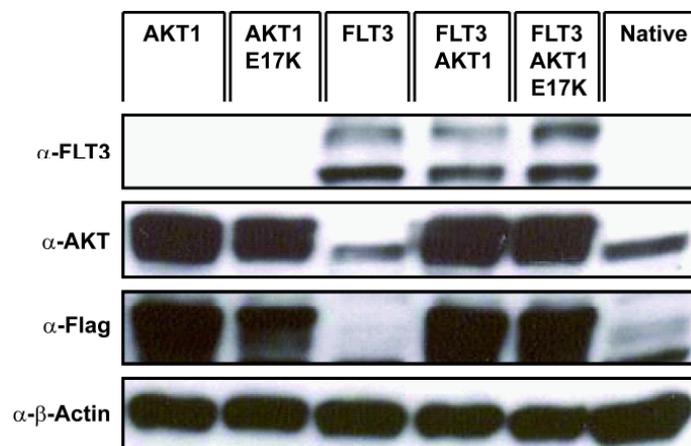


Abb. 3.2.6.1: Immunblot-Analyse der FLT3/AKT-Zellen. Von transduzierten Ba/F3-Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt und die Expression der transduzierten Konstrukte über Western-Blotting nachgewiesen. FLT3-Rezeptor wurde mit einem spezifischen FLT3-Antikörper und die AKT1-Konstrukte mit einem FLAG-Tag und AKT-Antikörper nachgewiesen. Vergleichbare Level an aufgetragenem Protein wurden durch Immunblotting mit einem Antikörper gegen β -Actin nachgewiesen.

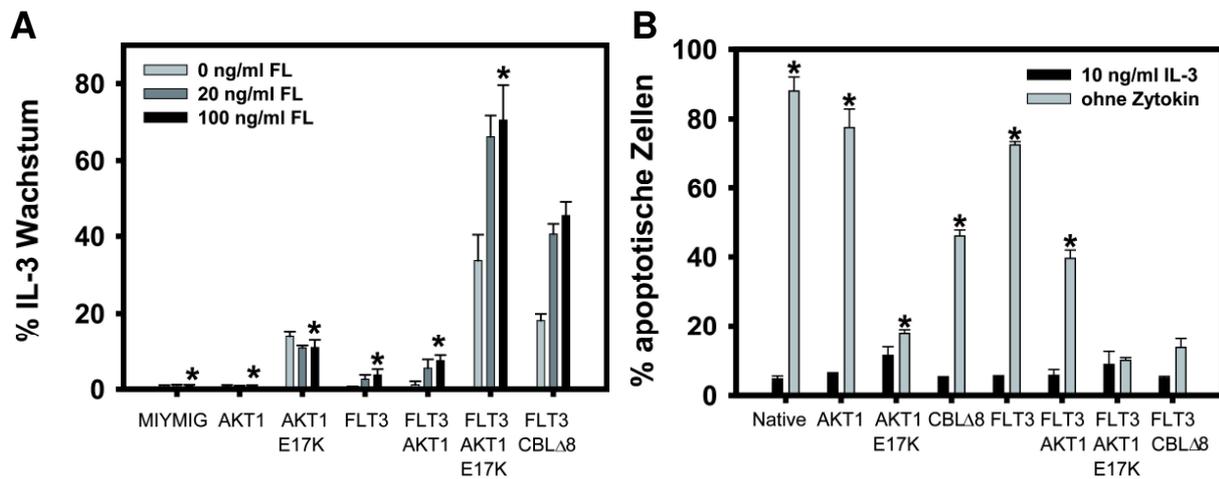


Abb. 3.2.6.2: Einfluss von AKT-E17K auf Apoptose und Proliferation in FLT3-exprimierenden Zellen. Transduzierte Ba/F3-Zellen wurden für 72 h ohne Zusatz von Zytokinen oder in Gegenwart von 20 bzw. 100 ng/ml FL bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (* $p < 0,02$ bezogen auf FLT3WT/CBL Δ exon8, t-Test). (A) Nach den 72 h wurde die Zellzahl der viablen Zellen über Typanblaufärbung und (B) die Apoptoserate der Zellen über die Annexin-V- und 7-AAD-Färbung bestimmt (* $p < 0,001$ bezogen auf FLT3WT/CBL Δ exon8).

3.2.7 Signalübertragung der AKT- und CBL-transduzierten FLT3-exprimierenden Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass die AKT-Mutante Zellen vor Apoptose schützt und sie zu zytokin-unabhängigen Wachstum befähigt, wurde die Aktivität der Signalwege untersucht. Ba/F3-Zellen transduziert mit den AKT-Konstrukten und kotransduziert mit FLT3/AKT-Konstrukten und FLT3/CBL-Konstrukten, wurden für 24 h gehungert und vor der Zellyse +/- 100 ng FL stimuliert. Die erhaltenen Ganzzelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und hinsichtlich der Aktivierung von STAT5, AKT und MAPK analysiert. Bei der Aktivierung von STAT5 konnte kein Unterschied bei den unstimulierten und stimulierten Zellen festgestellt werden. AKT war bei den AKT1-WT und AKT1-E17K-exprimierenden Zellen konstitutiv aktiviert. Und bei den Zellen, die zusätzlich den FLT3-Rezeptor exprimierten, war die Phosphorylierung nach Ligandstimulation noch stärker - jedoch bestand kein Unterschied in der Aktivierung zwischen AKT-WT- und AKT-Mutante-exprimierenden Zellen. Bei allen vier Zelllinien, die ein AKT-Konstrukt exprimierten, war jeweils hauptsächlich das transduzierte AKT und nicht das endogene AKT phosphoryliert. Dies konnte man an dem um den Protein-Tag höheren Molekulargewicht erkennen. Allerdings war die MAPK bei den FLT3/AKT-WT-Zellen nach Stimulation deutlich stärker aktiviert als bei den FLT3/AKT-E17K-Zellen (Abb. 3.2.7). Diese Zellen zeigten aber kaum einen Phänotyp, was bestätigte, dass die Aktivierung der MAPK nicht essentiell für die Transformation FLT3-exprimierender Zellen ist. Im Falle der

AKT-Konstrukte korrelierte aber auch die AKT-Phosphorylierung nicht unbedingt mit dem pro-proliferativen und anti-apoptotischen Phänotyp.

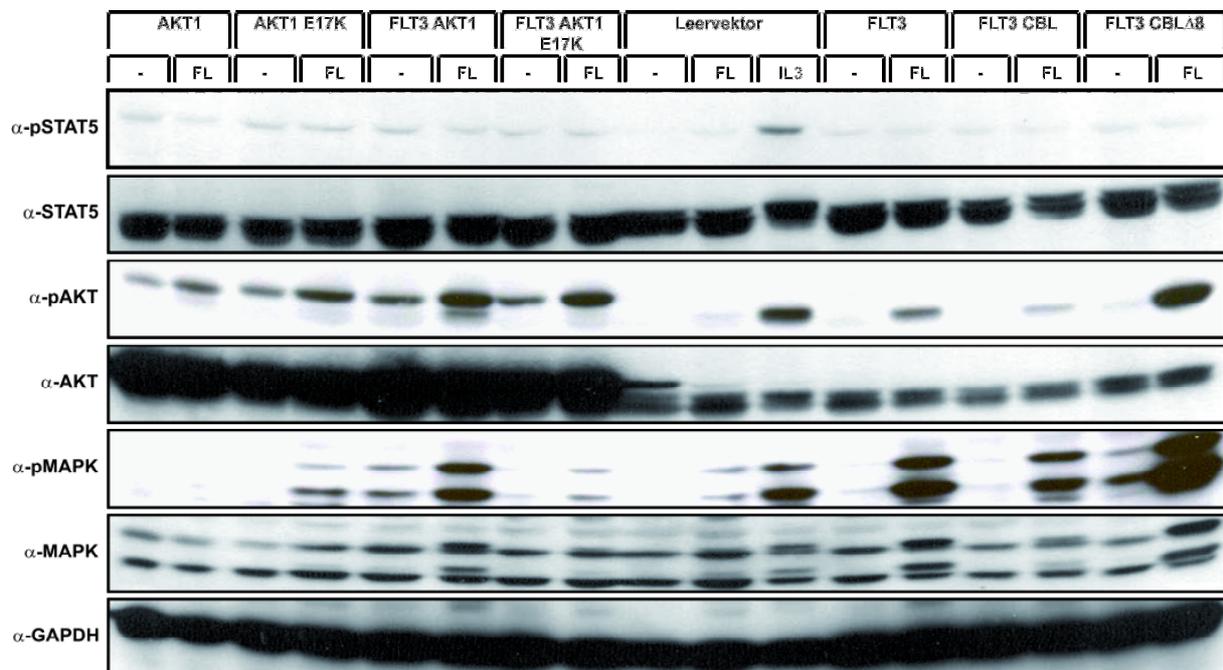


Abb. 3.2.7: Immunblot-Analyse der durch FLT3 aktivierten Signalwege. Transduzierte Ba/F3-Zellen wurden für 24 h gehungert und ohne oder mit FL (100 ng/ml) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Ganzzelllysate der Zellen wurden über Western-Blotting mit phosphospezifischen Antikörpern gegen STAT5, AKT und MAPK analysiert. Vergleichbare Level an aufgetragenem Protein wurden durch Immunblotting mit einem Antikörper gegen GAPDH nachgewiesen und vergleichbare Level an STAT5, AKT und MAPK mit Antikörpern gegen STAT5, AKT und MAPK.

3.2.8 Hemmung der AKT1-mutante-induzierten Proliferation durch AKT- und FLT3-Inhibitoren

Im Weiteren inhibierten wir auch das Wachstum der FLT3/AKT1-E17K-Zellen mit spezifischen Substanzen gegen FLT3 (SU5614, AC220) und PI3K/AKT (LY294002, MK2206) in Gegenwart von 20 ng/ml FL. Sowohl FLT3- als auch die PI3K/AKT-Inhibitoren konnten die ligand-induzierte Proliferation hemmen. Allerdings konnte eine Inhibition des FLT3-Rezeptors im Gegensatz zu den durch CBLΔ8-transformierten Zellen das Wachstum nicht vollständig, sondern nur zu 76% verringern. Die nicht hemmbaren Prozente entsprachen in etwa dem alleinigen Beitrag der AKT-Mutante. Die FLT3-Inhibitoren AC220 und SU5614 hatten einen IC₅₀ von 15 nM bzw. 0,55 μM (Abb. 3.2.8 B). Der PI3K-Inhibitor LY294002 konnte in nicht toxischen Konzentrationen die Proliferation zu 79% inhibieren mit einem IC₅₀ von 2 μM. MK2206 hingegen hemmte das Wachstum vollständig mit einem IC₅₀

von 0,25 μM (Abb. 3.2.8 A). Das zytokinunabhängige Wachstum der AKT1-E17K-Zellen wurde durch FLT3-Inhibitoren nicht gehemmt. MK2206 aber hemmte auch deren Wachstum vollständig. Eine Kombination aus AC220 und MK2206 zeigte einen klaren synergistischen inhibitorischen Effekt in den FLT3/AKT1-E17K-Zellen (Abb. 3.2.8 C). Als Konzentrationen verwendeten wir für MK2206 0,044 / 0,066 / 0,1 / 0,15 μM und für AC220 0,5 / 1,5 / 4,5 / 13,5 nM.

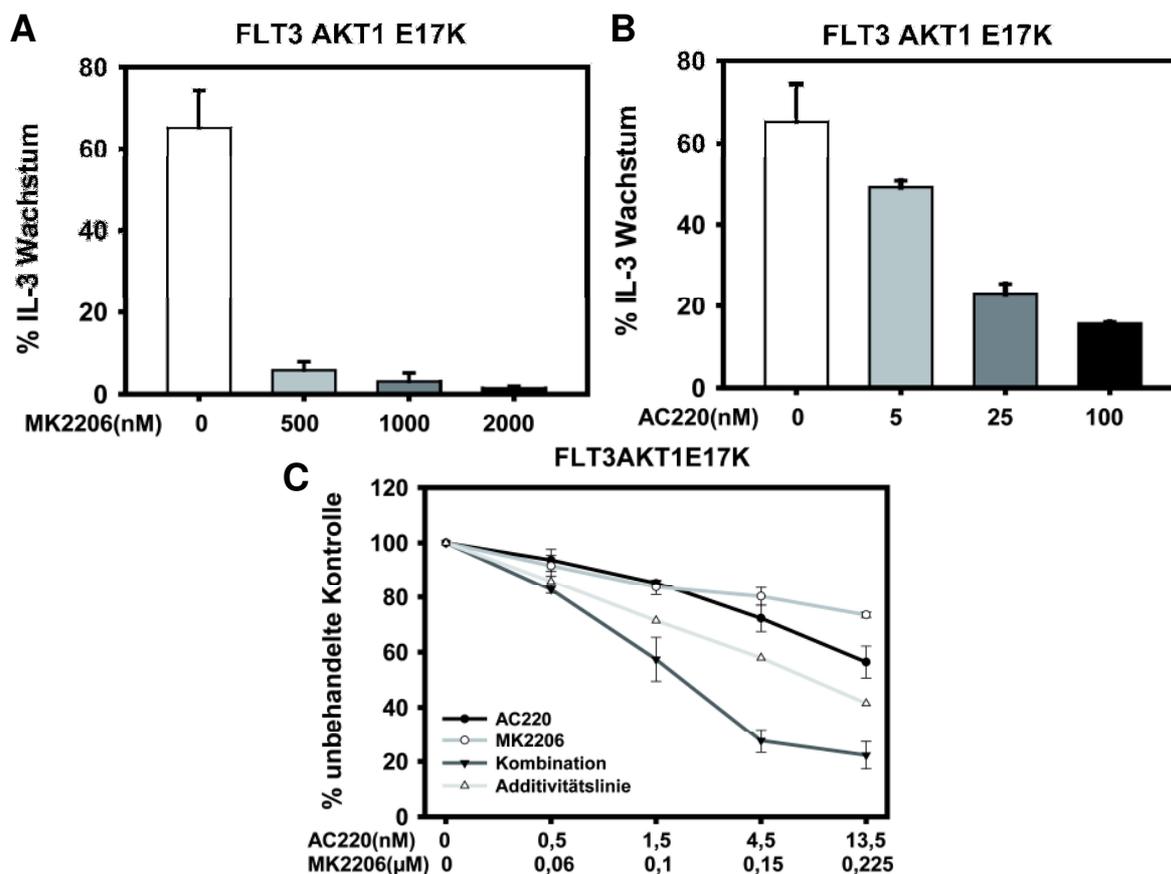


Abb. 3.2.8: Pharmakologische Inhibition der AKT-Mutante. FLT3/AKT1-E17K-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden in Gegenwart von 20 ng/ml FL über 72 h einzeln (A, B) und in Kombination (C) mit den FLT3-Inhibitor AC220 und dem AKT-Inhibitor MK2206 inkubiert. Zur Kontrolle wurde auch ein Ansatz mit 10 ng/ml IL-3 kultiviert.

3.2.9 Kombination aus AKT- und FLT3-Inhibitoren in AML-Zelllinien

Nachdem in Ba/F3-Zellen die kritische Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges durch CBL-transformierte Zellen gezeigt wurde, wurden folgende AML-Zelllinien untersucht: HL-60, eine Zelllinie ohne FLT3- und CBL-Mutation; MV4-11, eine Zelllinie mit einer FLT3-ITD-Mutation [111]; und MOLM-13, eine Zelllinie mit einer FLT3-ITD und der CBL Δ exon8-Mutation [9]. Die Analyse der Aktivierung von AKT stimmte mit den Ergebnissen im Ba/F3-Modell überein,

denn die MOLM-13-Zelllinie mit der CBL-Mutation zeigte die stärkste Phosphorylierung von AKT im Ganzzelllysate (Abb. 3.2.9.1).

Zusätzlich zu der stärkeren AKT-Aktivierung waren die MOLM-13-Zellen auch sensitiver gegenüber einer PI3K/AKT-Inhibition als HL-60 (Abb. 3.2.9.2 D). Auch die AML-Zelllinien wurden mit einer Kombination aus den Substanzen LY294002/SU5614 und MK2206/AC220 behandelt. Die Proliferation der HL-60-Zellen war sowohl mit der Kombination als auch mit den einzelnen Substanzen kaum zu inhibieren und die Kombination erreichte auch keinen additiven Effekt. MV4-11 und MOLM-13 hingegen zeigten mit beiden Kombinationen einen synergistischen bzw. additiven Effekt in der Inhibition des Wachstums, der bei MOLM-13 am stärksten ausfiel. Von LY294002 wurden 0,5 / 1 / 2 / 4 μ M, von SU5614 31,25 / 62,5 / 125 / 250 nM und von MK2206 0,128 / 0,32 / 0,8 / 2,0 μ M bei allen Zelllinien verwendet. Bei der Inhibition von MV4-11 wurden 0,3 / 0,44 / 0,66 / 1,0 nM AC220 verwendet für MOLM-13 und HL-60 0,625 / 1,25 / 2,5 / 5 nM. Im Falle der AML-Zelllinie MOLM-13 zeigte die Kombination aus den spezifischen Inhibitoren MK2206/AC220 in allen Konzentrationen einen deutlich synergistischen Effekt (Abb. 3.2.9.2 B), ebenso wie die LY294002/SU5614-Kombination. Bei MV4-11 zeigte die Kombination aus AC220 und MK2206 nur in den höheren Konzentrationen einen additiven Effekt (Abb. 3.2.9.2 A), LY294002 zusammen mit SU5614 durchweg einen synergistischen inhibitorischen Effekt. Eine weitere AML-Zelllinie mit einer CBL-Mutation ist GDM-1. Diese hat sowohl die CSF1R-Y571D [112] als auch die CBL-R420Q [113] Punktmutation. 40% der Proliferation konnten mit dem AKT-Inhibitor MK2206 (Abb. 3.2.9.2 F) und etwa 80% mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Abb. 3.2.9.2 E) aufgehoben werden. Jedoch zeigte eine Kombination der beiden Substanzen in dieser Zelllinie mit der CBL-Punktmutation im RING-Finger keine Additivität (Abb. 3.2.9.2 C).

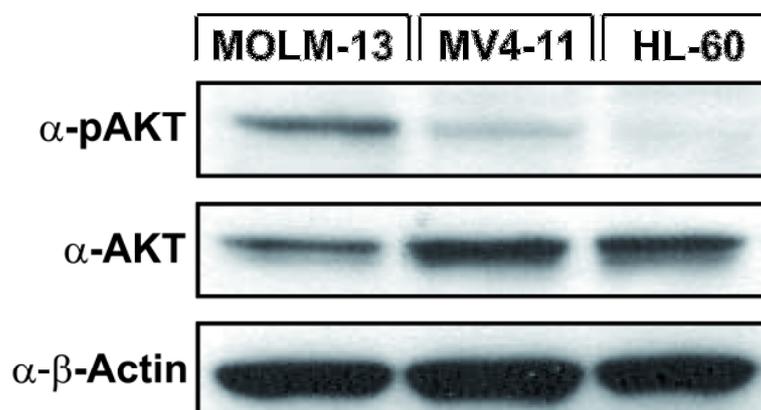


Abb. 3.2.9.1: Endogene Aktivierung von AKT in AML-Zelllinien. Ganzzelllysate von den AML-Zelllinien HL-60, MV4-11 und MOLM-13 wurden über Immunblotting auf aktiviertes AKT mit einem phosphospezifischen AKT-Antikörper untersucht. Der Proteinlevel an AKT wurde mit einem AKT Antikörper analysiert und vergleichbare Mengen an aufgetragenem Protein wurden über einen β -Actin-Antikörper überprüft.

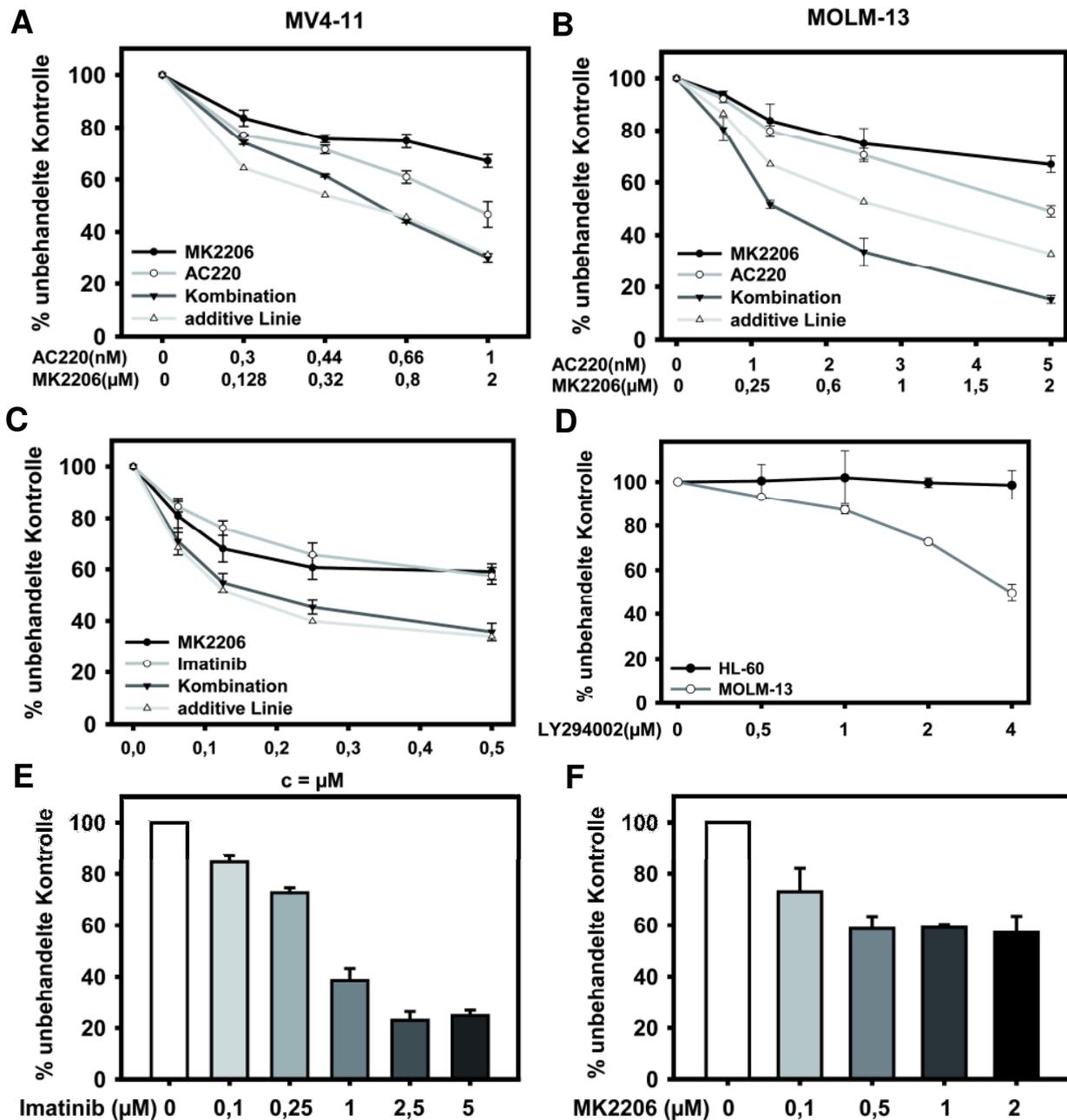


Abb. 3.2.9.2: PTK- mit PI3K/AKT-Inhibition in AML-Zelllinien. Die AML-Zelllinien MV4-11 (A) und MOLM-13 (B) wurden mit dem FLT3-Inhibitor AC220 und dem AKT-Inhibitor MK2206 einzeln und in Kombination über 72 h inkubiert und die Zellzahl bestimmt. (D) Die AML-Zelllinien HL-60 und MOLM-13 wurden über 72 h mit aufsteigenden Konzentrationen des PI3K-Inhibitor LY294002 kultiviert und die viablen Zellen über Trypanblaufärbung gezählt. Die AML-Zelllinie GDM-1 wurde mit dem ABL-Inhibitor Imatinib (E) und dem AKT-Inhibitor MK2206 (F) einzeln und in Kombination (C) über 72 h inkubiert und die Zellzahl bestimmt.

3.3 Identifizierung von FLT3- und CBL-Interaktionsstellen

3.3.1 Stabile Expression der Interaktionsmutanten in Ba/F3-Zellen

Bis auf FLT3 sind direkte Interaktionsstellen der Ubiquitin-Ligase c-CBL mit Rezeptoren der RTK-Klasse-III bekannt. Bei diesen Rezeptoren befinden sich die Bindungsstellen in der juxtamembranösen Domäne. Dabei handelt es sich um zwei Tyrosinreste, die durch eine unpolare neutrale Aminosäure getrennt sind. Die entsprechenden Tyrosine in FLT3 sind Y589 und Y591 (Abb. 3.3.1.A). Beide wurden durch ortsgerichtete Mutagenese zu Phenylalanin mutiert. CBL wurde durch Einführung der G306E-Punktmutation an der PTB-Domäne deaktiviert, die für die Bindung an aktivierte Rezeptoren verantwortlich ist. Zusätzlich wurde Tyrosin 731 zu Phenylalanin mutiert, welches als Bindungsstelle zur PI3K beschrieben ist (Abb. 3.3.1.B). Es wurden stabile Ba/F3-Zellen mit den beschriebenen FLT3- und CBL-Mutationen hergestellt, um den Phänotyp der möglichen Interaktionsmutanten zu untersuchen. Die Expression der transduzierten Konstrukte wurde über Western-Blot bzw. Oberflächenmarkerfärbung nachgewiesen.

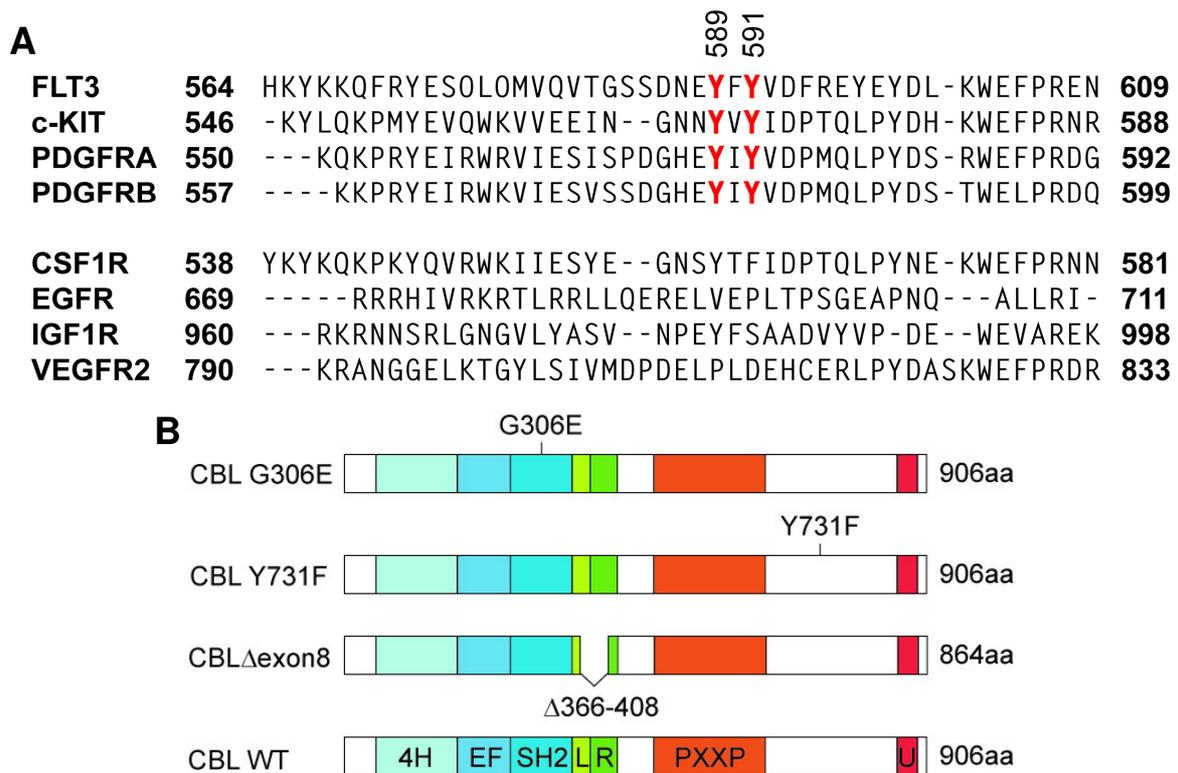


Abb. 3.3.1: Juxtamembranöse Domänen von Rezeptor-Tyrosinkinase- und CBL-Interaktionsmutanten. (A) Alignment der juxtamembranösen Proteinsequenz, der in dieser Arbeit verwendeten Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs), aufgeteilt in die zwei Gruppen bezüglich ihrer Kooperation mit der CBL-Mutante. Bei der oberen Gruppe (FLT3, c-KIT, PDGFRA und PDGFRB) sind die beschriebenen bzw. vermuteten CBL-Interaktionsstellen hervorgehoben. (B) Abbildung der Proteindomänen von CBL und der in dieser Arbeit verwendeten CBL-Mutationen.

3.3.2 Abschwächung des transformierenden Phänotyps der CBL-Mutante durch Mutationen in der juxtamembranösen Domäne von FLT3

Daraufhin wurden die zwei wichtigen zellulären Prozesse - Proliferation und Apoptose – in den etablierten Zellen untersucht.

Die einzelnen und kombinierten Tyrosin-zu-Phenylalanin-Mutationen in der juxtamembranösen Domäne von FLT3 reduzierten den pro-proliferativen Phänotyp der CBL-Mutante. Sowohl Y589F, Y591F als auch YY589/591FF-Mutation verringerten signifikant ($p < 0,02$, $p < 0,001$) das IL-3-unabhängige und FL-abhängige Wachstum. Die Zellen mit den Mutationen erreichten nur 57%, 68% bzw. 64% der Hyperproliferationsrate von FLT3-WT/CBL Δ exon8-Zellen (Abb. 3.3.2 A).

Neben einer erhöhten Proliferationsrate verleiht die CBL-Deletionsmutante auch einen Schutz vor Apoptose. Durch die zusätzlichen FLT3-JM-Mutationen wurden sowohl die erhöhte Proliferationsrate als auch die Apoptoseresistenz signifikant reduziert ($p < 0,001$, $p < 0,00005$). Die Apoptoserate erhöhte sich bei Y589F von 15% auf 32%, bei Y591F auf 24% und bei der Doppelmutante YY589/591FF auf 61%. Jedoch wurde nach 72-h-Zytokin-Entzug durch diese Mutanten die Apoptoserate von 77% der FLT3-WT/CBL-WT-Zellen nicht erreicht (Abb. 3.3.2 B).

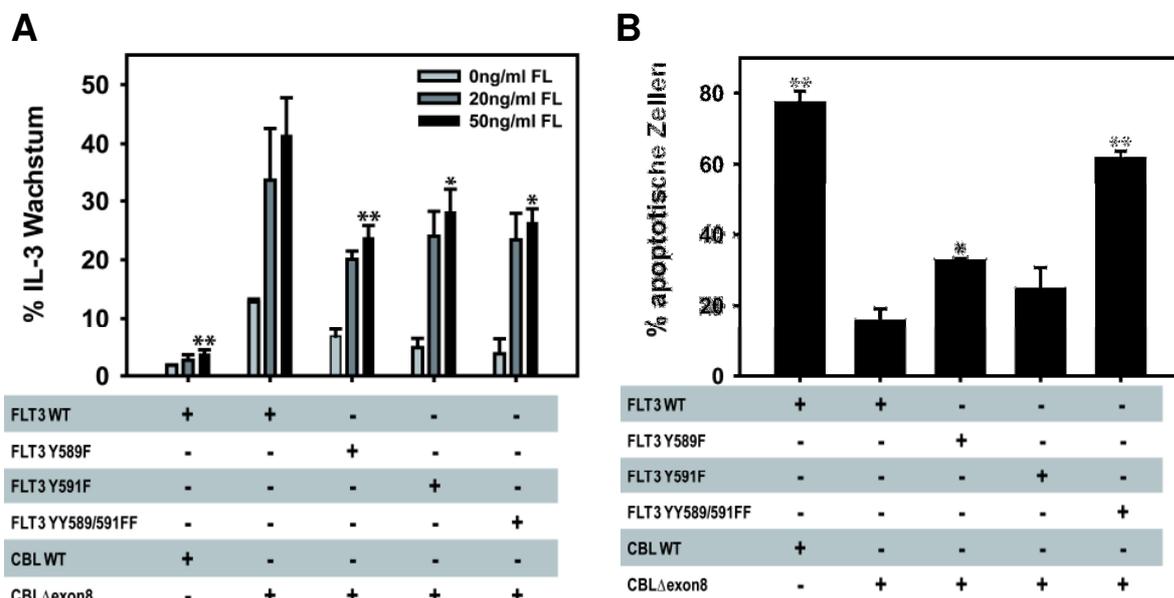


Abb. 3.3.2: Proliferation und Apoptose der CBL-Zellen mit FLT3-Varianten. (A) Zellen wurden in Anwesenheit von aufsteigenden FL-Konzentrationen (0, 20, 100 ng/ml) und 10 ng/ml IL-3 kultiviert und deren Zellzahl nach 72h bestimmt. Das Wachstum der mit FL stimulierten Zellen ist als Prozentwert des IL-3-Wachstum angegeben (* $p < 0,02$, ** $p < 0,001$, bezogen auf FLT3-WT/CBL Δ exon8, t-Test). (B) Ba/F3-Zellen transduziert mit angegebenen Konstrukten wurden über 72 h in Medium ohne IL-3-Zusatz kultiviert und dann deren Apoptoserate über Annexin-V- und 7-AAD-Färbung bestimmt (* $p < 0,001$ ** $p < 0,00005$ bezogen auf FLT3-WT/CBL Δ exon8, t-Test).

3.3.3 Schwächung des transformierenden Phänotyps der CBL-Mutante durch die Mutationen G306E und Y731F

Es wurde gezeigt, dass auf Seiten des FLT3-Rezeptors die juxtamembranöse Domäne bei der Interaktion mit CBL eine Rolle spielt. Auf der CBL-Seite wurde durch die CBL-Punktmutante G306E in der PTB-Domäne die durch CBL Δ exon8 induzierte Hyperproliferation komplett verhindert ($p < 0,01$). Die Zellen proliferierten wieder ähnlich wie FLT3-WT/CBL-WT-Zellen. Durch die Mutation der PI3K-Bindungsstelle Y731F wurde die Hyperproliferation auf 68% verringert ($p < 0,03$, Abb. 3.3.3 A).

Die eingefügten Mutationen in CBL Δ exon8 führten nach Zytokin-Entzug auch zu einer Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen. Die zusätzliche CBL-Mutation Y731F erhöhte die Apoptoserate von 15% auf 23% und die PTB-Mutation G306E auf 49%. Jedoch wurde die Apoptoserate von 77% der FLT3-WT/CBL-WT-Zellen durch beide CBL-Mutationen nicht erreicht (Abb. 3.3.3 B).

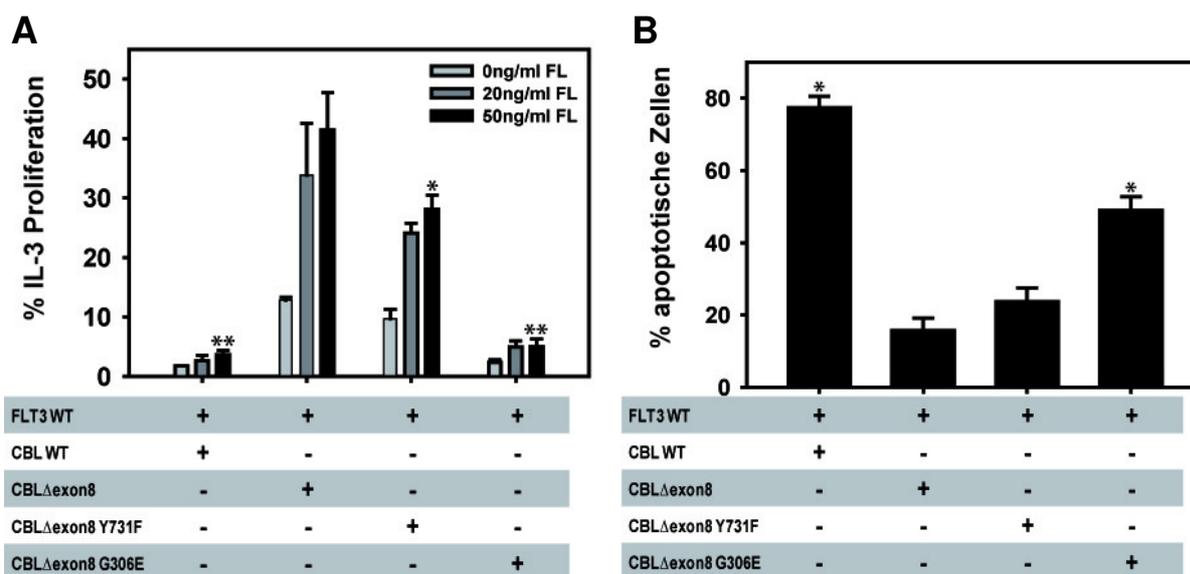


Abb. 3.3.3: Proliferation und Apoptose der FLT3-WT-Zellen mit CBL-Varianten. (A) Zellen wurden in Anwesenheit von 0, 20, 100 ng/ml FL und 10 ng/ml IL-3 für 72 h kultiviert und deren Zellzahl bestimmt. Das Wachstum ist angegeben als Prozentwert des IL-3-Wachstums. (* $p < 0,03$, ** $p < 0,01$, bezogen auf FLT3-WT/CBL Δ exon8, t-Test). (B) Zellen wurden im Medium ohne IL-3 kultiviert und nach 72 h wurde der apoptotische Anteil der Zellen über Annexin-V- und 7-AAD-Färbung bestimmt. (* $p < 0,0005$, bezogen auf FLT3-WT/CBL Δ exon8, t-Test)

3.3.4 Aufhebung der Verzögerung der Internalisierung von FLT3 in CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen durch Interaktionsmutanten

Der FLT3-Rezeptor wird durch die Bindung des FLT3-Liganden (FL) aktiviert. CBL bindet über die TKB-Domäne an die phosphorylierten Tyrosine 589 und 591 des FLT3-Rezeptors und leitet durch Ubiquitinierung die Internalisierung und schließlich den Abbau des Rezeptors ein. Ein weiterer Effekt der CBL-Deletionsmutante ist eine Verzögerung dieser Rezeptor-Internalisierung. Unsere FLT3-Y589F/CBL Δ exon8-Zellen wiesen eine schnellere Internalisierung von FLT3 auf als FLT3-WT/CBL Δ exon8, jedoch langsamer als die CBL-WT-koexprimierenden Zellen. Durch Einfügen der G306E CBL-Mutation wurde sowohl im FLT3-WT- als auch im FLT3-Y589F-Hintergrund die Verzögerung der Internalisierung komplett aufgehoben (Abb. 3.3.4).

Tabelle 3.3.4 fasst die Interaktionsstellen des CBL-FLT3-Signalweges zusammen. Punktmutationen aller bei der Interaktion beteiligten Aminosäuren der beiden Proteine verringerten den transformierenden Phänotyp der CBL-Mutante.

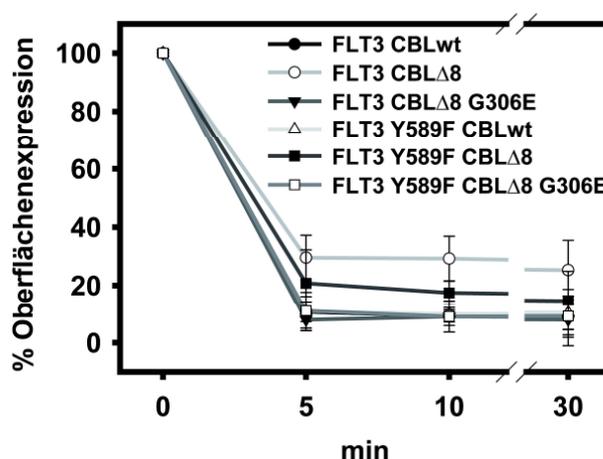


Abb. 3.3.4: Internalisierung der FLT3-CBL-Interaktionsmutanten. FLT3- und CBL-koexprimierende Ba/F3-Zellen wurden für 0, 5, 10 und 30 min mit 100 ng/ml FL stimuliert, anschließend mit FLT3-spezifischen Antikörper gefärbt. Die FLT3 Oberflächenexpression wurde über Durchflusszytometrie gemessen.

Tabelle 3.3.4: CBL-FLT3-Signalweg Interaktionsstellen

Interaktionsstellen	Interaktionspartner
FLT3 YY589/591	CBL
CBL G306	Proteintyrosinkinase
CBL Y731	p85-Untereinheit der PI3K

3.4 Funktionelle Charakterisierung von chimären EGFR/FLT3-Rezeptoren

Die juxtamembranöse Domäne von RTK-Klasse-III-Rezeptoren interagiert mit CBL. Ihr wird auch eine inhibitorische Funktion bei der Rezeptoraktivierung zugeschrieben. Durch die Synthese von chimären EGFR/FLT3-Rezeptoren sollte die für das ligand-induzierte Wachstum relevante Domäne herausgefunden werden. Hierfür wurden die in Abbildung 3.4 gezeigten Rezeptoren stabil in Ba/F3-Zellen eingebracht. Für die chimären Rezeptoren wurden die Domänengrenzen der transmembranösen bzw. juxtamembranösen Domänen nach dem UniprotKD-Programm verwendet.

Die Expression der Rezeptorkonstrukte wurde über Antikörper mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot nachgewiesen. Für den Expressionsnachweis von FLT3, FE und FE-TC wurde ein FLT3-spezifischer und für EGFR, EF und EF-TC ein EGFR-spezifischer Antikörper verwendet. Es fiel auf, dass die chimären Rezeptoren mit dem intrazellulären Teil des EGFR, also FE und FE-TC, eine stärkere Oberflächenexpression (über 10-fach höheren geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzstärke als beim Isotyp) aufwiesen als FLT3 (6,32), jedoch eine schwächere als EGFR (17,45). Die chimären Rezeptoren EF und EF-TC zeigten dagegen die schwächste Expression (4,38 bzw 2,14). Als Negativ-Kontrolle wurden native Ba/F3-Zellen mit den Antikörpern gefärbt (Abb. A2).

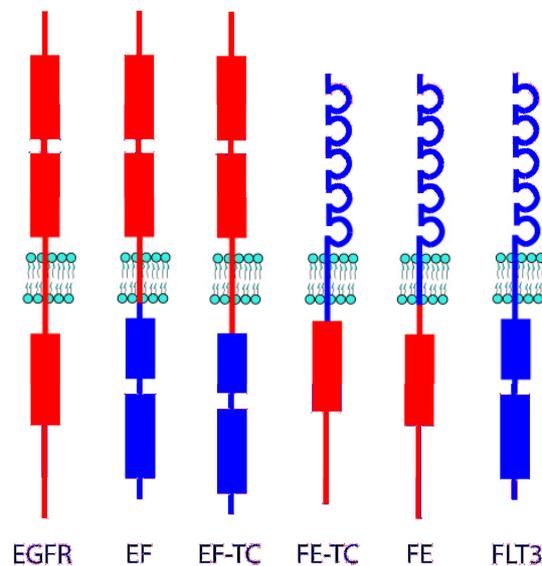


Abb. 3.4: Chimäre Rezeptoren. Aus den Wildtyp-Rezeptoren EGFR (rot) und FLT3 (blau) wurden chimäre Rezeptoren (EF, EF-TC, FE-TC, FE) untersucht. EF und EF-TC entsprechen extrazellulär EGFR (rot), FE-TC und FE dagegen FLT3 (blau). Für die chimären Rezeptoren EF und FE wurde die transmembranöse Domäne als Grenze festgelegt und für EF-TC und FE-TC die juxtamembranöse Domäne.

3.4.1 Proliferation und Apoptose der chimären Rezeptoren

Zur Analyse der Rezeptorstimulation wurden mit den stabil transduzierten Zellen Proliferationsexperimente durchgeführt. Die Zellen mit den Rezeptoren, welche die extrazelluläre und damit auch die ligand-bindende Domäne des FLT3-Rezeptors besitzen, wurden mit FL inkubiert - alle anderen mit EGF. Wie schon unter 3.1.2 gezeigt, führte die FL-Stimulation des FLT3-Rezeptors nur zu einer schwachen, die Stimulation des EGFR-Rezeptors dagegen mit EGF zu einer starken Proliferation (Abb. 3.1.2). Der chimäre Rezeptor FE, der extrazellulär und transmembranös dem FLT3-Rezeptor und ab der juxtamembranen Domäne intrazellulär dem EGFR-Rezeptor entspricht, erreichte 261% der Proliferationsrate von FLT3-Wildtyp und 17% von EGFR-WT. Der EF-Rezeptor wies 666% der FLT3- und 43% der EGFR-Proliferationsrate auf. Die beiden Rezeptoren EF-TC und FE-TC, bei denen nach der juxtamembranen Domäne der andere Rezeptor begann, reagierten überhaupt nicht auf die Liganden (Abb. 3.4.1 A). Wie bei den WT-Rezeptoren in 3.1. korrelierte die Wachstumsrate bei den chimären Rezeptoren nicht mit der Oberflächenexpression. Bis auf eine geringe Reduktion der Apoptoserate nach Zytokin-Entzug von FLT3- und FE-exprimierenden Zellen beeinflussten die Rezeptoren nicht die Apoptose (Abb. 3.4.1 B).

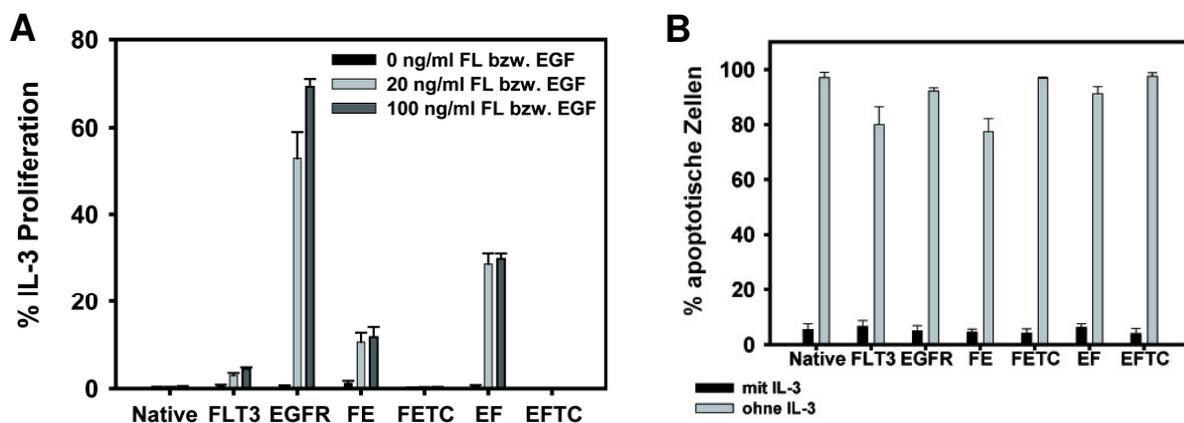


Abb. 3.4.1: Wachstum und Apoptose der chimären rezeptoren-exprimierenden Zellen. (A) Ba/F3-Zellen, stabil transduziert mit den Rezeptoren FLT3, FE und FE-TC, wurden für 72h mit 100 ng/ml FL inkubiert, Zellen, die EGFR, EF und EF-TC exprimierten, wurden mit EGF stimuliert und danach über Trypanblau ausgezählt. Als Negativ-Kontrolle wurden native Ba/F3-Zellen mit FL bzw. EGF inkubiert. (B) Die Apoptoserate der Rezeptor exprimierenden Zellen wurde nach Zytokin-Entzug und IL-3-Stimulation über Annexin-V- und 7-AAD-Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.4.2 Signalübertragung der chimären Rezeptoren

Neben Proliferation und Apoptose wurden auch wichtige nachgeordnete Signalmoleküle der Rezeptoren proteinbiochemisch über Western-Blot untersucht. Dafür wurden von ligand-stimulierten und unstimulierten rezeptor-exprimierenden Zellen Ganzzellsate hergestellt und auf die Phosphorylierung von Signalproteinen analysiert. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Lysat von nativen, mit IL-3-stimulierten Ba/F3-Zellen verwendet. Bei den untersuchten Signalproteinen handelt es sich um „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT5), Proteinkinase B (PKB bzw. AKT) und „mitogen activated protein kinase“ (MAPK). Bei den beiden chimären Rezeptoren EFTC und FETC, die keine Proliferation zeigten, wurden durch Ligand-Zugabe keine Signalwege aktiviert, so dass davon ausgegangen werden muss, dass diese beiden Rezeptoren nicht funktional sind. Die beiden Rezeptoren EGFR und EF mit dem extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors wiesen nach EGF-Stimulation als einzige eine Aktivierung von STAT5 auf. Die Stärke der Phosphorylierung von AKT nach Stimulation spiegelte die Proliferationsstärke der Rezeptoren wieder. EGFR mit der stärksten ligand-induzierten Proliferation wies auch die stärkste Aktivierung von AKT auf, gefolgt von EF, FE und FLT3. Das dritte untersuchte Signalmolekül, die MAPK war bei allen Zellen mit funktionalem Rezeptor nach Ligandstimulation deutlich phosphoryliert (Abb. 3.4.3). Die beiden Rezeptoren mit der stärksten Proliferation, EGFR und EF, hatten auch eine starke Aktivierung von STAT5. Diese Aktivierung ist wohl unabhängig von der intrazellulären Komponente des Rezeptors und hängt mit der Bindung des EGF-Liganden an den extrazellulären Teil des EGFR zusammen.

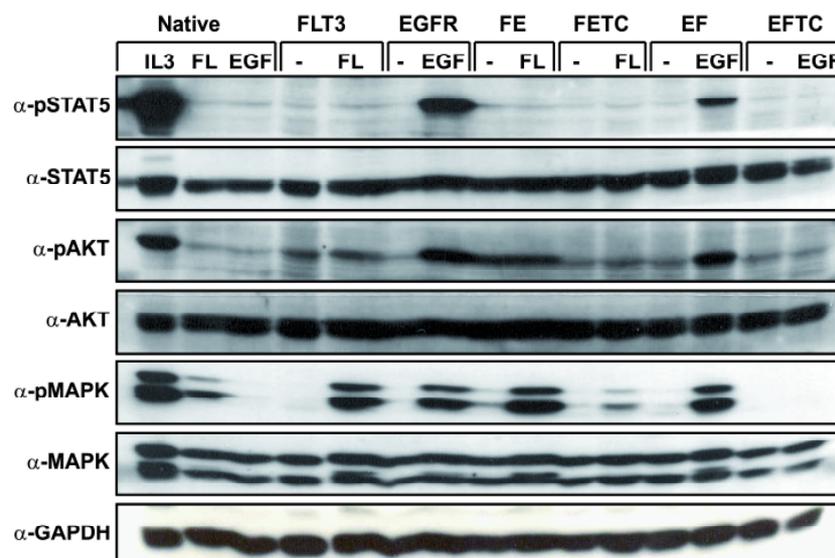


Abb. 3.4.2: Signalwege der chimären Rezeptoren. Ganzzellsate von nativen und rezeptor-exprimierenden Ba/F3-Zellen, unstimuliert (-) oder stimuliert mit 100 ng/ml FL bzw. EGF, wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Mit phosphospezifischen Antikörpern wurde die Aktivität von STAT5, AKT und MAPK und anschließend die Gesamtproteinmenge der Signalproteine analysiert. Vergleichbare Level an Protein wurden mit einem Antikörper gegen GAPDH nachgewiesen.

3.4.3 Transformierender Phänotyp der CBL Δ exon8 in Kooperation mit chimären Rezeptoren

Unter 3.4.1 wurde gezeigt, dass die Rezeptoren mit dem intrazellulären Bereich des FLT3-Rezeptors (EF, FLT3) ein schwächeres ligand-induziertes Wachstum aufwiesen als der entsprechende Rezeptor mit derselben extrazellulären Domäne (EGFR, FE). Diese Rezeptoren sollten nach den Ergebnissen unter 3.2 zusammen mit CBL Δ exon8 auch ein stärkeres Wachstum und einen höheren Apoptoseschutz zeigen, da sie die JM-Domäne des FLT3-Rezeptors als CBL-Interaktionsstelle besitzen. Sowohl die EF/CBL Δ 8- im Vergleich zu den EGFR/CBL Δ 8-Zellen als auch die FLT3/CBL Δ 8-Zellen - verglichen zu den FE/CBL Δ 8-Zellen - hatten einen stärkeren transformierenden Phänotyp (Abb. 3.4.3 A). Die Apoptoserate betrug 37% gegenüber 54%, im anderen Fall 19% gegenüber 21%. Auch der Proliferationszuwachs im Vergleich zu den Zellen, die nur den Rezeptor oder Rezeptor/CBL-WT-exprimierten, fiel bei EF/CBL Δ 8- (2,3-fach) bzw. FLT3/CBL Δ 8-Zellen (7,0-fach) stärker aus als bei den EGFR/CBL Δ 8- (1,3-fach) bzw. FE/CBL Δ 8-Zellen (2,7-fach) (Abb. 3.4.3 B, C). Interessanterweise vermittelten auch die nicht stimulierbaren Rezeptoren FETC und EFTC einen gewissen Apoptoseschutz, wenn sie mit CBL Δ exon8 koexprimiert wurden.

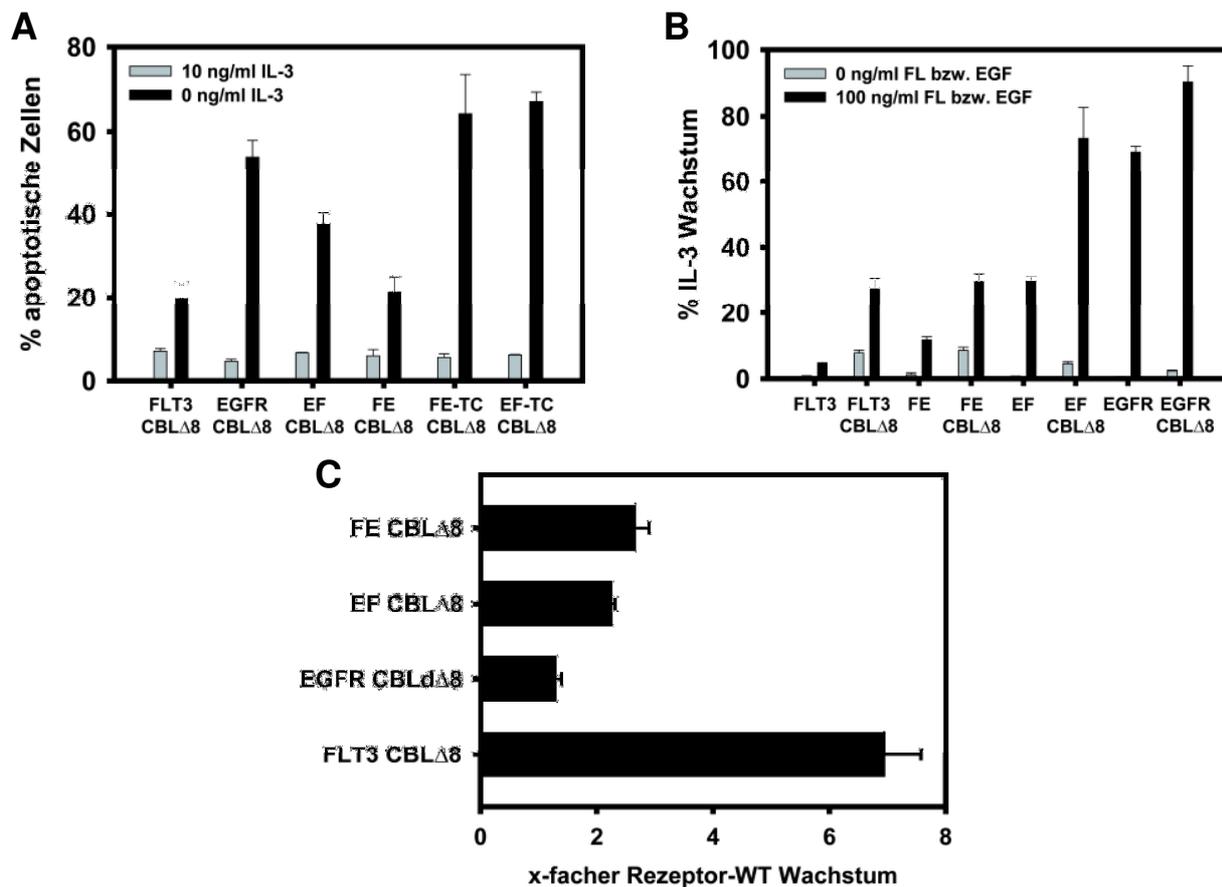


Abb. 3.4.3: Proliferation und Apoptose in Zellen mit chimären Rezeptoren und CBL-Mutation.

(A) Die Apoptoserate der Rezeptor/CBL Δ 8-transduzierten Ba/F3-Zellen wurde nach 72 h Zytokin-Entzug über Annexin-V- und 7-AAD-Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (B) Sowohl Rezeptor als auch Rezeptor/CBL Δ 8-exprimierende Zellen wurden mit 100 ng/ml FL bzw. EGF und 10 ng/ml IL-3 kultiviert. Nach 72 h wurde die Zellzahl der viablen Zellen über Trypanblaufärbung bestimmt und ist in Prozent des IL-3-Wachstums angegeben. (C) Die Wachstumsrate der Rezeptor/CBL Δ 8-Zellen ist als x-faches der Rezeptor-Zellen in Gegenwart sättigender Ligandkonzentrationen angegeben.

3.4.4 Hemmung der CBL-induzierten Proliferation durch pharmakologische Inhibition der Rezeptoren

Das ligand-induzierte Wachstum der Rezeptor/CBL Δ 8-Zellen konnte auch bei den chimären Rezeptoren durch spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt werden. TKIs binden an die intrazelluläre ATP-Bindungsstelle der Kinasedomäne. Daher hemmte der FLT3-Inhibitor AC220 die FLT3- und EF-exprimierenden Zellen, der weniger spezifische EGFR-Inhibitor Erlotinib hemmte EGFR- und FE-exprimierende Zellen, aber in hohen Konzentrationen auch FLT3- und EF-exprimierende Zellen (Abb. 3.4.4).

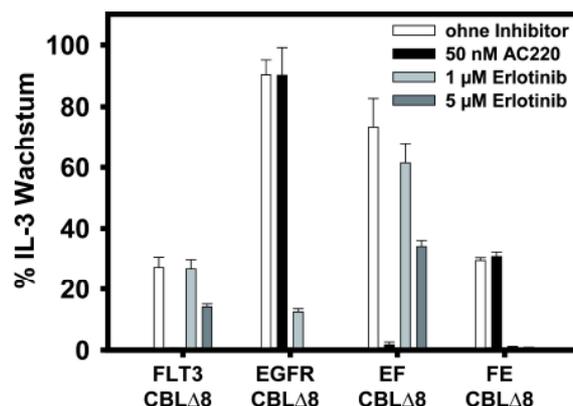


Abb. 3.4.4: Pharmakologische Inhibition der chimären Rezeptoren/CBLΔ8-Zellen. Ba/F3-Zellen, die einen der Rezeptoren FLT3, EGFR, EF, FE und CBLΔ₈ koexprimierten, wurden in Gegenwart von 20 ng/ml FL oder EGF mit 50 nM AC220 bzw. 1 oder 5 μM Erlotinib inkubiert. Nach 72 h wurden über Trypanblaufärbung die lebenden Zellen gezählt.

3.4.5 Signalübertragung der chimären Rezeptor/CBLΔ₈-Zellen

Von den Rezeptor/CBLΔ₈-Zellen wurden schließlich auch die Signalwege über Western-Blot analysiert. Dafür wurden die Zellen vor der Lyse mit und ohne den jeweiligen Liganden stimuliert. Als Kontrolle wurde auch ein Lysat von IL-3-stimulierten nativen Ba/F3-Zellen verwendet. Der Transkriptionsfaktor STAT5 war neben der Positiv-Kontrolle nur in den EGFR/CBLΔ₈-Zellen deutlich aktiviert, MAPK dagegen in allen Zelllinien. AKT war auch in den FLT3-exprimierenden Zellen durch das onkogene CBL aktiviert - im Gegensatz zu den nur rezeptor-exprimierenden Zellen (Abb. 3.4.5).

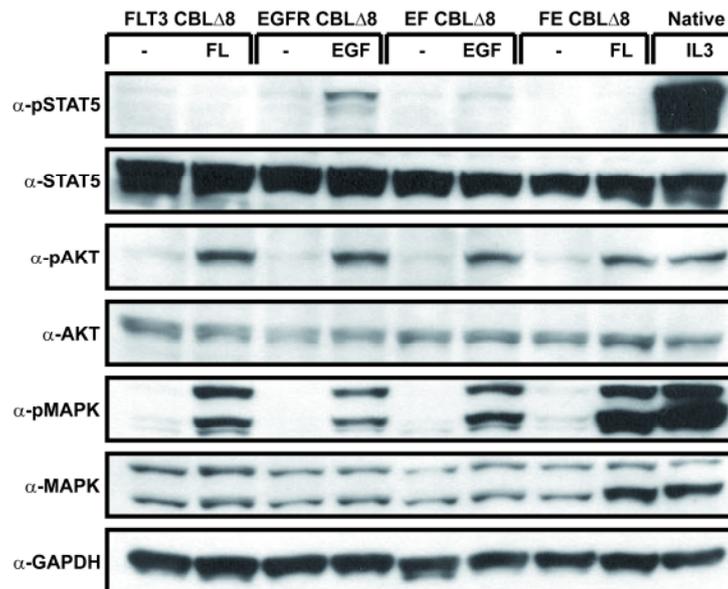


Abb. 3.4.5: Signalwege der chimären Rezeptoren/CBL Δ 8-Zellen. Ganzzelllysate von chimären Rezeptor/CBL Δ exon8-exprimierenden Ba/F3-Zellen, unstimuliert (-) oder stimuliert mit 100 ng/ml FL bzw. EGF, wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Phosphorylierung und Gesamtproteinmenge der Signalproteine STAT5, AKT und MAPK wurden mit spezifischen Antikörpern analysiert. Vergleichbare Level an Protein wurden mit einem Antikörper gegen GAPDH nachgewiesen.

3.5 Funktionelle Charakterisierung von FLT3-Mutationen in akuten Leukämien

Die Onkogene FLT3 und CBL spielen eine große Rolle in der Pathogenese der AML. Wir konnten zeigen, dass Mutationen der Ubiquitin-Ligase CBL mit FLT3-WT kooperieren, um Zellen zu transformieren. Mutationen des FLT3-Rezeptors sind häufige Alterationen, sowohl in der AML als auch in der ALL. Die häufigsten sind „internal tandem duplications“ (ITDs) - Duplikationen von Aminosäuren der juxtamembranösen Domäne und Punktmutationen in der zweiten Tyrosinkinase-Domäne (TKD).

3.5.1 FLT3-Mutationen in Leukämie-Zelllinien und primären Ph⁺ ALL-Proben

Auch in der ALL treten FLT3-Mutationen auf und können neben anderen Onkogenen zur Pathogenese beitragen. Anders als in der AML sind dort FLT3-TKD-Mutationen häufiger zu finden, für die aber weder in der AML noch in der ALL eine prognostische Relevanz gezeigt werden konnte. Ein anderes häufiges und für die Prognose relevantes Onkogen in der ALL ist das Fusionsprotein und die zytosolische Tyrosinkinase BCR-ABL, die erfolgreich mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt werden kann. Jedoch treten in einigen Fällen

Resistenzen gegenüber der Substanz auf. Eine mögliche Ursache für die Resistenzbildung könnte ein zusätzlich mutierter FLT3-Signalweg sein.

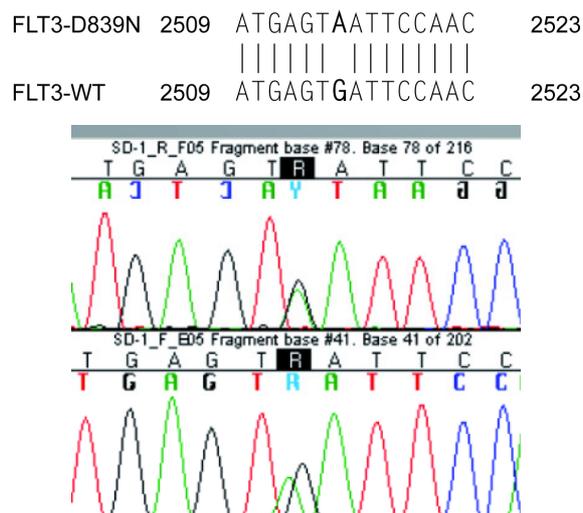


Abb. 3.5.1: FLT3-TKD-Mutation in ALL. Neu entdeckte FLT3-Punktmutation in ALL-Zelllinie SD-1, D839N (G2515A).

Tabelle 3.5.1: FLT3-Mutationsanalyse in Zelllinien und primären Proben.

Zelllinien			
	D839mu	D835mu	ITD
ALL	1/41	1/41	0/41
AML	0/63	0/69 [111]	4/69 [111]
CML	0/16	0/16 [111]	0/16 [111]
Primäre Proben			
	FLT3-TKDmu	Geschlecht: m/w	Durchschnittsalter
BCR-ABL+ ALL	0/30	11/19	29-74; 52,6

Eine neuartige FLT3-Mutation entdeckten wir über eine DNA-Schmelzkurvenanalyse und darauffolgender Sequenzierung in der Aktivierungsschleife der zweiten TKD in der ALL-Zelllinie SD-1. Bei dieser heterozygoten FLT3-TKD-Mutation wurde das Aspartat 839 gegen ein Asparagin ausgetauscht, in dem das Guanin 2503 zu einem Adenosin mutierte (Abb. 3.5.1). Zusätzlich trägt die SD-1-Zelllinie, welche aus dem peripheren Blut einer ALL-Patientin etabliert wurde, eine BCR-ABL1-Fusion [96]. Nachdem die FLT3-Mutation in einer frühen Passage der Zelllinie in der DSMZ nachgewiesen wurde, haben wir in Kooperation mit Dr. Hilmar Quentmeier, DSMZ GmbH, Braunschweig, 41 ALL-, 16 CML- und 63 AML-Zelllinien auf das Vorhandensein von FLT3-Mutationen untersucht (Tab. 3.5.1). Bis auf eine bereits beschriebene FLT3-D835-Mutation in KOCL-33 konnten wir keine weitere FLT3-

Mutation in ALL-Zelllinien entdecken - weder eine FLT3-ITD noch eine FLT3-TKD [114]. Neben Zelllinien sequenzierten wir auch die cDNA von 30 BCR-ABL-positiven ALL-Patienten auf FLT3-TKD-Mutationen. Bei den Proben handelte es sich um cDNA von elf männlichen und 19 weiblichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 52,6 Jahren. Aber bis auf den FLT3-D324-Polymorphismus in zwei der Proben konnten wir keine FLT3-Mutation entdecken.

3.5.1.1 Einfluss der FLT3-D839N-Mutation auf Proliferation und Apoptose

Trotz RNA-Expression des *FLT3*-Gens konnte keine Expression des FLT3-Proteins sowohl über Oberflächenmarkerfärbung als auch durch Western-Blot-Analyse in den SD-1-Zellen nachgewiesen werden. Die SD-1-Zellen zeigten auch kein erhöhtes Wachstum in Gegenwart von FL (Abb. A3 A).

Um zu untersuchen, ob FLT3-D839N zum leukämischen Phänotyp der SD-1-Zellen beitrug, wurden SD-1-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von FLT3-spezifischen Inhibitoren, AC220 und SU5614, inkubiert (Abb. A3 B). Als Negativ-Kontrolle wurde auch die BCR-ABL positive K-562-Zelllinie mit den Substanzen behandelt. Die FLT3-Inhibition hatte keine Wirkung auf die Proliferation beider Zelllinien, jedoch der BCR-ABL-Inhibitor Imatinib mit einer IC_{50} von 105 nM in K-562 und 1200 nM in SD-1. Eine Kombination beider Substanzen hatte keinen zusätzlichen Effekt. Desweiteren überprüften wir in Gegenwart von aufsteigenden Imatinib-Konzentrationen, ob die FLT3-Mutation fähig ist, die Zellen zu transformieren, wenn BCR-ABL inhibiert wird. Dafür wurden SD-1-Zellen zunächst mit 1 μ M Imatinib ausgesät, was der inhibitorsichen Konzentration IC_{25} entspricht. Am dritten Tag wurde die Imatinib-Konzentration auf 2 μ M und nach dem sechsten Tag auf 4 μ M erhöht. Die Zellen waren allerdings nicht in der Lage in Gegenwart von Imatinib zu proliferieren.

Um den Effekt des mutierten Rezeptors auf Proliferation und Apoptose zu untersuchen, wurde die D839N-Mutation über Mutagenese in den FLT3-Expressionsvektor eingefügt und einzeln oder zusammen mit BCR-ABL in Ba/F3-Zellen transduziert. Die Expression der transduzierten Proteine wurde über Oberflächenmarker bzw. Immunblot nachgewiesen (Abb. 3.5.1.1 A/B). Der TKD-Rezeptor zeigte eine dem WT ähnliche Oberflächenexpression, unabhängig von der Expression des BCR-ABL. Nach 72 h wies der D839N-Rezeptor sowohl ohne IL-3 (10%) als auch in Gegenwart von FL (16%) ein erhöhtes Wachstum im Vergleich zum FLT3-WT auf. Jedoch ein deutlich schwächeres als das komplett-transformierende BCR-ABL. Die BCR-ABL/FLT3-D839N-Zellen wuchsen mit ca. 90% der IL-3-Proliferationsrate etwas schlechter mit FL bzw. ohne Zytokin als die BCR-ABL-Zellen (Abb.

3.5.1.1 C). Wie bei der SD-1-Zelllinie führte FL zu keinem verstärkten Wachstum in der doppeltransduzierten Zelllinie. Nach einem 3-tägigen Zytokin-Entzug waren nur etwa 15% der FLT3-D839N-Zellen apoptotisch. In Gegenwart von FL war die Apoptoserate mit ca. 10% noch geringer. Sowohl die BCR-ABL- als auch die BCR-ABL/FLT3-D839N-Zellen hatten mit ca. 5% apoptotischen Zellen denselben Wert nach Zytokin-Entzug wie in Gegenwart von IL3.

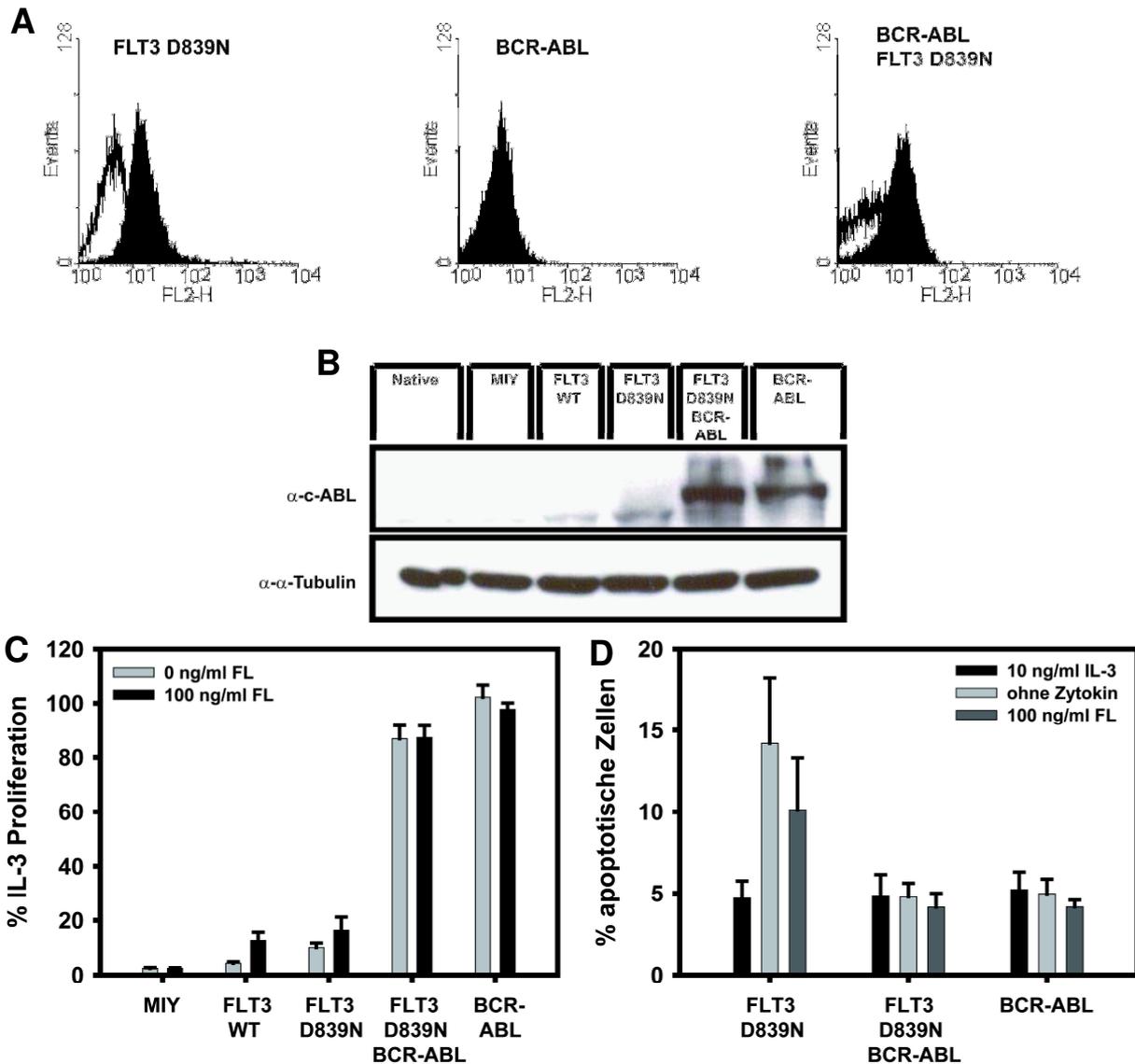


Abb. 3.5.1.1: FLT3-D839N und BCR-ABL in Ba/F3-Zellen. (A) Oberflächenexpression des FLT3-Rezeptors in den etablierten Ba/F3-Zellen. (B) Die Proteinexpression von BCR-ABL in den transduzierten Zellen. (C) Proliferation der Zellen in Gegenwart von 0 und 100 ng/ml FL nach 72 h. (D) Apoptoserate der Zellen nach 72 h Zytokin-Entzug und in Anwesenheit der Zytokine IL-3 bzw. FL.

3.5.1.2 Konstitutive Aktivierung von Rezeptor und Signalproteinen durch FLT3-D839N-Mutation

Für FLT3-ITD- und TKD-Mutationen wurde bereits gezeigt, dass sie zu einer Autoaktivierung des Rezeptors und dessen Signalwegen führen [30, 106]. Ob auch der Erwerb der D839N-Mutation zu einer konstitutiven Aktivierung des FLT3-Signalweges führt, sollte über eine Immunblot-Analyse nachgegangen werden. Dafür wurde zunächst über Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern die Aktivierung von Signalproteinen in unstimulierten und FL-stimulierten Ganzzelllysaten überprüft (Abb. 3.5.1.2 A). STAT5 war nur in den BCR-ABL-exprimierenden und IL-3-stimulierten Zellen phosphoryliert, MAPK hingegen war nach FL-Stimulation in allen Zellen aktiviert. Dass MAPK nach FL-Stimulation auch bei den Leervektor und BCR-ABL-Zellen phosphoryliert war, ist zu erklären mit der Kreuzreaktivität des humanen FL mit murinem FLT3, der in pro-B-Zellen exprimiert wird [115, 116]. Die FLT3-D839N-Zellen zeigten eine konstitutive Aktivierung von MAPK und AKT, was die erhöhte Proliferation und die niedrigere Apoptoseinduktion im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen erklärt. Aus den Lysaten wurde auch der FLT3-Rezeptor immunpräzipitiert, um dessen Phosphorylierung mittels Immunblot-Analyse zu bestimmen (Abb. 3.5.1.2 B). Die relative Bandenstärke des phosphorylierten FLT3-Rezeptors wurde über das Programm Image J unter Berücksichtigung der Menge an Gesamtprotein bestimmt. Im Vergleich zum FLT3-WT war der D839N-Rezeptor um das 2,3-fache stärker an Tyrosinresten phosphoryliert, in den zusätzlich BCR-ABL-positiven Zellen um das 3,9-fache. Nach Ligandstimulation war der Rezeptor um das 1,5- bzw. 1,7-fache stärker phosphoryliert als bei den WT-exprimierenden Zellen.

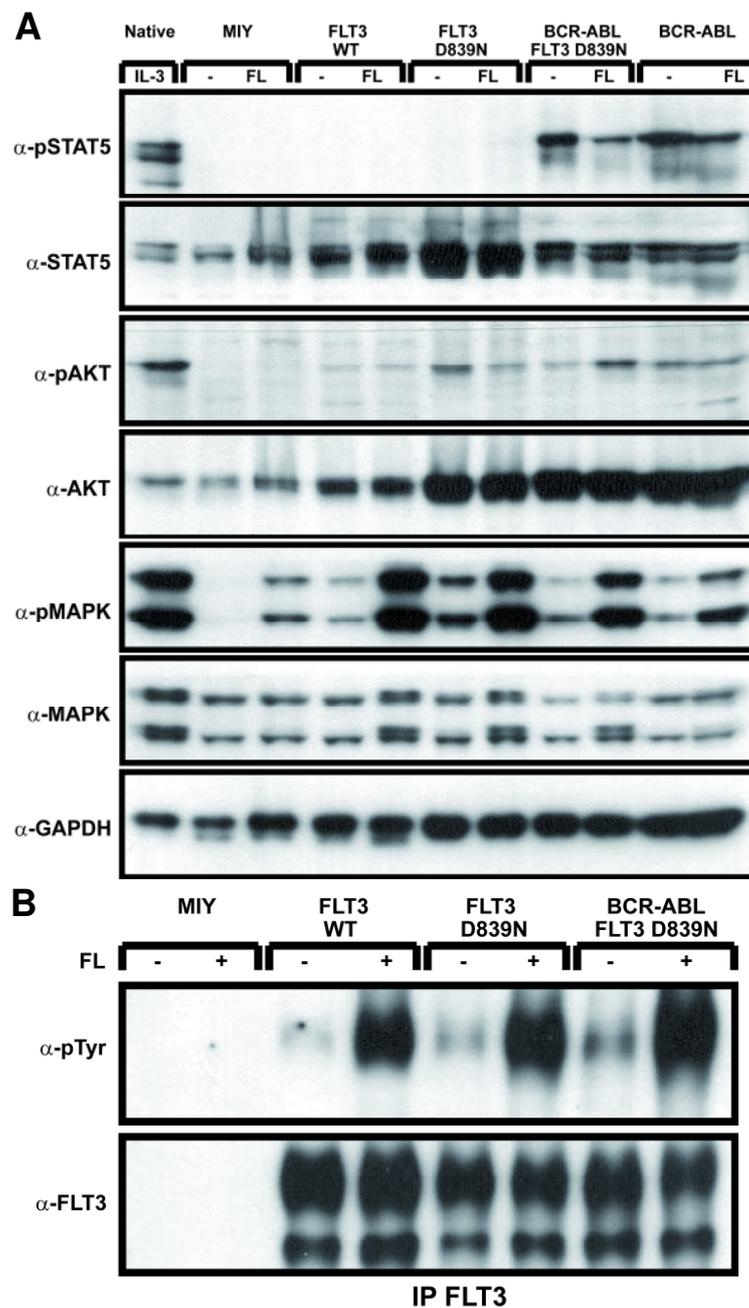


Abb. 3.5.1.2: FLT3 D839N ist konstitutiv aktiviert. Von unstimulierten und FL-stimulierten (100 ng/ml für 10 min) serum-gehungenen Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt. (A) Der FLT3-Rezeptor wurde immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Phospho-Tyrosin-Antikörpern immungeblottet. (B) Die Aktivierung der Signalproteine AKT, MAPK und STAT5 wurde über Immunblot-Analyse untersucht. Die Blots wurden bei A und B anschließend gestrippt und mit Antikörpern gegen das Gesamtprotein inkubiert.

3.5.1.3 Wirkungslosigkeit von FLT3-Inhibitoren in der FLT3-D839N/BCR-ABL-Zellen

Wie die SD-1-Zelllinie wurden auch die generierten Ba/F3-Zelllinien mit den PTK-Inhibitoren AC220 und Imatinib inkubiert (Abb. 3.5.1.3). Der FLT3-spezifische Inhibitor AC220 hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der BCR-ABL-Zellen - unabhängig von der TKD-Mutation. Auch die Kombination beider Substanzen hatte keinen stärkeren Effekt als Imatinib allein. Der IC_{50} von Imatinib mit ca. 330 nM in BCR-ABL/FLT3-D839N und 390 nM in BCR-ABL-Zellen zeigte keinen deutlichen Unterschied. Das bestätigt, dass die FLT3-D839N-Mutation nicht zum transformierenden Potential von BCR-ABL beiträgt und auch keine Resistenz vermittelt. Die Proliferation der FLT3-D839N-Zellen konnte dagegen mit beiden PTK-Inhibitoren gehemmt werden.

Die Ergebnisse unter 3.5.1 sind in Tabelle 3.5.2.3 zusammengefasst.

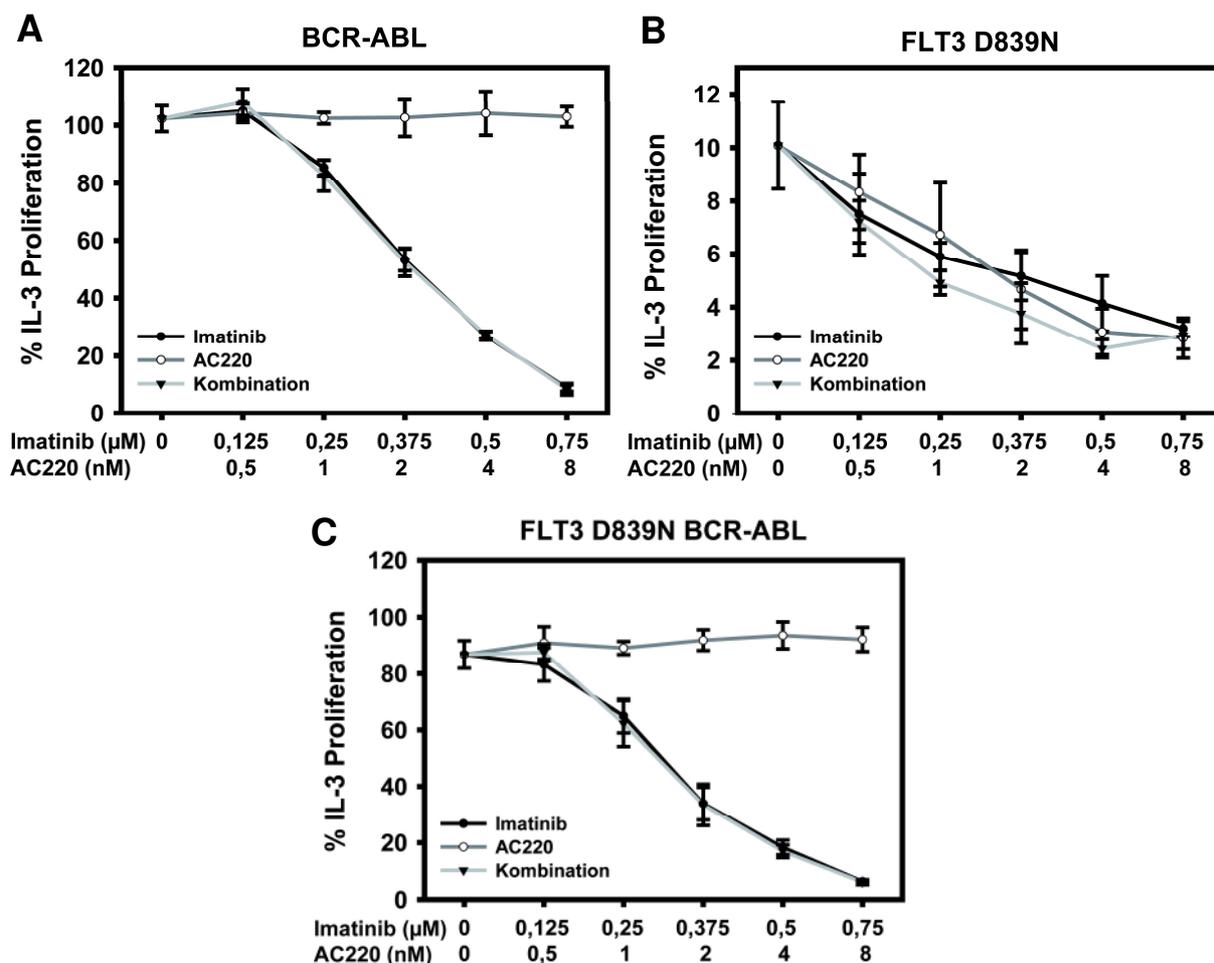


Abb. 3.5.1.3: PTK-Inhibition der FLT3 D839N/BCR-ABL-Zellen. (A) BCR-ABL, (B) FLT3-D839N und (C) FLT3-D839N/BCR-ABL-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der PTK-Inhibitoren AC220 und Imatinib behandelt, in Kombination und einzeln.

3.5.2 FLT3-Mutation N676K in CBF-AML-Patienten

Akute myeloische Leukämien mit den Fusionsgenen CBFB/MYH11 und RUNX1/RUNX1T1 werden als „core-binding factor“- (CBF)-AML zusammengefasst. Diese Gruppe ist mit einer besseren Prognose assoziiert und betrifft 15-20% der de-novo-AML-Fälle von Erwachsenen [117, 118]. Für eine maligne Transformation sind aber zusätzliche Mutationen nötig. Im Rahmen der Promotionsarbeit von Sabrina Opatz wurde bei einem systematischen Mutationsscreen von CBF-AML-Patienten durch Exomsequenzierung eine Leukämie-assoziierte FLT3-Mutation N676K gefunden. Die Mutation wurde in 6% (5 aus 84) der $\text{inv}(16)=\text{CBFB/MYH11}$ - und in 3% (1/36) der $\text{t}(8;21)=\text{RUNX1/RUNX1T1}$ -Patienten gefunden. In den 90 zytogenetisch normalen AML-Patienten wurde die N676K-Mutation einmal gefunden - allerdings dort, wie bisher beschrieben, zusätzlich zu einer ITD [119]. Die folgenden Experimente wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Philipp Greif, Klinikum der Universität München, durchgeführt.

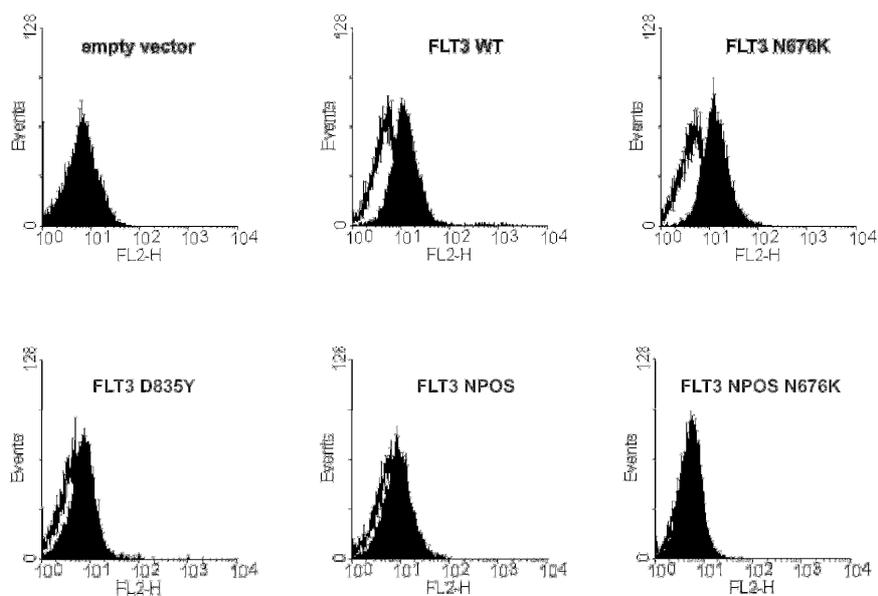


Abb. 3.5.2: Expression von FLT3-TKD und -ITD in Ba/F3-Zellen. Die Expression der Rezeptoren in den etablierten Ba/F3-Zellen wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern über Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Histogramme zeigen die Expression der in die Zellen stabil eingebrachten Rezeptoren (schwarz) im Vergleich zur Isotypkontrolle (weiß).

Über Mutagenese wurde die N676K-Punktmutation in den MIY-FLT3-WT- und MIY-FLT3-NPOS-Vektor eingefügt und über retrovirale Transduktion stabile Ba/F3-Zellen hergestellt. Die FLT3-Expression wurde über Durchflusszytometrie und Immunblot nachgewiesen (Abb. 3.5.2). Der FLT3-N676K-Rezeptor wird ähnlich stark an der Zelloberfläche exprimiert wie der WT-Rezeptor, dagegen die TKD-Mutante D835Y und die ITD-Mutante NPOS deutlich

schwächer. Die ITD-Zellen mit der zusätzlichen N676K-Mutation zeigen eine noch schwächere Oberflächenexpression des Rezeptors.

3.5.2.1 Proliferationverstärkung und Apoptoseresistenz durch FLT3-N676K-Mutation

Um den transformierenden Phänotyp der N676K-Mutation zu untersuchen, wurden Proliferations- und Apoptoseversuche durchgeführt und die Signalübertragung der Zellen untersucht. Nach 72 h ist das IL-3- und FL-unabhängige Wachstum der N676K-Zellen zu sehen. Anders als der FLT3-WT werden die Zellen durch Zugabe des Liganden zu keinem stärkeren Wachstum stimuliert. Das IL-3-unabhängige Wachstum der ITD-Zellen Npos entspricht in etwa dem IL-3-Wachstum. Die FLT3-TKD-Mutation D835Y erreicht ca. 45% und N676K ca. 25% der IL-3-Proliferation (Abb. 3.5.2.1 A). Das TKD-D835Y-Zellen ein schlechteres Wachstum mit FL zeigen, liegt an dem inhibitorischen Effekt des Liganden, der eine schnellere Internalisierung des mutierten Rezeptors bewirkt, wie bereits für TKD-Mutationen in anderen Arbeiten beschrieben [120-122]. Über einen längeren Zeitraum wurde der pro-proliferative Phänotyp der FLT3-Mutanten noch deutlicher. Bei der 10-tägigen Langzeitproliferation werden die Zellen langsam IL-3 entwöhnt. In den ersten drei Tagen werden sie im Medium mit 0,1%-konditionierten WEHI-Überstand als IL-3-Quelle aufgenommen, bevor sie ohne IL-3 kultiviert werden. Wegen dem anfänglich vorhandenen IL-3 wuchsen zunächst alle Zelllinien. Aber schon während den ersten drei Tagen war ein unterschiedliches Wachstum zu sehen. Die FLT3-NPOS-Zellen wuchsen wie die IL-3-Kontrollen unabhängig vom Medium. FLT3-WT und der Leervektor wuchsen nach der Übergabe ins IL-3-freie Medium nicht mehr. Sowohl die N676K- als auch die D835Y-Mutante wuchsen ca. drei Logstufen besser als der WT, jedoch 1,5 Logstufen weniger als die ITD (Abb. 3.5.2.1 B). Der Phänotyp in der Zellproliferation spiegelte sich auch bei der Apoptose wider. Alle FLT3-Mutanten zeigten eine deutlich niedrigere Apoptoserate als native oder FLT3-WT-exprimierende Ba/F3-Zellen (Abb. 3.5.2.1 C). Wobei die FLT3-ITD exprimierenden Zellen mit 4,5% eine geringere Apoptoserate als die TKD-Mutanten mit 10% für N676K und 7% für D835Y hatten.

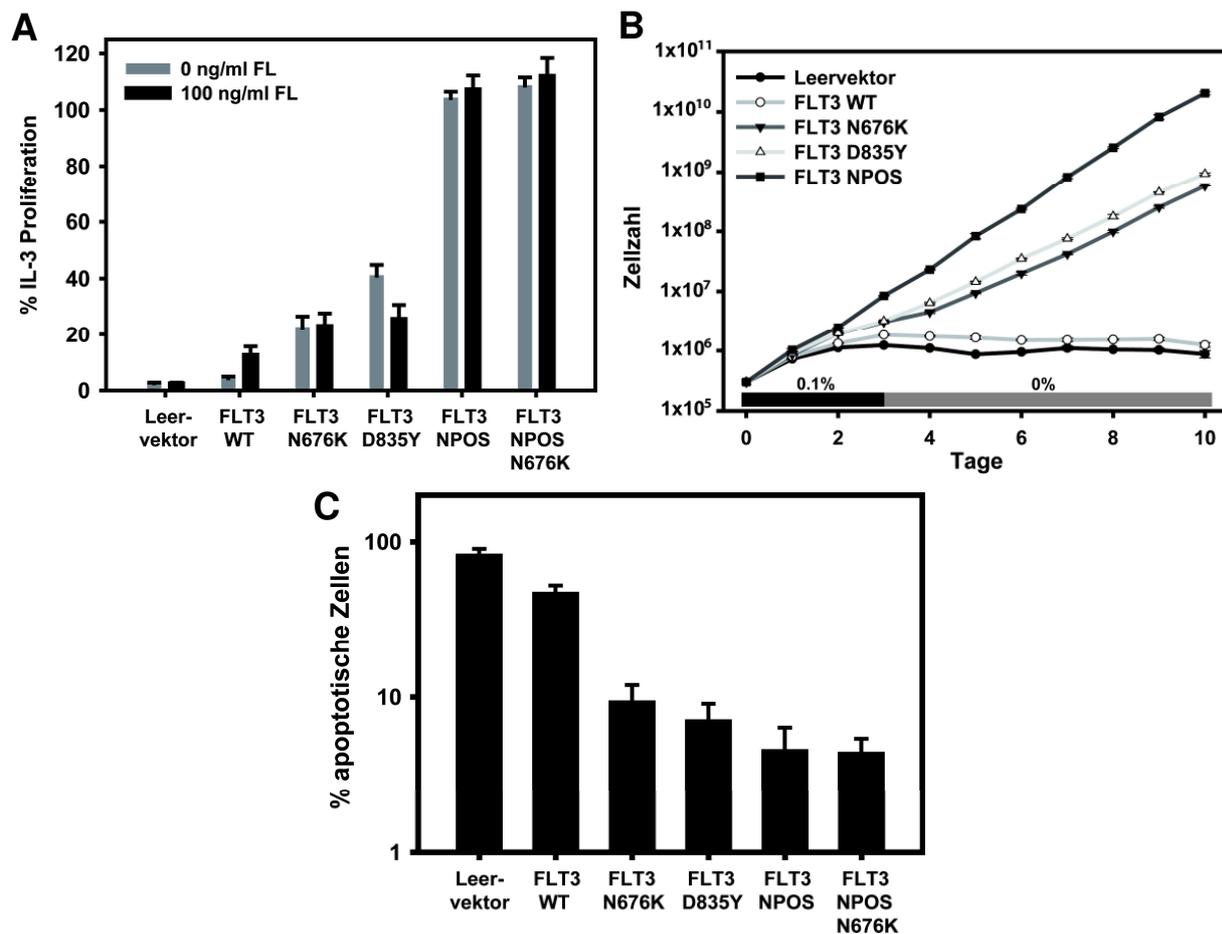


Abb. 3.5.2.1: Proliferation und Apoptose der FLT3-Mutanten. (A) Stabile Ba/F3-Zelllinien wurden nach spontanem IL-3-Entzug mit einer Anfangszellzahl von 4×10^4 /ml \pm 100 ng/ml FL über 72 h kultiviert und die Proliferation gemessen. (B) Ba/F3-Zellen wurden über 10 Tage mit einer Anfangszellzahl von 3×10^5 /ml kultiviert. In den ersten drei Tagen wurde dem Medium noch 0,1% konditionierter WEHI-Überstand als IL-3-Quelle zugefügt. (C) Den angegebenen Ba/F3-Zelllinien wurde IL-3 entzogen und nach 72 h die Apoptoserate über Annexin-V- und 7-AAD-Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.5.2.2 Konstitutive Aktivierung des FLT3-Signalweges durch FLT3-N676K-Mutation

Um den dem transformierenden Potential zugrunde liegenden Signalweg zu identifizieren wurden Ganzzellsate der FLT3-exprimierenden Ba/F3-Zellen über Immunblot analysiert. Die Signalproteine MAPK, AKT und STAT5 wurden in Lysaten von unstimulierten und mit FL-stimulierten Zellen auf ihre Aktivierung untersucht (Abb. 3.5.2.2 A). Die ITD-exprimierenden Zellen zeigten eine konstitutive STAT5-Aktivierung, die TKD-Mutanten N676K und D835Y dagegen eine konstitutiv aktive MAPK. Ebenso wurde auch die konstitutive Aktivierung des immunpräzipitierten FLT3-Rezeptors über Westernblot-Analyse untersucht. Unter Berücksichtigung der Gesamtproteinmenge wurde die relative

Bandenstärke des phosphorylierten FLT3-Rezeptors über das Programm Image J von zwei Western-Blots berechnet und der Mittelwert bestimmt. Im Vergleich zum FLT3-WT war der N676K-Rezeptor um das 4,8-fache stärker konstitutiv an Tyrosinresten phosphoryliert, nach FL-Stimulation um das 2,1-fache.

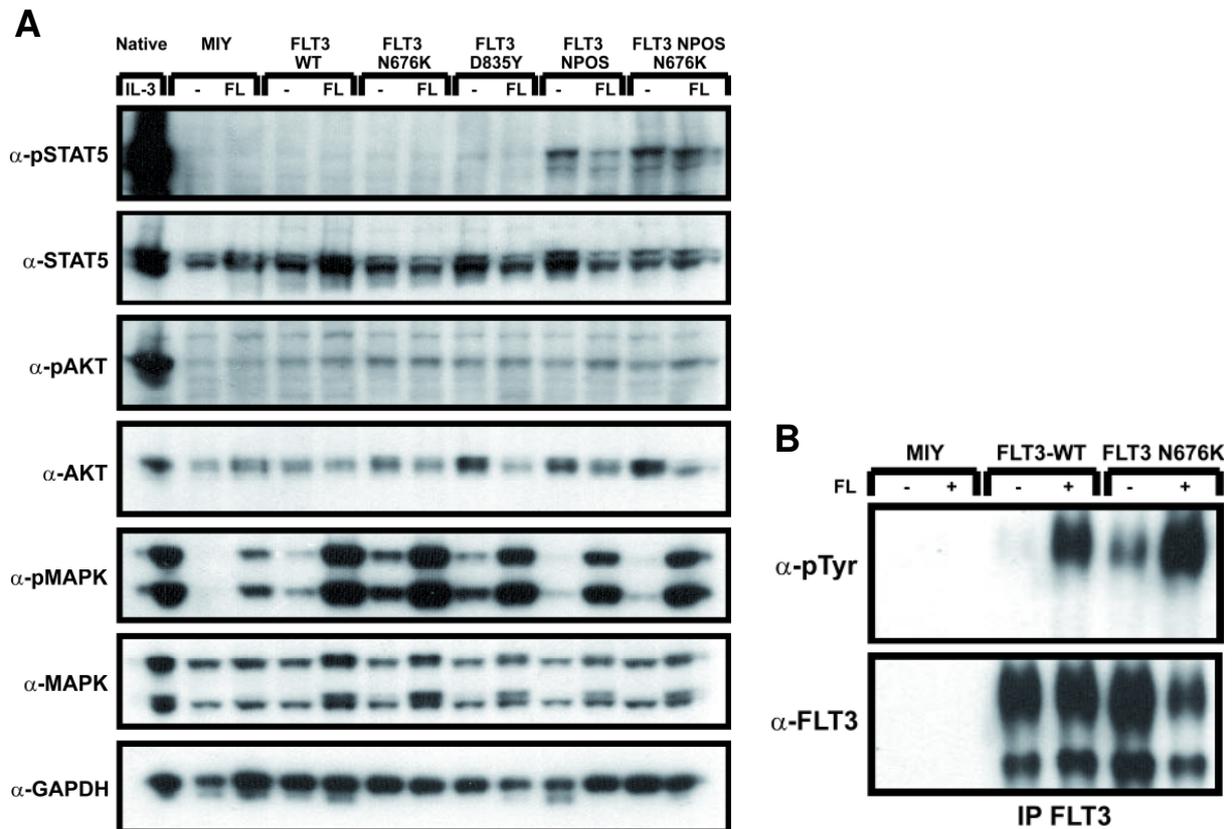


Abb. 3.5.2.2: Analyse der Signalwege der FLT3-Mutanten. (A) Ba/F3 Ganzzelllysate wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen Signalproteine inkubiert. Danach wurde die Nitrozellulosemembran gestript und auf das Gesamtprotein der Signalproteine untersucht. (B) Der FLT3-Rezeptor wurde immunpräzipitiert mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit phospho-Tyrosin-Antikörper immungeblottet.

3.5.2.3 Resistenzvermittlung gegenüber PTK-Inhibitoren durch FLT3-N676K-Mutation

Die Punktmutation N676K des FLT3-Rezeptors wurde als eine resistenzvermittelnde Mutation im ITD-Hintergrund beschrieben [123], jedoch wurde die Resistenzvermittlung der Mutante noch nicht ohne zusätzliche ITD untersucht. Dafür wurden NPOS-(ITD)-Zellen mit und ohne zusätzlicher N676K-Mutation und N676K-Zellen mit den FLT3-Inhibitoren PKC412 und AC220 behandelt und deren Proliferation verglichen (Abb. 3.5.2.3). Beide FLT3-Inhibitoren hemmen das Wachstum der FLT3-NPOS- und FLT3-N676K-Zellen mit einem IC_{50} im niedrigen nM-Bereich. Der N676K-Rezeptor vermittelt nur eine schwache Resistenz.

Zellen mit der Doppelmutante hingegen zeigen eine deutliche Resistenz gegenüber den Substanzen.

Tabelle 3.5.2.3 fasst die Phänotypen der unter 3.5.1 und 3.5.2 etablierten Ba/F3-Zellen zusammen. Neben dem konsitativ aktivierten Signalweg ist die Proliferationsrate (% IL-3-Proliferation), die Apoptoserate (% nach Zytokin-Entzug), die FLT3-Oberflächenexpression (CD-135; -/+ /++) und das Ansprechen auf FLT3-Inhibitoren (-/+ /++) angegeben.

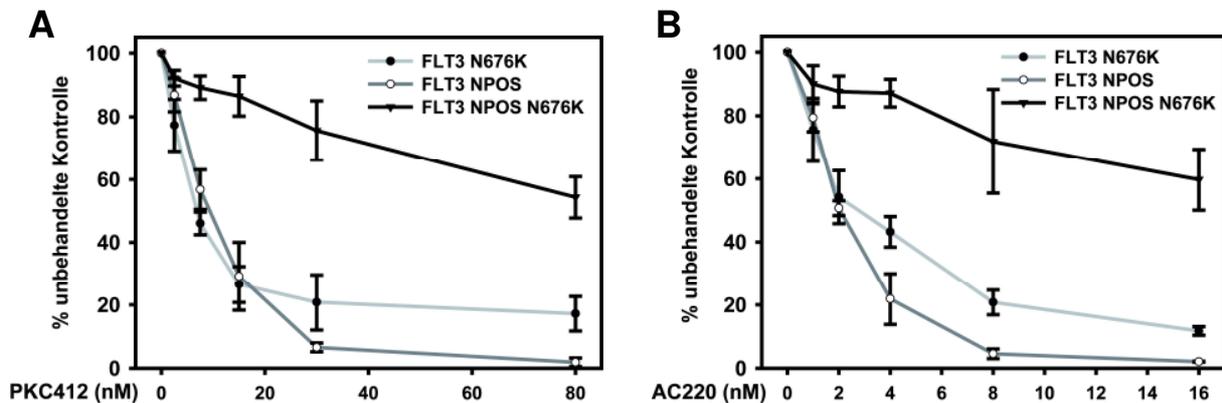


Abb. 3.5.2.3: FLT3-Inhibition der TKD- und ITD-Zellen. FLT3-exprimierende Ba/F3-Zellen wurden mit (A) PKC412 und (B) AC220 inkubiert und die Zellzahl nach 72 h über Trypanblaufärbung bestimmt.

Tabelle 3.5.2.3: Phänotypen der transduzierten Mutationen

Mutation	Signalweg	Proliferation	Apoptose	CD-135	FLT3-Inh.
ITD	STAT5	100%	4,5%	+	++
ITD/N676K	STAT5	100%	4,5%	+	-
N676K	MAPK	25%	10%	++	+
D835Y	MAPK	45%	7%	+	++
D839N	MAPK	10%	15%	++	++
BCR-ABL/D839N	STAT5	90%	5%	++	-
BCR-ABL	STAT5	100%	5%	-	-

3.5.3 HDAC-Inhibition als Therapiestrategie in FLT3-ITD-Zellen

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) sind eine vielversprechende Therapie in Kombination mit Chemotherapie oder PTK-Inhibitoren. In CML erhöhte die gleichzeitige Verwendung von Imatinib und einem HDACi die Vernichtung von CML-Stammzellen und verhinderte damit eine Remission [124]. In AML könnte die gemeinsame Verwendung von FLT3- und HDAC-Inhibitoren einen ähnlich guten Effekt zeigen. Zu diesem Zweck behandelten wir Ba/F3-

Zellen, transduziert mit FLT3-ITD, mit einer Kombination aus dem FLT3-Inhibitor AC220 und dem HDACi Panobinostat (LBH589). Die Expression des mutierten FLT3-Rezeptors wurde über Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 3.5.3 C). Das IL-3-unabhängige Wachstum der ITD-Zellen wurde in der Kombination mit niedrigen Konzentrationen beider Substanzen stark gehemmt. Als Spezifitäts- und Toxizitäts-Kontrolle wurden auch Leervektor-exprimierende Zellen in Gegenwart von IL-3 mit den Substanzen inkubiert. Die Proliferation dieser Zellen wurde von den Substanzen kaum beeinträchtigt (Abb. 3.5.3 A). In den höchsten Konzentrationen wies die Kombination aus AC220 mit LBH589 eine signifikant höhere Apoptoserate in FLT3-ITD-Zellen auf (90%). Die 70% apoptotischen Zellen bei den leervektor-exprimierenden Zellen war deutlich niedriger (Abb. 3.5.3 B). Die Ergebnisse wurden in Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. Oliver Krämer, Friedrich-Schiller Universität Jena durchgeführt [125].

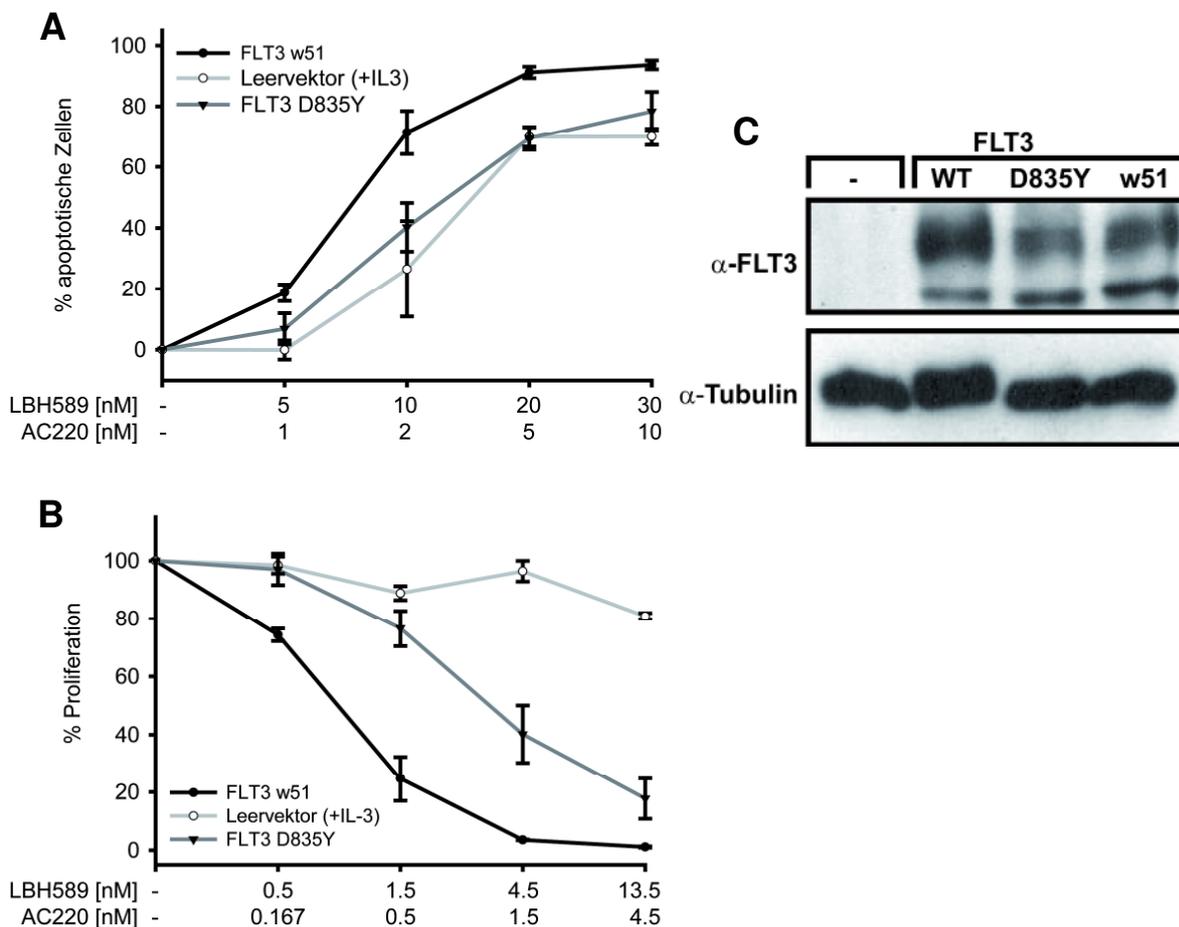


Abb. 3.5.3: Duale HDAC- und FLT3-Inhibition in FLT3-ITD-transformierten Zellen. (A) Ganzzellsate von Ba/F3-Zellen wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf die Expression von FLT3 und β -Actin untersucht. (B) Proliferation Leervektor- und FLT3-ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen über 72 h in Gegenwart von aufsteigenden AC220 und LBH589-Konzentrationen. (C) Apoptose der Leervektor- und FLT3-ITD-exprimierenden Ba/F3-Zellen nach 72 h in Gegenwart aufsteigender Konzentrationen von AC220 und LBH589.

4 Diskussion

4.1 Kooperation von CBL-Mutanten mit RTK-Klasse-III-Rezeptoren

In humanen Tumoren sind RTKs häufig durch Deregulierung verstärkt aktiv. Diese aberrante Aktivierung ist meist auf eine Überexpression oder auf aktivierende Mutationen der Rezeptoren zurückzuführen [11, 126, 127]. Aber auch der Verlust einer negativen Regulation der Rezeptoren – wie z.B. durch CBL - wird als mögliche Ursache angesehen [128-131]. Der negative Regulator CBL bindet über die TKB-Domäne an phosphorylierte Tyrosine der Rezeptoren und leitet dann durch Ubiquitinierung der Rezeptoren die Internalisierung und schließlich den Abbau ein. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Publikation unserer Gruppe wurde gezeigt, dass die CBL Δ exon8-Mutante FLT3-exprimierende Ba/F3-Zellen transformiert [8]. Sowohl Mutationen in CBL [10, 80, 132, 133] als auch Alterationen in Genen der RTK-III-Rezeptorfamilie werden häufig in myeloischen Neoplasien vorgefunden [24, 25, 134]. Daraus ergab sich eine Zielsetzung dieser Arbeit: Zu untersuchen, ob die CBL-induzierte Transformation FLT3-spezifisch oder einen generellen Mechanismus der malignen Transformation darstellt. Dafür wurden Zelllinien hergestellt, die sowohl CBL Δ exon8 als auch verschiedene RTK und Zytokinrezeptoren exprimierten.

Bereits in den etablierten rezeptor-transduzierten Zellen haben wir eine unterschiedliche Proliferationsrate beobachtet, die nicht mit der Oberflächenexpression der Rezeptoren korrelierte. Dieser Unterschied in der Proliferation ist wohl zum Teil auf inhibitorische Funktionen von rezeptor-internen Domänen zurückzuführen, was unter 4.4 diskutiert wird. Die Rezeptoren konnten nach ihrer Proliferation klar zwei Gruppen zugeteilt werden: Zur ersten Gruppe, die eine schwache proliferative Ligandantwort zeigte, gehörten die RTK-Klasse-III-Rezeptoren (FLT3, KIT, PDGFRA, PDGFRB). In der zweiten Gruppe, mit einer starken ligand-induzierten Proliferation, befinden sich Nicht-RTK-Klasse-III und Zytokinrezeptoren (EGFR, IGF1R, EPOR und MPL) und CSF1R. Interessanterweise zeigten nur die RTK-III/CBL Δ exon8-kotransduzierten Zellen mit Ligandstimulation eine über 10-fach höhere Zellproliferation im Vergleich zu RTK-III/CBL-WT-Zellen. Diese stärkere ligand-abhängige Proliferation ging mit einer stärkeren Phosphorylierung der Rezeptoren einher. Mit der verstärkten IL-3-unabhängigen und ligand-abhängigen Proliferation dieser Zellen korrelierte auch eine reduzierte Apoptoserate. Durch die Überexpression von CBL-WT erhöhte sich dagegen der Anteil an apoptotischen Zellen nach Zytokin-Entzug. Wenn CBL Δ exon8 koexprimiert wurde kam es bei jedem untersuchten Rezeptor (FLT3, PDGFRA, IGF1R) zu einer Verzögerung der Rezeptor-Internalisierung nach Ligandstimulation. Weitaus stärker jedoch war die Verzögerung für die beiden Rezeptoren der RTK-Klasse-III (FLT3 und

PDGFRA). Unsere Ergebnisse weisen damit auf eine starke Kooperation zwischen der CBL-Mutante und den RTK-Klasse-III-Rezeptoren hin. Zuvor wurde bereits von uns und anderen Autoren gezeigt, dass onkogenes CBL eine Hyperproliferation in FLT3- bzw. KIT-exprimierenden Zellen induziert [8, 87, 108]. Bonita *et al.* zeigte, dass PDGFRA-exprimierende murine NIH-3T3-Fibroblasten durch CBL-Mutanten transformiert werden können [51]. In der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte ebenfalls der apoptotische Phänotyp von CBL beobachtet werden. CBL-WT erhöhte die Tamoxifen-induzierte Apoptose in den MCF-7-Zellen, das onkogene CBL-70Z dagegen verhinderte eine Apoptoseinduktion [135]. Die von uns beobachtete Verzögerung der Internalisierung von RTKs durch onkogenes CBL wurde für FLT3 und einige andere RTKs bereits beschrieben und deutet auf einen dominant negativen Effekt hin [58, 87, 136-139]. Die starke ligand-abhängige CBL-induzierte Proliferation unserer rezeptor-exprimierenden Zellen weist auf einen aktivierten Rezeptor als Grundvoraussetzung für das transformierende Potential von CBL hin. Versuche mit einem kinase-inaktiven FLT3 und die Verwendung von PTK-Inhibitoren bestätigten diese Abhängigkeit. Die Proliferation aller rezeptor/CBL Δ exon8-Zellen konnte durch spezifische PTK-Inhibitoren verhindert werden. Die PTK-Inhibitoren induzierten auch eine erhöhte Apoptoserate. Die Inhibition des Wachstums durch PTK-Inhibitoren konnte für FLT3- und CBL-Mutante-koexprimierende Zellen zuvor von uns und anderen gezeigt werden [8, 87]. Die vorliegende Arbeit und andere zeigen auf, dass CBL als Signalprotein in apoptotische und proliferative Signalwege eingreift. Onkogenes CBL führt dabei zu einem pro-proliferativen und anti-apoptotischen Phänotyp und verzögert die Rezeptor-Internalisierung. Bei CBL-Mutationen handelt es sich somit sowohl um „gain of function“- als auch um „loss of function“-Mutationen. Diese Arbeit ist die erste die eine Vielzahl von Rezeptoren im Zusammenspiel mit CBL untersucht und aufzeigt, dass CBL besonders mit FLT3, KIT, PDGFRA und PDGFRB kooperiert, um IL-3-abhängige Zellen zu transformieren - nicht mit anderen RTKs und Zytokinrezeptoren. Was die Bedeutung von CBL-Mutationen in Tumoren, die auf die Signalgebung dieser Rezeptoren angewiesen sind, hervorhebt.

Zwei essentielle Protein-Domänen für die E3-Ligase-Aktivität von CBL sind der LINKER und der RING-Finger. Bei der CBL Δ exon8-Mutation sind sowohl Bereiche der LINKER- als auch RING-Finger-Domäne deletiert - auch die beiden Tyrosine 368 und 371 der LINKER-Domäne, die eine entscheidende Rolle für die Transformation durch CBL spielen und onkogenes Potential vermitteln [109]. Da Punktmutationen dieser Tyrosine die häufigsten CBL-Mutationen darstellen, haben wir in unserem Zellmodell das transformierende Potential von LINKER-Mutanten mit der Deletionsmutante verglichen. Wir kamen zu dem Ergebniss, dass auch die Mutanten Y368F, Y371F, YY368/371FF und Y371H zu einer ligand-unabhängigen und verstärkten ligand-abhängigen Proliferation und reduzierten Apoptoserate in FLT3-exprimierenden Zellen führten. Verglichen mit der LINKER/RING-Finger-

Deletionsmutante CBL Δ exon8 jedoch war das transformierende Potential geringer. In der Literatur gibt es bezüglich Mutationen der LINKER-Tyrosine kontroverse Ergebnisse. Langdon und Kollegen haben gezeigt, dass Deletionen dieser Tyrosine - aber nicht Substitutionen zu Phenylalanin - NIH-3T3-Fibroblasten transformierten [109, 138]. Da das onkogene Potential der Δ 371 und Δ 368 Mutanten ebenso stark war, wie das der LINKER/RING-Finger-Mutante CBL-70Z, postulierten die Autoren, dass sowohl Sequenzen des RING-Fingers als auch die Phosphorylierung der LINKER-Tyrosine keinen Einfluss nehmen auf das transformierende Potential von CBL. Jedoch zeigte eine andere Arbeitsgruppe, dass sowohl Δ 371 als auch Y371F FLT3- und KIT-exprimierende Zellen gleich stark transformierten [108]. Desweiteren führte Y371F zu einem Verlust der E3-Ligase-Aktivität und die Phosphorylierung des Tyrosins zu einer Konformationsänderung und Aktivierung des Proteins [60, 136, 140]. Auch für CBL-b wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung von Y363 (entspricht Y371 in CBL) eine Konformationsänderung bewirkt und die E3-Ligase-Aktivität vollständig aktiviert [141]. Erst durch die Phosphorylierung der LINKER-Domäne wird die E2-Bindungsstelle im Protein vollständig freigelegt [110]. Mutationsanalysen haben ergeben, dass nicht alle CBL-Mutanten, die die E3-Aktivität verloren haben, transformierend sind und dass Alterationen der LINKER-Region entscheidend sind für die Transformation von CBL [138]. Eine RING-Finger-Alteration ist dagegen ausreichend, um das onkogene Potential von CBL zu aktivieren aber nicht um es vollständig auszulösen [109]. Das bedeutet, um das vollständige onkogene Potential von CBL auszulösen, ist eine Alteration in der LINKER- sowie in der RING-Finger-Domäne nötig. Unsere Ergebnisse bekräftigen die große Bedeutung der LINKER-Tyrosine für das transformierende Potential von CBL und, dass eine Alteration in beiden Domänen dieses Potential erhöht.

In der CMML sind CBL-Mutationen mit bis zu 20% der Patienten sehr häufig. Es kommen aber auch Mutationen von RTK-Klasse-III-Rezeptoren vor - hauptsächlich Fusionsgene mit PDGFRB [24, 74, 79, 83, 88]. In unseren untersuchten CMML-Proben haben 14,8% eine CBL-Mutation in der LINKER- oder RING-Finger-Domäne. Wir konnten sowohl bereits beschriebene als auch neuartige Mutationen identifizieren. Neben der häufigsten Punktmutation Y371H haben wir auch Deletionen des Y371 und des ganzen Exon 8 bzw. Exon 9 gefunden. Die beiden Punktmutationen K382Q und C404W im RING-Finger sind bisher noch nicht beschrieben worden. Allerdings wurde für das Lysin 382 sowohl heterozygot als auch homozygot die K382E-Mutation beschrieben [142]. Es wurde gezeigt, dass eine Mutation des benachbarten Cystein, C381A und des hoch-konservierten Tryptophans W408 im RING-Finger die Ubiquitin-Ligase-Funktion von CBL aufhebt [59]. Mutationen des Cystein 404 sind bereits beschrieben, aber nicht der Austausch zu einem Tryptophan [74, 77, 79, 143]. Das Cystein 404 bindet an ein Zn²⁺-Ion und Lysin 382

interagiert mit dem E2-Enzym, was eine kritische Rolle der beiden Aminosäuren bei der Ubiquitin-Ligase-Funktion vermuten lässt (1FBV der Protein Data Bank) [60]. Unser Mutationsscreen bestätigt den LINKER und RING-Finger als Hotspot, insbesondere Aberrationen des LINKER-Tyrosins 371.

Diese Ergebnisse der Arbeit haben den transformierenden Phänotyp der CBL-Mutanten charakterisiert. Die starke Kooperation mit RTK-Klasse-III legt nahe zukünftig Tumore auf CBL-Mutationen zu untersuchen, in denen diese Rezeptoren eine große Bedeutung haben, z.B. GIST, Sarkom oder kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC) [25, 144]. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es den kritischen Signalweg, der hinter dem pro-proliferativen und anti-apoptotischen Phänotyp der CBL-Mutanten steckt, zu identifizieren.

4.2 AKT als Mediator CBL-induzierter Transformation

Western-Blot-Analyse von Rezeptor/CBL-kotransduzierten Zellen nach Ligandstimulation zeigte eine starke Aktivierung von AKT und MAPK in RTK-III/CBL Δ exon8-koexprimierenden Zellen im Vergleich zu den RTKIII/CBL-WT-Zellen. Die schwächere MAPK-Aktivierung nach Ligandstimulation in KIT/CBL-WT- und FLT3/CBL-WT-exprimierenden Zellen ist durch eine Ras-Inhibition durch das überexprimierte CBL-WT zu erklären. CBL und der Ras-Austauschfaktor SOS konkurrieren beide um die N-terminale SH3-Domäne von Grb2. CBL verhindert die Bindung von SOS an Grb2 und inhibiert somit die Ras/MAPK-Aktivierung [145]. Diese Interaktion ist wohl im CBL-Mutante-Hintergrund gestört. Die verstärkte MAPK-Aktivität in diesen Zellen scheint ein indirekter Effekt von der CBL-Mutante zu sein und ist mit einer verstärkten Signalgebung des Rezeptors zu erklären. Denn Experimente mit pharmakologischen Substanzen identifizierten den PI3K/AKT-Signalweg als den kritischen Mediator der onkogenen CBL-Mutante und nicht den MAPK-Signalweg. PI3K/AKT-Inhibitoren MK2206, Rapamycin und LY294002 waren in der Lage sowohl die CBL-induzierte ligand-unabhängige als auch ligand-abhängige Proliferation zu hemmen. Die CBL-LINKER-Mutanten zeigten ebenfalls nach Ligandstimulation eine stärkere AKT-Phosphorylierung als CBL-WT in FLT3-exprimierenden Zellen. Immunblot-Analyse von FLT3/CBL-Zellen offenbarte eine länger anhaltende Phosphorylierung von AKT nach FL-Stimulation der FLT3/CBL Δ exon8-Zellen. Eine Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 hob die Aktivierung von AKT an beiden Phosphorylierungsstellen (S473 und T308) auf, die für eine vollständige Aktivierung von AKT notwendig sind. Auch bei den von uns untersuchten AML-Zelllinien wies die CBL-mutierte MOLM-13 die stärkste AKT-Aktivität auf.

Da der PI3K/AKT-Signalweg von großer Bedeutung in den unterschiedlichsten physiologischen Prozessen ist - unter anderem dem Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose,

Proliferation und Transkription - ist es nicht verwunderlich, dass er einen der am häufigsten aberrant regulierten Signalwege in humanen Tumoren darstellt [146]. Der Signalweg ist häufig hyperaktiviert durch erhöhte Aktivierung von RTKs, durch Mutationen oder Genamplifikation, durch aktivierende Mutationen in Proteinen des Signalweges oder durch Deletionen oder herabgesetzter Funktion von Tumorsuppressoren wie Phosphatase und Tensin-Homolog (PTEN) [146-148]. In der normalen Myelopoese greift der PI3K/AKT-Signalweg, bei der Aufrechterhaltung der hämatopoietischen Stammzellen und bei der Bestimmung der Zellreihendifferenzierung, ein. Aktiviertes AKT führt zu einer verringerten Aktivität der FOXO-Transkriptionsfaktoren und das wiederum zu einer verringerten Anzahl an hämatopoietischen Stammzellen [149, 150]. Pharmakologische Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges oder die Expression eines dominant negativen AKT bewirkt eine erhöhte Phosphorylierung des „CCAATT/enhancer binding protein α “ (C/EPB α), das ein entscheidender Transkriptionsfaktor bei der Bestimmung der Zellreihe während der Myelopoese ist [151, 152]. Eine konstitutive AKT-Phosphorylierung wurde auch in einem großen Anteil von AML-Patienten vorgefunden [153-156]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Mäuse mit einem aktivierten PI3K/AKT-Signalweg eine myeloproliferative Krankheit entwickeln, die zu einer AML fortschreitet [157-159]. Sargin *et al.* konnten eine verstärkte MAPK- und AKT-Aktivierung in murinen 32D-FLT3/CBL70Z-Zellen zeigen [87]. CBL-70Z erhöhte auch in MCF-7-Zellen Tamoxifen-induzierte ERK- und AKT-Aktivität [135]. In CBL-Mausmodellen wurde eine verstärkte Aktivierung der Signalwege beschrieben [80, 160, 161]. CBL kann die Aktivität der PI3K positiv regulieren, indem es über Y731 die regulatorische Untereinheit p85 der Kinase zur Zellmembran rekrutiert [62]. Aktivierte PI3K initiiert die Aktivierung von AKT und somit deren Substrate, die Zellüberleben und Zellwachstum regulieren [162]. Der positive Effekt auf Zellwachstum und Apoptose wurde in unseren rezeptor/CBL Δ exon8-exprimierenden Zellen durch die CBL-Y731F-Mutation abgeschwächt - was die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges für die Transformation der CBL-Deletionsmutante verdeutlicht. Eine CBL-knock-out-Maus mit einer RING-Finger-knock-in-Mutante hatte eine erhöhte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors - möglicherweise aufgrund einer erhöhten Phosphorylierung des Y731 von CBL - der Bindungsstelle für die p85-Untereinheit der PI3K [161]. Analysen der Signalwege von Zellen, die CBL-Mutanten aus myeloischen Neoplasien exprimierten, ergaben eine erhöhte Aktivierung der PI3K/AKT- und STAT5-Signalwege in An- und Abwesenheit von Liganden [8, 80, 87]. Eine Deletion der LINKER- und RING-Finger-Domäne des CBL-Proteins führt somit einerseits zu einer Beeinträchtigung der Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität und der Initiierung der Invagination der Plasmamembran, andererseits aber auch zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges über das Tyrosin 731. Mutiertes CBL agiert somit zum Einen als Tumorsuppressor, indem es die Herunterregulierung des Rezeptors

verhindert und CBL-WT inhibiert, was zu einer verlängerten Signalgebung des Rezeptors führt. Zum Anderen als Proto-Onkogen, indem es den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert (Abb. 4.2). Gegenwärtig befinden sich einige Inhibitoren des Signalweges in klinischen Studien [163, 164]. Der in dieser Arbeit verwendete AKT-Inhibitor MK-2206 wurde in einer klinischen Studie in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren mit vielversprechenden Ergebnissen eingesetzt und wird nun in Kombinationsstudien getestet, um den höchstmöglichen klinischen Nutzen zu erreichen. Die Substanz wird aktuell auch in laufenden klinischen AML-Studien verwendet [165].

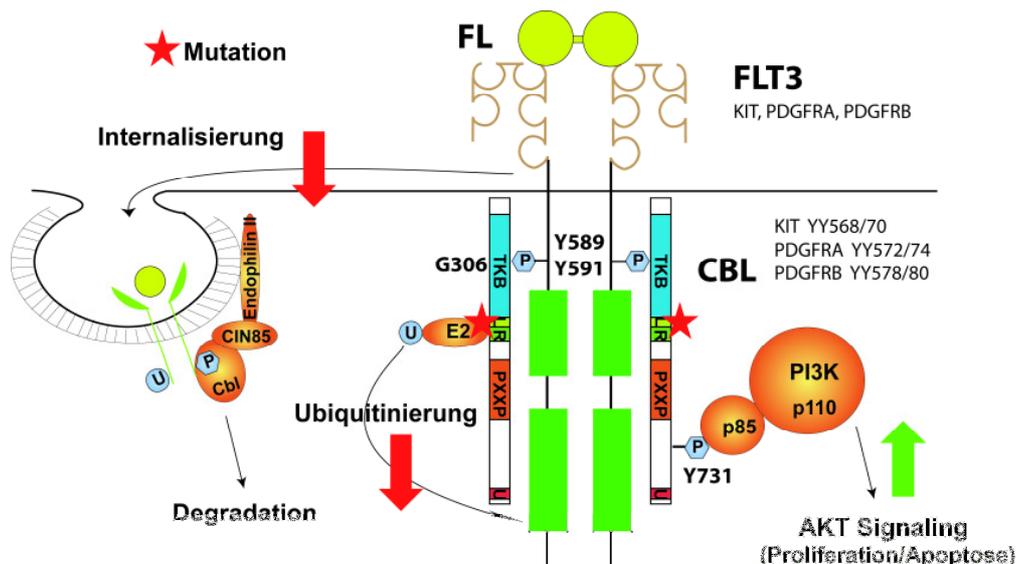


Abb. 4.2: Schema des FLT3-CBL-Signalweges. FLT3-Ligand (FL) bindet an den FLT3-Rezeptor. CBL interagiert über die Tyrosinkinasebindungs-Domäne (TKB, G306) mit den phosphorylierten Tyrosinen 589 und 591 des aktivierten Rezeptors. CBL-WT bindet Ubiquitin-konjugiertes E2-Enzym und markiert den Rezeptor mit Ubiquitin, was die Internalisierung und Degradation des Rezeptors initiiert. CBL Δ exon8-Mutante aktiviert über Tyrosin 731 den AKT-Signalweg.

Um das transformierende Potential des AKT-Signalweges zu bestätigen, verwendeten wir die konstitutiv aktive AKT1-Mutante E17K. Diese Mutation wurde in einigen soliden Tumoren und in T-ALL-Patienten gefunden und war in einem *in vivo*-Mausmodell leukämisch [166, 167]. Ba/F3-Zellen, kotransduziert mit FLT3 und der AKT-Mutante, wuchsen IL-3-unabhängig und verstärkt in Gegenwart von FL. Die Hyperproliferation in Anwesenheit von FL konnte teilweise durch spezifische FLT3-Inhibitoren und komplett durch den AKT-Inhibitor MK2206 verhindert werden. Im Gegensatz zu den durch CBL Δ exon8-transformierten Zellen waren diese Zellen nicht vollständig abhängig von einem funktionsfähigen FLT3-Rezeptor. Dass Zellen, die nur AKT1-E17K exprimierten, IL-3-unabhängig wuchsen, bekräftigte die kritische Rolle von AKT bei der Transformation von Zellen. Das onkogene Potential der E17K-Mutation in der Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) von AKT1 ist auf eine höhere

Bindungsaffinität der Kinase zu den Phosphatidylinositol-Phosphaten und auf eine stärkere Lokalisierung an der Plasmamembran zurückzuführen [168].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung von PI3K/AKT-Inhibitoren eine vielversprechende Therapiestrategie in Patienten mit mutiertem CBL darstellen könnte.

4.3 Therapiestrategien in CBL-mutierten Tumoren

Das höchste Ziel der Leukämieforschung ist es bessere Therapieansätze für Patienten zu entwickeln. Nur ca. 65-10% der AML-Patienten überleben die ersten 5 Jahre nach Behandlung, je nachdem in welcher prognostischen Gruppe sie sich befinden, in der günstigen, intermediären oder schlechten [169, 170]. In vielen klinischen Studien werden neue Therapieansätze getestet. Der überzeugende Erfolg des PTK-Inhibitors Imatinib (Gleevec (STI571), Novartis), bei der Behandlung von CML- und GIST-Patienten [171], hat die Entwicklung vieler anderer molekularer Krebstherapeutika angeregt – z.B. FLT3-Inhibitoren in der AML. Wir haben Zellen mit CBL-Mutationen mit PTK- und AKT-Inhibitoren behandelt. In unserem Ba/F3-Zellmodell konnte die Proliferation in allen rezeptor/CBL-koexprimierenden Zellen durch TKIs vollständig inhibiert werden. Die PTK-Inhibition führte auch zu einer Apoptoseinduktion der Zellen. Unsere Versuche mit einem kinase-inaktiven FLT3 zeigten, dass die CBL-induzierte Proliferation von einem aktivierten Rezeptor abhängig ist. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass durch die heterozygote murine CBL-RING-Finger-Mutante C379A die Population von FLT3-positiven Zellen stark zunimmt und diese Tiere eine FLT3-abhängige schwerwiegende myeloproliferative Erkrankung oder Leukämie entwickeln [160, 172]. Neben einem verstärkten FLT3-Signalweg zeigen die hämatopoietischen Vorläuferzellen der Mäuse auch eine verstärkte KIT-, AKT- und MAPK-Aktivität [160]. Eine Kreuzung mit FLT3-Ligand-knockout-Mäusen verhinderte die Entwicklung von Leukämie [160]. Durch die Behandlung mit dem FLT3-Inhibitor AC220 konnte die FLT3-positiv Zellpopulation stark vermindert und die Tumorentstehung erfolgreich verhindert werden [172]. Diese Ergebnisse zeigen die FLT3-abhängige Transformation durch onkogenes CBL und deuten stark darauf hin, dass für AML-Patienten mit CBL-Mutationen die Verwendung von FLT3-Inhibitoren eine vielversprechende Therapie darstellen könnte. AC220 ist momentan der vielversprechendste FLT3-Inhibitor, der eine hohe Selektivität und gute pharmakologische Eigenschaften zeigt und in klinischen AML-Studien getestet wird [41]. Am weitesten fortgeschritten in klinischen AML-Studien sind die beiden Substanzen Lestaurtinib (CEP-701) und Midostaurin (PKC412), aber bisher mit keinem durchschlagendem Erfolg [42, 43]. AC220 war auch in unseren FLT3/CBL Δ exon8-Zellen der potenteste FLT3-Inhibitor. Die Proliferation der beiden AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 konnte ebenfalls inhibiert

werden. Da wir zeigen konnten, dass der AKT-Signalweg der Mediator CBL-induzierter Transformation ist verwendeten wir auch eine Kombination aus FLT3- und AKT-Inhibitoren. In den CBL-mutierten Ba/F3-Zellen und MOLM-13 zeigte die Kombinationstherapie einen synergistischen Effekt auf die Inhibition der Proliferation.

Nach unseren Ergebnissen wäre die Verwendung von PI3K/AKT-Inhibitoren eine vielversprechende Therapiestrategie in Patienten mit mutiertem CBL - besonders in Kombination mit PTK-Inhibitoren und in RTK-Klasse-III-abhängigen Tumoren.

Das Ubiquitin-System, zu dem CBL als E3-Ubiquitin-Ligase gehört, ist in nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem: Zellzyklus, DNA-Reparatur, Endozytose und Apoptose. So ist nicht verwunderlich, dass das Ubiquitin-System bei vielen Tumoren dereguliert ist [173]. Dabei stellen besonders die Ubiquitin-Ligasen ein wichtiges therapeutisches Ziel dar, da viele von ihnen als Onkogene beschrieben wurden. Neben CBL ist vor allem MDM2 eine sehr bekannte E3-Ubiquitin-Ligase und Onkogen. Sie ist die Ligase des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53 [174, 175]. Für einige E3-Ligasen ist beschrieben, dass sie eine entscheidende Rolle in der Regulation der Eigenschaften von Stammzellen spielen [176-178]. Daher könnte die Verwendung von E3-Ligase-Inhibitoren ein erfolgsversprechender Therapieansatz sein, um auch die Krebs-Stammzellen zu eliminieren. Es ist eine generell akzeptierte Annahme, dass Leukämien aus hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen entstehen [45]. Die Bedeutung von CBL-Mutationen in der Entstehung von Leukämien verbindet CBL-Proteine auch mit der Stamm- und Vorläuferzellen-Homöostase. Tiermodelle in denen myeloproliferativen Erkrankungen, durch den Verlust von CBL oder den Knock-in von CBL-Mutanten, entstehen, bekräftigen diese Verbindung [160, 179]. Im Zusammenhang mit der Neurogenese wurde gezeigt, dass CBL PDGF-abhängiges Überleben von neuronalen Vorläuferzellen negativ reguliert [180]. CBL und CBL-b regulieren die asymmetrische Aufteilung von EGFR in neuronalen Stammzellen, was für deren Selbsterneuerungs-Mechanismus von Bedeutung ist [181]. Weitere Studien sind nötig, um die Rolle von CBL im Zusammenhang mit Stammzellen aufzuklären und um die entscheidenden PTKs zu identifizieren, die CBL in diesem Zusammenhang reguliert. Eine tiefere Analyse, der im Embryonalstadium lethalen CBL/CBL-b-Doppelknockout-Maus [182], wäre aufschlussreich. Es gibt zwei hauptsächliche Strategien die Funktion der Ligasen für therapeutische Zwecke anzugreifen. Kleinmolekulare Inhibitoren, die zum Einen die katalytische Aktivität des Enzyms oder zum Anderen die Interaktion zwischen der Ligase und spezifischen Substraten blockieren. Der MDM2-Ligase-Inhibitor HLI98 verhindert die Ubiquitinierung von p53, indem es auf die RING-Finger-Domäne des Enzyms abzielt. Dagegen blockieren die kleinmolekularen Inhibitoren Nutlins und RITA die Interaktion zwischen p53 und MDM2 [183-185]. Die letzteren beiden sind schon vielversprechend in präklinischen Studien und induzieren p53-abhängige Apoptose in humanen Krebszellen

[184, 185]. Zukünftig werden bestimmt weitere Inhibitoren gegen andere E3-Ligasen, unter anderem CBL entwickelt werden. Für zukünftige Studien könnte die Verwendung von CBL-Inhibitoren neben PTK/AKT-Inhibitoren eine weitere vielversprechende Therapiestrategie in CBL-mutierten Tumoren darstellen.

4.4 Interaktion von CBL mit der juxtamembranösen Domäne von FLT3

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Interaktionsstellen zwischen FLT3 und dem onkogenen CBL zu charakterisieren. Für viele RTKs sind direkte Interaktionsstellen von CBL beschrieben. Im Falle von vielen RTKs außerhalb der Klasse-III-Familie, z.B. EGFR, ERBB2 und RON sind die CBL-Bindungsstellen am C-Terminus der Rezeptoren gefunden worden [136, 186, 187]. Für die Rezeptoren KIT, PDGFRA und c-MET wurde gezeigt, dass Tyrosine in der JM-Domäne direkte CBL-Bindungsstellen darstellen [188-192].

Zur Analyse der Interaktion von FLT3 und CBL wurden einzel- und kombinierte Y-zu-F-Mutationen der Tyrosine 589 und 591 von FLT3 verwendet, die den bekannten CBL-Bindungsstellen in den nahe verwandten Rezeptoren KIT (Y568 und Y570) und PDGFRA (Y572 und Y574) entsprechen. Auch entspricht die Sequenz der Aminosäuren 586-589 von FLT3 dem beschriebenen CBL-Bindungsmotiv D(N/D)XpY [193]. In einer Publikation unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Y589 und Y591 entscheidend für die ligand-abhängige Aktivierung von FLT3 und für das transformierende Potential von FLT3-Mutanten sind [194]. Die etablierten Zelllinien mit den FLT3-Y-zu-F-Mutationen und CBL Δ exon8 hatten eine geringere Proliferationsrate und einen geringeren Apoptoseschutz. Die Doppelpunktmutante YY589/591FF wies einen noch stärkeren negativen Effekt bezüglich der Apoptose auf als die Einzelmутanten. Jedoch war der Phänotyp der CBL-Mutante durch das Einbringen der Mutationen in die JM-Domäne von FLT3 nicht vollständig aufzuheben. Das deutet auf das Vorhandensein von weiteren CBL-Bindungsstellen hin. Für einige Rezeptoren, einschließlich KIT, ist eine indirekte Bindung von CBL durch das „growth-factor binding protein 2“ (Grb2) beschrieben worden - für KIT auch eine weitere direkte Bindungsstelle Y936 [188, 195-198]. Auch die FLT3-Internalisierung war in den FLT3Y589F/CBL Δ exon8-kotransduzierten Zellen verstärkt - verglichen mit den FLT3-WT/CBL Δ exon8-Zellen. Die „loss of function“-Mutation G306E in der PTB-Domäne von CBL verhinderte vollständig die CBL-Mutante-induzierte Hyperproliferation von FLT3-exprimierenden Zellen in Gegenwart von FL, hob die Verzögerung der Internalisierung komplett auf und führte nach Zytokin-Entzug zu einer deutlich höheren Apoptoserate.

Die Tatsache, dass CSF1R als einziges Mitglied der RTK-Klasse-III nur ein schwaches transformierendes Potential in Kooperation mit der CBL-Mutante zeigt, könnte durch das Fehlen des zum Y591 von FLT3 analogen Tyrosins in der CBL-Interaktionsstelle begründet sein. In der Literatur wurden verschiedene CBL-Bindungsmotive mit verschiedenen kritischen Aminosäuren an verschiedenen Positionen zum phosphorylierten Tyrosin in Zielproteinen beschrieben [188, 193, 199]. Masson *et al.* zeigten, dass durch eine Substitution des Isoleucins 571 von KIT die Bindung von CBL an den Rezeptor verhindert wird. Die CBL-KIT-Interaktion ist damit von dieser Aminosäure an Position +3 von pY568 abhängig [188]. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass bei der KIT-Doppelmutante YY568/570FF CBL nach SCF-Stimulation nicht phosphoryliert wird. Das zweite Tyrosin in der JM-Domäne könnte somit auch für das onkogene Potential von CBL nötig sein.

Es wurde gezeigt, dass sowohl Y589 und Y591 von FLT3 als auch die homologen Tyrosine der anderen RTK-III als Interaktionsstellen vieler Signalproteine dienen, z.B.: „SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2“ (SHP-2), „src family kinases“ SFKs und „lymphocyte adaptor protein“ (LNK) [200, 201]. Die Abbildung 4.3 zeigt Signalproteine die mit der JM-Domäne – hauptsächlich mit Y589 und Y591 - von FLT3 interagieren und nachfolgende Signalwege entweder inhibieren oder aktivieren. Aminosäuresubstitutionen der zu Y589 und Y591 homologen Tyrosine der anderen RTK-III führten zu einer reduzierten Kinase-Aktivität der Rezeptoren [196, 202-205]. Y561 von CSF1R und Y568 von KIT binden an SRC. Y581 von PDGFRB bindet STAT5 und spielt eine Rolle bei der Interaktion mit SRC [192, 196, 204, 206, 207]. Die Tyrosine 589 und 591 von FLT3 sind ebenfalls SRC-Bindungsstellen und aktivieren in FLT3-ITD über Src STAT5 [194, 208]. Y591 wurde auch als Bindungsstelle für „suppressor of cytokine signaling 6“ (SOCS6) identifiziert, das den Abbau des Rezeptors induziert [209]. Die beiden Tyrosine spielen somit eine große Rolle bei der Aktivierung vieler rezeptor-vermittelter Signalwege.

Analysiert man die Homologie der Proteinsequenzen aller RTKs, so werden die Rezeptoren in ihren jeweiligen Familien zusammengefasst. Ebenso die RTK-Klasse-III, die sich insbesondere über die JM-Domäne von den anderen Rezeptoren abgrenzt (Abb. 3.3.1 A). Die Sequenz der RTK-Klasse-III JM-Domänen ähnelt stark der WW-Domäne - einer der bedeutendsten Protein-Protein Interaktionsmodule in biologischen Systemen [210]. WW-Domänen sind in vielen Signal- und Adaptorproteinen enthalten und bestehen aus einer 20-22 langen Aminosäuresequenz, die von zwei Tryptophanen (W) flankiert werden [211]. WW-Domänen werden durch Tyrosin-Phosphorylierungen reguliert und vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, indem sie prolinreiche Motive binden [212, 213]. Ebenso wie WW-Domänen bilden die JM-Domänen der RTK-III-Rezeptoren - auch FLT3, dem ein W fehlt - 3 anti-parallel liegende β -Faltblätter [210]. Durch WW-Domänen vermittelte Signalwege sind mit vielen humanen Erkrankungen – z.B. Alzheimer und Krebs - in Verbindung gebracht

worden [213]. Ebenso sind viele Mutationen in den JM-Domänen der RTK-Klasse-III-Rezeptoren in Tumoren beschrieben worden, was die kritische Rolle dieser Domäne in der Funktion der Rezeptoren verdeutlicht. KIT-Mutationen sind die häufigsten Alterationen in gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und betreffen dort meist die JM-Domäne [214]. In myeloischen Neoplasien, einschließlich AML, sind neben FLT3 auch aktivierende Mutationen der JM-Domäne von KIT und CSF1R beschrieben worden [215-217]. Wie bei FLT3 treten auch ITD-Mutationen von KIT bei AML und GIST-Patienten auf [218-221].

Die JM-Domäne der RTK-Klasse-III dient als Interaktionsstelle für viele Signalproteine, die vorliegende Arbeit gibt Aufschluss darüber, dass eines davon CBL ist. Neben der Funktion als Interaktionsplattform wird der JM-Domäne auch eine autoinhibitorische Funktion bei der Rezeptoraktivierung zugesprochen. Beide Funktionen erklären die Häufigkeit und breite Verteilung von RTK-III-JM-Mutationen in humanen Tumoren.

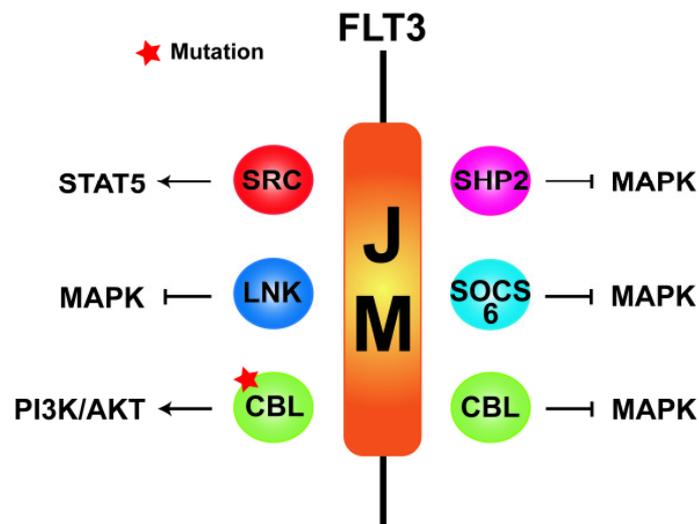


Abb. 4.4: Signalproteine als Interaktoren von FLT3. Signalproteine SRC, LNK, CBL, SHP2, und SOCS6 interagieren mit der juxtamembranösen (JM)-Domäne von FLT3 und aktivieren bzw. inhibieren Signalwege.

4.5 Rolle der juxtamembranösen Domäne in der Signalübertragung von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Neben der biologischen Signifikanz von JM-Mutationen hat diese Rezeptordomäne auch eine autoinhibitorische Funktion in der Rezeptoraktivierung, insbesondere bei RTK-Klasse-III-Rezeptoren [107, 222]. Mutationen in der JM-Domäne der RTK-Klasse-III-Rezeptorfamilie, die die Autoinhibition aufheben und damit die Rezeptoren konstitutiv aktivieren, werden häufig in Tumoren gefunden [223]. Da wir ein deutlich schwächeres Wachstum der RTK-Klasse-III-Rezeptoren im Vergleich zu den anderen Rezeptoren nach Ligandstimulation

gesehen haben, wollten wir den Einfluss der JM-Domäne auf die Signalgebung und Proliferation durch die Verwendung von chimären FLT3/EGFR-Rezeptoren untersuchen. Die JM-Domäne der RTK-Klasse-III interagiert mehrmals mit der TKD-Domäne, z.B. mit der Aktivierungsschleife, und stabilisiert eine autoinhibierte Konformation des Rezeptors. Die Aktivierung des FLT3-Rezeptors ist ein stufenweiser Prozess, der prinzipiell für alle RTK-Klasse-III-Rezeptoren beschrieben wurde [224]. Der FLT3-Ligand bindet an die extrazelluläre Domäne, führt zur Dimerisation der Rezeptor-Homodimere und einer Annäherung der zyttoplasmatischen Domänen. Es kommt zu einer Transphosphorylierung der Tyrosine in der JM-Domäne. Durch die Tyrosinphosphorylierungen verliert die JM-Domäne ihre cis-autoinhibitorische Funktion, was die vollständige Aktivierung der Kinase bewirkt [21, 225]. Chimäre Rezeptoren wurden hauptsächlich verwendet, um die Signalwege neu entdeckter Rezeptoren zu untersuchen, solange deren Liganden noch nicht kloniert waren. So wurden z.B. die Signalwege von KIT und TRK mit chimären Rezeptoren erforscht, die extrazellulär aus EGFR und ab der TM-Domäne aus dem anderen Rezeptor bestanden [226-228]. Auch die biologische Aktivität von Mutanten der zyttoplasmatischen Domäne von PDGFR wurde mit EGFR/PDGFR-Chimären untersucht [229]. Die Signalwege des murinen FLT3-Rezeptors wurden mit einem CSF1R/FLT3-chimären Rezeptor analysiert, bevor der FLT3-Ligand kloniert war [230, 231].

Der chimäre Rezeptor EF, der extrazellulär aus dem EGFR und intrazellulär ab der JM-Domäne aus FLT3 besteht, wies eine schwächere Proliferation auf als EGFR. Andererseits zeigte der entgegengesetzte chimäre Rezeptor FE eine stärkere Proliferation als FLT3. Die Unterschiede in der Proliferation könnten mit der autoinhibitorischen Funktion der JM-Domäne von FLT3 zusammenhängen. Wir konnten bereits zeigen, dass die JM-Tyrosine 589 und 591 von FLT3 entscheidend sind für die ligand-abhängige Aktivierung des Rezeptors und für das transformierende Potential von FLT3-Mutanten [194]. Für KIT wurde gezeigt, dass durch die Rezeptoraktivierung zunächst die JM-Tyrosine phosphoryliert werden. Deren Phosphorylierung gibt die katalytische Domäne frei und trägt auch hauptsächlich zur Aktivierung der TKD bei [232]. Auch die Aktivierung der Signalproteine der RTKs variierte. Die Ligandstimulation führte in den EGFR- und EF-exprimierenden Zellen zu einer starken Phosphorylierung der Signalproteine AKT, MAPK und STAT5. Dass die AKT-Phosphorylierung in EF-exprimierenden Zellen im Vergleich etwas schwächer war, könnte auf die inhibierende JM-Domäne von FLT3 zurückzuführen sein. Der Ligand-stimulierte FLT3-Rezeptor aktivierte AKT und MAPK, aber kein STAT5. Unsere Gruppe konnte bereits zeigen, dass STAT5 nicht durch den FLT3-WT-Rezeptor, sondern nur durch einen ITD-Rezeptor aktiviert wird [233]. Die Tyrosine 589 und 591 dienen dabei als eine verborgene Bindungsstelle, die erst durch die Tandemduplikation der ITD freigelegt wird [234]. Ähnliches könnte die STAT5-Aktivierung in EF-Zellen erklären. Durch die Verbindung mit der TM-

Domäne von EGFR könnten die JM-Tyrosine für die Interaktion freiliegen. Im Gegensatz zu der RTK-Klasse-III, bei denen JM-Tyrosine als STAT5-Bindungsstelle beschrieben wurden, dient bei EGFR die phosphorylierte Aktivierungsschleife als Bindungsstelle für die SH2-Domäne von STAT5 [235, 236]. Da auch die Aktivierung des FE-Rezeptors keine STAT5-Phosphorylierung zu Folge hatte, liegt die Aktivierungsschleife in dem chimären Rezeptor vielleicht in einer anderen Konformation vor. Auch die Liganden FL und EGF unterscheiden sich in Struktur und Art der Rezeptorbindung und nehmen Einfluss auf die Konformation und Aktivierung des Rezeptors [237-244]. Im Gegensatz zu RTK-III-Rezeptoren hat nicht die JM-Domäne, sondern der C-Terminus von EGFR autoinhibitorische Funktionen [245, 246]. Ebenso werden auch nur C-terminale Tyrosine des EGFR autophosphoryliert und nicht Tyrosine der JM-Domäne wie bei RTK-Klasse-III-Rezeptoren [247].

Die JM-Domäne des EGFR stabilisiert den asymmetrischen Rezeptordimer und begünstigt damit die Rezeptoraktivierung [245, 248]. Ihr wird eine aktivierende Rolle zugeschrieben. Mutationen innerhalb der JM-Domäne führten zu einem Verlust der EGFR-Aktivierung [248, 249]. Die Kristallstruktur des HER4-Rezeptors - ein naher Verwandter des EGFR - zeigte, dass der C-terminale Teil der JM-Domäne eine Interaktion mit beiden Kinasedomänen des asymmetrischen Dimers eingeht und essentiell für die Kinaseaktivierung ist [250]. Diese Interaktion wird auch für den EGFR angenommen. Das Fehlen bzw. Vorhandensein dieser Interaktion könnte die Inaktivität der chimären EF-TC- und FE-TC-Rezeptoren erklären [245]. Bei vielen anderen Rezeptoren ist die Autoinhibition und Kinase-Aktivität abhängig von Tyrosinen in der Aktivierungsschleife [13, 251-259]. Die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife der Kinase spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Stabilität der aktivierten Konformation der meisten Kinasen [260]. Eine Ausnahme ist die EGFR-Familie: Die EGFR-TKDs bilden ein asymmetrisches Dimer. Durch die Konformationsänderungen werden die cis-autoinhibitorischen Interaktionen des Monomers gelöst und die aktivierte Konformation wird ohne Phosphorylierung der Aktivierungsschleife eingenommen [261].

Generell dient die Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosine zwei Zwecken: Die Stimulation der intrinsischen katalytischen Aktivität des Rezeptors und die Bildung von Interaktionsstellen für Signalproteine mit einer Src-Homologie-2 (SH2) oder Phosphotyrosinbindungs-Domäne (PTB) [262]. Ein solches Protein ist c-CBL, das mit der PTB-Domäne an den Rezeptor bindet und mit der Prolin-reichen Domäne an die SH2- oder SH3-Domänen anderer Signalmoleküle.

Wir haben gezeigt, dass CBL Δ exon8 zu einer starken Transformation von FLT3-WT, jedoch zu einer schwachen Transformation von EGFR-WT-exprimierenden Zellen führt. Die verstärkte Kooperation ist auf die JM-Domäne von FLT3 zurückzuführen. Das konnte durch Versuche mit den chimären Rezeptoren bestätigt werden. Das transformierende Potential der CBL-Mutante wurde in den FE-Zellen im Vergleich zu den FLT3-Zellen schwächer, was

mit dem Fehlen des CBL-Bindungsmotivs um Y589 und Y591 des FLT3-Rezeptors erklärt werden kann. Dieser Rezeptor hat nur das C-terminale Y1045 des EGFR als direkte Bindungsstelle zur Verfügung [263]. Die EF/CBL Δ exon8-Zellen zeigten eine stärkere ligand-induzierte Proliferation und eine geringere Apoptoserate als EGFR/CBL Δ exon8-Zellen verglichen mit dem jeweiligen Rezeptor exprimierenden Zellen, da der EF-Rezeptor die JM-Domäne von FLT3 als CBL-Interaktionsstelle besitzt. Die Proliferation aller RTK/CBL Δ exon8-Zellen konnte in Anwesenheit der Liganden durch TKIs inhibiert werden. Der spezifische FLT3-Inhibitor der zweiten Generation AC220 bindet an das Asp-Phe-Gly (DGF)-Motiv am amino-terminalen Ende der Aktivierungsschleife und hemmte alle Rezeptoren mit FLT3-TKDs [264, 265]. Erlotinib bindet an die ATP-Bindungstasche von EGFR, erwies sich jedoch als weniger spezifisch, da er auch in höheren Konzentrationen die FLT3-TKD inhibierte [266]. Die Aktivierung von AKT und das transformierende Potential durch das onkogene CBL waren in den FLT3-WT-Zellen am stärksten. Das schwächere transformierende Potential von CBL Δ exon8 mit dem EF-Rezeptor im Vergleich zu FLT3-WT zeigt auf, dass das onkogene Potential von CBL nicht gänzlich durch die Bindung an die JM-Domäne bestimmt wird. Was mit unseren Ergebnissen mit den JM-Tyrosin-Mutanten von FLT3 im Einklang ist.

Durch die chimären Rezeptoren konnten wir zeigen, dass die JM-Domäne von FLT3 einen negativen Einfluss auf die Signalübertragung des Rezeptors und Proliferation nimmt. Allerdings spielen auch Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) bei der Regulierung der RTK-Aktivität eine entscheidende Rolle. Diese besitzen auch eine gewisse RTK-Spezifität [267-269]. Ebenso spielt die transmembranöse Domäne der RTKs eine aktive Rolle bei der Signalübertragung, indem sie zu der Stabilität des Rezeptordimers beiträgt [270]. Um dem Beitrag der unterschiedlichen intrazellulären Domänen bei der Signalübertragung genauer nachzugehen, müssten weitere chimäre Rezeptoren erstellt und deren biologische Aktivität untersucht werden. Bessere Erkenntnisse über die einzelnen Rezeptordomänen würden auch bei der Entwicklung von zukünftigen Therapeutika helfen.

4.6 FLT3-Mutationen in der ALL und AML

4.6.1 FLT3-TKD-Mutation in ALL

FLT3 ist in 100% der B-Zell-ALL, in 27% der T-Zell-ALL und in 89% der AML überexprimiert [271]. Die häufigsten Mutationen sind „internal tandem duplications“ (FLT3-ITD) und Mutationen in der Aktivierungsschleife der zweiten Tyrosinkinase (FLT3-TKD). Häufig werden sie in der AML und mit einer geringeren Frequenz in der ALL vorgefunden [30, 272]. Im Rahmen einer von mir betreuten Doktorarbeit wurde der Phänotyp von FLT3-TKD-

Mutationen untersucht. Die TKD-Mutationen zeigten einen schwachen „gain of function“-Phänotyp und gingen im Rezidiv von AML-Patienten deutlich eher verloren als ITD-Mutationen [273]. Da es bisher kein humanes Zellmodell für FLT3-TKD-Mutationen gab, wurden Leukämiezelllinien im Labor für Leukämiediagnostik der Universität München und in Kooperation mit der DSMZ auf das Vorhandensein von TKD-Mutationen gescreent. Im Gegensatz zur AML sind FLT3-TKD-Mutationen in der ALL häufiger als FLT3-ITD-Mutationen, was durch unser Screening in den leukämischen Zelllinien bestätigt wurde. Denn wir fanden in einer Philadelphia-Chromosom-(Ph)-positiven ALL-Zelllinie eine neuartige TKD-Mutation (D839N) aber keine in den AML- oder CML-Zelllinien. Diese Mutation in der SD-1-Zelllinie befindet sich in der Aktivierungsschleife der zweiten TKD. Neben der JM-Domäne der zweite Hotspot für Mutationen in FLT3.

Eine Expression von Ph führt zu der BCR-ABL1-Translokation, die in 20% aller ALL-Patienten vorkommt und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [274, 275]. Diese Patienten werden mit dem ABL-Inhibitor Imatinib behandelt. Aber im Gegensatz zu Ph+ CML ist die Behandlung mit Imatinib in ALL weniger effektiv [276]. Das spiegelt sich in dem höheren IC_{50} -Wert für Imatinib in der ALL-Zelllinie SD-1 im Vergleich zur CML-Zelllinie K562 bei unseren Inhibitionsversuchen wider. Für SD-1 wurde eine Resistenz gegenüber Imatinib zuvor gezeigt, aber bisher keine weitere Mutation beschrieben [277]. Es ist bekannt, dass neben der Bildung von Mutationen in der Kinasedomäne von BCR-ABL1 auch die Aktivierung von anderen Signalwegen zu einer Resistenz gegenüber Imatinib führen können [278]. Im Falle der SD-1-Zellen wäre eine aberrante Aktivierung des FLT3-Signalweges durch die D839N-Mutation eine einleuchtende Erklärung für die Imatinib-Resistenz. Zudem zeigte eine Studie von Grundler und Kollegen, dass FLT3-TKD eine lymphoide Neoplasie im murinen Knochenmarkstransplantationsmodell induzierte und somit leukämisches Potential in B-Zellen besitzt [279]. Mutationen der analogen Aminosäure in KIT (D820) wurden auch bei Mastzellerkrankungen und gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) beschrieben und mit einer Imatinib-Resistenz in Verbindung gebracht [280, 281]. Die Ph+ ALL-Zelllinie KCL-22 zeigt ebenfalls eine Resistenz gegenüber Imatinib, die wahrscheinlich auf die zusätzliche aktivierende PI3K α -E545G-Mutation zurückzuführen ist [277]. PI3K α -E545-Mutationen wurden in soliden Tumoren gefunden und führen zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalweges [282]. Wir untersuchten, ob die FLT3-D839N-Mutation der SD-1-Zelllinie zum transformierenden Potential beisteuert. Das Wachstum der SD-1-Zellen wurde jedoch weder negativ durch FLT3-Inhibition noch positiv durch FL beeinflusst, was einen entscheidenden Beitrag des mutierten FLT3-Rezeptors zur Transformation der Zellen widerlegte. In Ba/F3-Zellen führte der FLT3-D839N-Rezeptor jedoch zu einem zytokin-unabhängigen und verstärkten Wachstum in Gegenwart von FL. Neben dem Effekt auf die Proliferation der Zellen verlieh die Mutation auch eine Resistenz gegenüber Apoptose. Dieses

transformierende Potential in den Ba/F3-Zellen zeigt, dass es sich bei D839N um eine „gain of function“-Mutation handelt und durchaus zum leukämischen Phänotyp beitragen könnte. Die Zellen mit dem mutierten Rezeptor zeigten eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors und der Signalproteine MAPK und AKT, die durch Stimulation mit FL verstärkt wurde. BCR-ABL selbst aktiviert zahlreiche Signalwege, unter anderem auch MAPK und PI3K [283, 284]. Die stärkere Aktivierung des AKT- und MAPK-Signalweges durch die zusätzliche TKD hatte aber keinen verstärkten biologischen Effekt in unseren BCR-ABL-Zellen. Die vollständige Transformation beruht somit hauptsächlich auf der STAT5-Aktivierung durch BCR-ABL, was als der Mediator der BCR-ABL-Transformation beschrieben ist [285-290].

Die FLT3-D839N-Mutation vermittelte auch keine Resistenz der BCR-ABL-Zellen gegenüber Imatinib. Die doppeltransduzierten Zellen wuchsen sogar etwas langsamer ohne Zytokin als die BCR-ABL-exprimierenden Zellen. Erstaunlicherweise waren die FLT3-D839N-Zellen selbst sensitiv gegenüber Imatinib. In der Regel führen Mutationen in Kinasedomänen zu einer Resistenz gegenüber TKIs. Jedoch sind neben Mutationen in der JM-Domäne von KIT - z.B. Mutationen von V560 - auch die Mutationen N882K, Y823D und N822K der Aktivierungsschleife der TKD2 als sensitiv gegenüber Imatinib beschrieben worden [291, 292]. Gegenüber FLT3-WT wurde noch keine Imatinib-Sensitivität beschrieben - allerdings gegen alle anderen Rezeptoren der RTK-Klasse-III [293-295]. CSF1R wurde zunächst als nicht sensitiv beschrieben [293]. Eine Studie untersuchte die Unterschiede zwischen den Imatinib-bindenden Kinasen und FLT3 [296]. Dabei fanden sie mit der AS F691 von FLT3 den einzigen signifikanten Unterschied in der Kristallstruktur der Imatinib-Bindungsregion. In allen anderen Kinasen befindet sich an dieser Stelle nicht ein Phenylalanin sondern ein Threonin. Ein Aminosäureaustausch zum T691 machte FLT3 sensitiv gegenüber Imatinib und erklärt die fehlende Sensitivität des FLT3-WT mit einer sterischen Hinderung durch F691. Da erst durch Phosphorylierung der Aktivierungsschleife die ATP-Bindungstasche von FLT3 offenliegt könnte eine mögliche Konformationsänderung durch D839N die Imatinib-Bindung ermöglichen. Dass beide Kinasen von derselben Substanz inhibiert werden können zeigen die zwei TKIs Dasatinib und Ponatinib. Beide haben als primäres Ziel BCR-ABL, inhibieren aber auch FLT3-ITD [297, 298]. Ponatinib wird gegenwärtig in klinischen AML-Studien verwendet und zeigt auch Wirksamkeit gegen FLT3-ITD mit zusätzlichen Punktmutationen [299, 300].

Weg vom Zellmodell untersuchten wir auch primäre Ph⁺ Proben auf FLT3-TKD-Mutationen. Sowohl bei den 30 Ph⁺ ALL-Patienten als auch zuvor in der zweiten Ph⁺ ALL-Zelllinie SUP-B15 konnten wir keine weitere TKD-Mutation entdecken. Auch Taketani und Kollegen wurden bei einem FLT3-D835/I836-Mutationsscreen bei kindlichen ALL-Patienten mit 6 BCR-ABL⁺ Proben nicht fündig [114]. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass FLT3-TKD-Mutationen nur eine deutlich untergeordnete Rolle in BCR-ABL⁺ ALL spielen und wenig zum

leukämischen Potential beitragen. Aber mit der SD-1-Zelllinie steht nun ein humanes Zellmodell zur Verfügung, um FLT3-TKD-Mutationen zu untersuchen.

4.6.2 FLT3-TKD-Mutation in CBF-Leukämien

Eine Untergruppe der akuten myeloische Leukämie, in der sowohl FLT3- als auch CBF-Mutationen häufig auftreten ist die „core-binding factor“- (CBF)-AML, gekennzeichnet durch die Chromosomentranslokationen t(8;21) und inv(16)/t(16;16) und die daraus resultierenden Fusionsgene CBFβ/MYH11 und RUNX1/RUNX1T1 [8, 301-305]. Diese Gruppe betrifft 15-20% der de-novo-AML-Fälle von Erwachsenen und ist mit einer besseren Prognose assoziiert [117, 118]. Die Proteine CBFβ und RUNX1 bilden den DNA-bindenden CBF-Transkriptionsfaktor, der essentiell für die normale Hämatopoese ist [306]. Durch die Fusionsproteine kommt es zu einer Hemmung der CBF-Zielgene, was einen Differenzierungsblock und eine Störung der Hämatopoese zur Folge hat. Die Fusionsgene alleine sind aber nicht ausreichend, um Leukämie auszulösen. Neben dem Differenzierungsblock ist, nach dem „two hit“-Modell in der Leukämie, zumindest noch eine weitere Genmutation nötig, die einen proliferativen Vorteil bewirkt [307-309]. *FLT3*, *KIT* und *RAS* sind solche Gene und werden auch häufig in CBF-AML-Patienten mutiert gefunden. Um die 92% der AML-Patienten mit inv(16) besitzen entweder eine aktivierende Ras- oder RTK-Mutation [310, 311]. Im Rahmen einer anderen Doktorarbeit wurde durch Exomsequenzierung von CBF-AML-Patienten im Labor für Leukämiediagnostik die FLT3-Mutation N676K gefunden [119]. Aminosäure 676 befindet sich in der ATP-Bindungsdomäne der TKD1. Mutationen wurden bisher nur in Zusammenhang mit einer FLT3-ITD und als ein spätes Event beschrieben, das ITD-exprimierenden Zellen eine Resistenz gegenüber TKIs verleiht [123, 312, 313]. Wir haben die Mutation jeweils in der Erstdiagnose- und Remissionsprobe gefunden. Das weist darauf hin, dass es sich dabei um eine leukämie-assoziierte Mutation handelt. Dass die Mutation fast ausschließlich mit inv(16)-AML assoziiert ist und die meisten FLT3-Mutationsscreens auf das Detektieren von FLT3-ITD und FLT3-TKD2-Mutationen begrenzt sind, erklärt, dass die FLT3-N676K-Mutation bisher unentdeckt blieb [303, 314, 315]. Wir konnten zeigen, dass der FLT3-N676K-Rezeptor Ba/F3-Zellen transformiert, ihnen zytokin-unabhängiges Wachstum und Apoptoseschutz verleiht. Immunblots konnten zeigen, dass das transformierende Potential auf die verstärkte Aktivierung der MAPK- und AKT-Signalwege zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass N676K eine aktivierende Mutation ist und somit zusammen mit CBF-Translokationen zur Entstehung der Leukämie beitragen könnte. Wie bereits beschrieben, vermittelt der Austausch des Asparagins 676 eine Resistenz von FLT3-ITD-exprimierenden Zellen

gegenüber spezifischen FLT3-Inhibitoren. Diese Resistenz ist im Zusammenhang mit einer FLT3-ITD deutlich stärker ausgeprägt als ohne und beruht wohl auf eine Veränderung der ATP-Bindungsstelle - dem Angriffspunkt der meisten Inhibitoren. Auch bei GIST-Patienten sind Imatinib-Resistenzen beschrieben, die auf einer sekundären KIT- oder PDGFRA-Mutation beruhen. Dabei handelt es sich jeweils ebenso um einen Aminosäureaustausch in der ATP-Bindungstasche der TKD1 oder TKD2 [219, 281, 292, 316-318]. Trotz einer leichten Resistenz gegenüber FLT3-Inhibitoren im Vergleich zu ITD-Mutationen, könnten CBF-AML-Patienten mit einer FLT3-N676K-Mutation von einer Behandlung mit diesen Substanzen profitieren.

4.6.3 Verwendung von HDAC-Inhibitoren in FLT3-ITD-Zellen

FLT3-ITD-Mutationen bei AML-Patienten sind mit schlechter Prognose und erhöhten Rückfallquoten verbunden [319-321]. Im Gegensatz zum WT-Rezeptor aktiviert der ITD-Rezeptor STAT5, da durch die Duplikation die Konformation der JM-Domäne verändert wird und die Tyrosine 589 und 591 als Bindungsstellen zugänglich werden [234]. Durch die ITD-Mutation wird auch die autoinhibitorische Funktion der JM-Domäne aufgehoben und die Interaktion mit der Aktivierungsschleife zerstört. Der Rezeptor liegt dadurch in der katalytisch aktiven Konformation vor [107, 322, 323]. Gegenwärtig werden viele FLT3-Inhibitoren in klinischen Studien verwendet, aber eine Monotherapie führt wegen Resistenzentwicklungen und einer hohen Rückfallrate nicht zu einer Heilung [324, 325]. Daher werden zurzeit auch Kombinationen von FLT3-Inhibitoren mit anderen Substanzen getestet, um die Resistenzen zu umgehen [43, 326, 327]. Eine Substanzklasse sind Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi). Vielversprechende epigenetische Krebs-Therapeutika, die sich auf Genexpression und Signalgebung auswirken, indem sie die Acetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen induzieren. HDACi wirken gegen die in Tumoren häufig vorgefundene Deregulierung von HDAC-Enzymen. Sie verändern die Funktionen und den Umsatz von Proteinen. Panabinstat (LBH589) wird gegenwärtig in klinischen Studien untersucht als ein neuartiger auf Hydroxyamidsäure basierender HDACi, der zink-abhängige HDAC-Enzyme inhibiert und einer der wirksamsten Inhibitoren dieser Substanzklasse ist [328]. Jedoch ähnlich wie FLT3-Inhibitoren ist er als Monotherapie weniger effektiv als in Kombination mit anderen Substanzen. In hämatologischen Tumoren wurden jedoch gute Ergebnisse erzielt [329, 330]. In unserem Zellmodell führte die Kombination aus dem FLT3-Inhibitor AC220 und LBH589 zu einer verstärkten Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion. Es wurde gezeigt, dass LBH589 die Expression des E2-Enzym UBCH8 („ubiquitin-conjugating enzyme H8“) hochreguliert, was zu einer Polyubiquitinierung des FLT3-ITD und schließlich zu einem

proteasomalen Abbau führt [331]. Dieser induzierte Proteinabbau durch HDACi macht sie zu vielversprechenden Substanzen in Kombination mit FLT3-Inhibitoren. Unsere Kooperationskollegen konnten zeigen, dass die gemeinsame Verwendung von Panabinostat mit den FLT3-Inhibitoren Compound 102, AC220 und PKC412 eine synergistische Apoptoseinduktion in den FLT3-ITD-positiven AML-Zelllinien MV4-11 und MOLM-13 auslöst. Höhere Konzentrationen von LBH589 reduzierten die Proteinmenge des FLT3-ITD-Rezeptors, was von einem Rückgang der STAT5-Phosphorylierung und erhöhter Caspase-3-Aktivierung begleitet wurde. In Kombination mit dem FLT3-Inhibitor Compound 102 wurde sowohl FLT3-ITD als auch STAT5 bei niedrigeren Konzentrationen abgebaut als durch den jeweiligen Inhibitor alleine [125]. Der synergistische Effekt von HDAC- und FLT3-Inhibitoren beruht wohl auf einem Abbau des FLT3-ITD-Rezeptors und einer caspase-induzierten Spaltung von STAT5. Unsere Ergebnisse regen die gemeinsame Verwendung von HDAC- und FLT3-Inhibitoren in klinischen AML-Studien an.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit „Aktivierung des FLT3-Signalweges als molekulare Zielstruktur in der akuten myeloischen Leukämie“ wurde der transformierende Phänotyp von CBL- und FLT3-Mutationen im Zellmodell untersucht.

Zusätzlich zur Überexpression und dem Vorkommen von aktivierenden Mutationen können Rezeptoren auch durch eine gestörte negative Regulation in Tumoren aberrant aktiviert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine onkogene Mutante der Ubiquitin-Ligase CBL (CBL Δ exon8), die bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) gefunden wurde, hauptsächlich in Kooperation mit Rezeptor-Tyrosinkinasen der Klasse-III IL-3-abhängige Ba/F3-Zellen transformierte, jedoch nicht mit anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Zytokinrezeptoren. Diese Zellen zeigen eine erhöhte ligand-abhängige Proliferation und eine Verzögerung der Internalisierung der Rezeptoren und sind nach Zytokin-Entzug vor Apoptose geschützt.

Es war auch eine stärkere AKT-Phosphorylierung sowohl in den RTK-III/CBL Δ exon8-koexprimierenden Ba/F3-Zellen nach Ligandstimulation als auch in einer AML-Zelllinie feststellbar. Diese Zelllinie exprimiert dieselbe CBL-Mutation und einen mutierten FLT3-Rezeptor. Pharmakologische Inhibition von Signalwegen verdeutlicht die kritische Rolle des PI3K/AKT-Signalweges. Zudem zeigte eine kombinierte pharmakologische Inhibition von FLT3 und AKT einen synergistischen negativen Effekt auf die Zellproliferation. Des Weiteren spiegelten Versuche mit einer konstitutiv aktiven AKT1-Mutante den pro-proliferativen und anti-apoptotischen Phänotyp der CBL-Mutante wider. Das wiederum bestätigte den AKT-Signalweg als einen transformierenden Mediator.

Um die Bedeutung der LINKER-Region für das transformierende Potential von CBL zu untersuchen, wurden kritische Tyrosine der LINKER-Domäne mutiert. Auch diese Punktmutanten der LINKER-Region zeigten denselben transformierenden Phänotyp - jedoch deutlich schwächer als die zuvor charakterisierte Deletionsmutante CBL Δ exon8. Der Fund von LINKER- und RING-Finger-Mutationen bei Patienten mit chronischer myelomonozytären Leukämie (CMML) bekräftigte die Bedeutung beider Domänen für das onkogene Potential von CBL.

In dieser Arbeit konnten auch FLT3-CBL-Interaktionsstellen charakterisiert werden. Zum Einen konnte der transformierende Phänotyp der CBL-Mutante durch eine Mutation in der PTB-Domäne von CBL komplett und zum Anderen durch Mutationen juxtamembranöser Tyrosine von FLT3 und eines Tyrosins von CBL teilweise vermindert werden. Die wichtige Rolle der juxtamembranösen Domäne von FLT3 bei der Signalübertragung nach Ligandstimulation und beim transformierenden Phänotyp von CBL wurde durch die Verwendung von chimären EGFR/FLT3-Rezeptoren aufgezeigt.

Das Onkogen FLT3 spielt sowohl in der AML als auch in der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) eine entscheidende Rolle und stellt eine wichtige therapeutische Zielstruktur dar. Neben den FLT3 „internal tandem duplication“- (ITD)-Mutationen werden auch Mutationen in der Kinasedomäne (FLT3-TKD) häufig vorgefunden. In dieser Arbeit wurde das onkogene Potential zweier TKD-Mutationen in ALL bzw. AML untersucht. Sowohl die „core-binding factor“- (CBF)-AML-assoziierte, als auch die ALL-assoziierte FLT3-TKD-Mutation transformierte Ba/F3-Zellen. Jedoch zeigten beide eine deutlich schwächere Proliferation und Apoptoseresistenz als FLT3-ITD. Wie bei den ITD-Rezeptoren beruht der Phänotyp auf einem konstitutiv aktivierten Rezeptor. Allerdings im Gegensatz zu FLT3-ITD nicht auf einer STAT5-Aktivierung, sondern auf einer konstitutiven Aktivierung des MAPK- und AKT-Signalweges. Alle FLT3-Mutationen waren durch spezifische Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren hemmbar. Eine Monotherapie der AML mit TK-Inhibitoren bringt in der Klinik nur einen mäßigen therapeutischen Nutzen. Die zusätzliche Verwendung von Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren zeigte in FLT3-ITD-Zellen einen verbesserten Effekt.

Durch diese Arbeit konnten FLT3-CBL-Interaktionsstellen aufgezeigt und der AKT-Signalweg als der kritische Mediator der Transformation durch onkogenes CBL identifiziert werden. Die erfolgreiche Inhibition der CBL-induzierten Proliferation durch AKT- und PTK-Inhibitoren deutet darauf hin, dass diese Therapie eine vielversprechende Behandlung von Patienten mit CBL-Mutationen darstellen könnte. Die funktionelle Charakterisierung von FLT3-TKD-Mutationen zeigte deren transformierendes Potential und, dass sie durchaus als therapeutische Zielstruktur in Leukämien von Bedeutung sein könnten.

6 Abstract

In the thesis on hand „Aktivierung des FLT3-Signalweges als molekulare Zielstruktur in der akuten myeloischen Leukämie“ the transforming potential of CBL and FLT3 mutations was investigated *in vitro*.

Besides overexpression and activating mutations receptors can be aberrant activated in tumor cells by an altered negative regulation. In this study it was shown that an oncogenic mutant of the ubiquitin ligase CBL (CBL Δ exon8), found in acute myeloid leukemia (AML) patients, predominantly cooperates with class III receptor tyrosine kinases (PDGFRA, PDGFRB, KIT, FLT3) but not with other receptor tyrosine kinases or cytokine receptors, to transform IL-3 dependent Ba/F3 cells. In addition to a greatly increased ligand-dependent enhanced proliferation of the cells, the receptor internalization was delayed and the cells were protected from apoptosis.

The RTK-III/CBL Δ exon8 coexpressing Ba/F3 cells and the AML cell line MOLM-13, harbouring the same CBL mutation and FLT3 internal tandem duplication (ITD), showed a strong AKT phosphorylation after ligand stimulation. Pharmacological inhibition of signaling pathways illustrated the critical role of the PI3K/AKT pathway. A combinatory treatment of FLT3 and AKT inhibitors had a synergistic effect on cell proliferation. Furthermore experiments with a constitutive active AKT1 mutant (E17K) recapitulated the pro-proliferative phenotype of the CBL mutant, confirming AKT as transforming pathway.

To investigate the impact of the LINKER domain on the oncogenic potential of CBL the critical tyrosines 368 and 371 were mutated. In addition to the characterized deletion mutant CBL Δ exon8, the point mutants of the LINKER region also showed a transforming potential but clearly weaker. The discovery of LINKER and RING-finger mutations in chronic myelomonocytic leukemia (CMML) patients confirmed the importance of both domains for the oncogenic potential of CBL.

In this study the sites of interaction between FLT3 and CBL were analyzed in detail. On the one hand a mutation of the PTB domain abrogated the transforming potential of the CBL mutant. On the other hand this transforming potential was partially reduced by mutations of tyrosines 589 and 591 in the juxtamembrane domain of FLT3 and 731 of CBL. The important role of the juxtamembrane domain of FLT3 in the signal transduction after ligand stimulation and in the oncogenic potential of CBL was demonstrated by the use of chimeric EGFR/FLT3 receptors.

The oncogene FLT3 plays in both AML as well as in acute lymphoblastic leukemia (ALL) a crucial role and represents an important therapeutic target. Besides FLT3-ITD also mutations in the kinase domain (FLT3-TKD) are frequently found. In this study the transforming

potential of two FLT3-TKD mutations in AML, respectively ALL, was investigated. Both the core-binding factor (CBF) AML associated and the ALL associated FLT3 mutation transformed Ba/F3 cells. However, they showed a much weaker transforming potential as FLT3-ITD. As in FLT3-ITD, the transformation is based on a constitutive activated receptor, but unlike FLT3-ITD not on a STAT5 activation, but on a constitutive activation of the MAPK and on an AKT signaling pathway. All FLT3 mutations were inhibited by specific tyrosine kinase (TK) inhibitors. Monotherapy in AML with TK inhibitors shows only a modest therapeutic benefit in the clinic, the additional use of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in FLT3-ITD cells showed an improved effect. This work identified FLT3-CBL interaction sites and the AKT pathway as critical mediator of CBL transformation. The successful inhibition of the oncogenic CBL-induced proliferation by AKT and PTK inhibitors suggests that this therapy could be a promising treatment of patients with CBL mutations. The functional characterization of FLT3-TKD mutations showed their transforming potential. They could be a therapeutic target in leukemia.

7. Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Dahm, S., Haberland, J., Kraywinkel, K., Laudi, A., Wolf, U., Meisegeier, S., Richter, M., Schönfeld, I., Stöcker, M., *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 2012, Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Berlin.
2. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.
3. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(3): p. 254-66.
4. Frohling, S., et al., *CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(4): p. 624-33.
5. Gombart, A.F., et al., *Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias*. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1332-40.
6. Pabst, T., et al., *Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia*. *Nat Genet*, 2001. **27**(3): p. 263-70.
7. Fathi, A.T. and O. Abdel-Wahab, *Mutations in epigenetic modifiers in myeloid malignancies and the prospect of novel epigenetic-targeted therapy*. *Adv Hematol*, 2012. **2012**: p. 469592.
8. Reindl, C., et al., *CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(7): p. 2238-47.
9. Caligiuri, M.A., et al., *Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2007. **110**(3): p. 1022-4.
10. Kales, S.C., et al., *Cbl and human myeloid neoplasms: the Cbl oncogene comes of age*. *Cancer Res*, 2010. **70**(12): p. 4789-94.
11. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
12. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. *Science*, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
13. Hubbard, S.R., et al., *Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor*. *Nature*, 1994. **372**(6508): p. 746-54.
14. Rosnet, O., et al., *Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family*. *Oncogene*, 1991. **6**(9): p. 1641-50.
15. Rosnet, O., et al., *Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene*. *Genomics*, 1991. **9**(2): p. 380-5.
16. Matthews, W., et al., *A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations*. *Cell*, 1991. **65**(7): p. 1143-52.
17. Lyman, S.D., et al., *Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene*. *Oncogene*, 1993. **8**(4): p. 815-22.
18. Kikushige, Y., et al., *Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival*. *J Immunol*, 2008. **180**(11): p. 7358-67.
19. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. *Leukemia*, 1996. **10**(2): p. 238-48.
20. Hannum, C., et al., *Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs*. *Nature*, 1994. **368**(6472): p. 643-8.

21. Heldin, C.H., *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell, 1995. **80**(2): p. 213-23.
22. Ullrich, A. and J. Schlessinger, *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. **61**(2): p. 203-12.
23. Bell, C.A., et al., *Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(10): p. 3589-99.
24. Gupta, R., C.L. Knight, and B.J. Bain, *Receptor tyrosine kinase mutations in myeloid neoplasms*. Br J Haematol, 2002. **117**(3): p. 489-508.
25. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(2): p. 172-187.
26. Vempati, S., et al., *Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential*. Blood, 2007. **110**(2): p. 686-94.
27. Kiyoi, H., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product*. Leukemia, 1998. **12**(9): p. 1333-7.
28. Gale, R.E., et al., *Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3768-76.
29. Gale, R.E., et al., *No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3658-65.
30. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
31. Abu-Duhier, F.M., et al., *Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 983-8.
32. Klippel, A., et al., *The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2675-85.
33. Datta, K., et al., *Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30835-9.
34. Scheid, M.P., P.A. Marignani, and J.R. Woodgett, *Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6247-60.
35. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(8): p. 606-19.
36. Masson, K., et al., *A role of Gab2 association in Flt3 ITD mediated Stat5 phosphorylation and cell survival*. Br J Haematol, 2009. **146**(2): p. 193-202.
37. Zhang, S. and H.E. Broxmeyer, *Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(1): p. 195-9.
38. Wernig, G., et al., *Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4274-81.
39. Gouilleux-Gruart, V., et al., *STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients*. Blood, 1996. **87**(5): p. 1692-7.
40. Coffey, P.J., L. Koenderman, and R.P. de Groot, *The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2511-22.
41. Zarrinkar, P.P., et al., *AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2009. **114**(14): p. 2984-92.

42. Levis, M., et al., *Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse*. *Blood*, 2011. **117**(12): p. 3294-301.
43. Fischer, T., et al., *Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(28): p. 4339-45.
44. Borovski, T., et al., *Cancer stem cell niche: the place to be*. *Cancer Res*, 2011. **71**(3): p. 634-9.
45. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nat Med*, 1997. **3**(7): p. 730-7.
46. Ciechanover, A., et al., *"Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(5): p. 2537-42.
47. Keane, M.M., et al., *Cloning and characterization of cbl-b: a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene*. *Oncogene*, 1995. **10**(12): p. 2367-77.
48. Keane, M.M., et al., *cbl-3: a new mammalian cbl family protein*. *Oncogene*, 1999. **18**(22): p. 3365-75.
49. Rao, N., et al., *Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(6): p. 3794-9.
50. Swaminathan, G. and A.Y. Tsygankov, *The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling*. *J Cell Physiol*, 2006. **209**(1): p. 21-43.
51. Bonita, D.P., et al., *Phosphotyrosine binding domain-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor receptor alpha signaling cascade by transforming mutants of Cbl: implications for Cbl's function and oncogenicity*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(8): p. 4597-610.
52. Soubeyran, P., et al., *Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors*. *Nature*, 2002. **416**(6877): p. 183-7.
53. Petrelli, A., et al., *The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met*. *Nature*, 2002. **416**(6877): p. 187-90.
54. Hill, E., et al., *The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(2): p. 309-23.
55. Schmidt, A., et al., *Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid*. *Nature*, 1999. **401**(6749): p. 133-41.
56. Levkowitz, G., et al., *c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor*. *Genes Dev*, 1998. **12**(23): p. 3663-74.
57. de Melker, A.A., et al., *c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 11): p. 2167-78.
58. Jiang, X. and A. Sorkin, *Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation*. *Traffic*, 2003. **4**(8): p. 529-43.
59. Joazeiro, C.A., et al., *The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase*. *Science*, 1999. **286**(5438): p. 309-12.
60. Zheng, N., et al., *Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases*. *Cell*, 2000. **102**(4): p. 533-9.
61. Schmidt, M.H. and I. Dikic, *The Cbl interactome and its functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(12): p. 907-18.
62. Hunter, S., et al., *Fyn associates with Cbl and phosphorylates tyrosine 731 in Cbl, a binding site for phosphatidylinositol 3-kinase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(4): p. 2097-106.
63. Kowanetz, K., et al., *Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 39735-46.
64. Odai, H., et al., *The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domain of Grb2/Ash in human hematopoietic cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(18): p. 10800-5.

65. Reedquist, K.A., et al., *Rapid T-cell receptor-mediated tyrosine phosphorylation of p120, an Fyn/Lck Src homology 3 domain-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4135-9.
66. Donovan, J.A., et al., *The protein product of the c-cbl protooncogene is the 120-kDa tyrosine-phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 22921-4.
67. Tsygankov, A.Y., et al., *Specific association of tyrosine-phosphorylated c-Cbl with Fyn tyrosine kinase in T cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 27130-7.
68. Sanjay, A., et al., *Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility*. J Cell Biol, 2001. **152**(1): p. 181-95.
69. Blake, T.J., et al., *The sequences of the human and mouse c-cbl proto-oncogenes show v-cbl was generated by a large truncation encompassing a proline-rich domain and a leucine zipper-like motif*. Oncogene, 1991. **6**(4): p. 653-7.
70. Bartkiewicz, M., A. Houghton, and R. Baron, *Leucine zipper-mediated homodimerization of the adaptor protein c-Cbl. A role in c-Cbl's tyrosine phosphorylation and its association with epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30887-95.
71. Langdon, W.Y., et al., *v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1168-72.
72. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *EGF receptor binding and transformation by v-cbl is ablated by the introduction of a loss-of-function mutation from the Caenorhabditis elegans sli-1 gene*. Oncogene, 1997. **14**(18): p. 2239-49.
73. Tan, Y.H., et al., *CBL is frequently altered in lung cancers: its relationship to mutations in MET and EGFR tyrosine kinases*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8972.
74. Dunbar, A.J., et al., *250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10349-57.
75. Makishima, H., et al., *Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6109-16.
76. Grand, F.H., et al., *Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6182-92.
77. Loh, M.L., et al., *Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1859-63.
78. Muramatsu, H., et al., *Mutations of an E3 ubiquitin ligase c-Cbl but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1969-75.
79. Kohlmann, A., et al., *Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1*. J Clin Oncol, 2010. **28**(24): p. 3858-65.
80. Sanada, M., et al., *Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms*. Nature, 2009. **460**(7257): p. 904-8.
81. Schnittger, S., et al., *Molecular analyses of 15,542 patients with suspected BCR-ABL1-negative myeloproliferative disorders allow to develop a stepwise diagnostic workflow*. Haematologica, 2012. **97**(10): p. 1582-5.
82. Schnittger, S., et al., *Use of CBL exon 8 and 9 mutations in diagnosis of myeloproliferative neoplasms and myeloproliferative/myelodysplastic disorders: an analysis of 636 cases*. Haematologica, 2012.
83. Makishima, H., et al., *CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia*. Blood, 2011. **117**(21): p. e198-206.

84. Nicholson, L., et al., *Casitas B lymphoma mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012. **51**(3): p. 250-6.
85. Shiba, N., et al., *CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2012. **156**(5): p. 672-4.
86. Shiba, N., et al., *CBL mutation in childhood therapy-related leukemia*. *Leukemia*, 2011. **25**(8): p. 1356-8.
87. Sargin, B., et al., *Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML*. *Blood*, 2007. **110**(3): p. 1004-12.
88. Jankowska, A.M., et al., *Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2 and DNMT3A*. *Blood*, 2011.
89. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(4): p. 294-307.
90. Ryan, P.E., et al., *Regulating the regulator: negative regulation of Cbl ubiquitin ligases*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(2): p. 79-88.
91. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, 1977. **36**(1): p. 59-74.
92. Collins, S.J., R.C. Gallo, and R.E. Gallagher, *Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture*. *Nature*, 1977. **270**(5635): p. 347-9.
93. Matsuo, Y., et al., *Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)*. *Leukemia*, 1997. **11**(9): p. 1469-77.
94. Lange, B., et al., *Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines*. *Blood*, 1987. **70**(1): p. 192-9.
95. Ben-Bassat, H., et al., *Establishment and characterization of a new permanent cell line (GDM-1) from a patient with myelomonoblastic leukemia*. *Leuk Res*, 1982. **6**(6): p. 743-52.
96. Dhut, S., et al., *Establishment of a lymphoblastoid cell line, SD-1, expressing the p190 bcr-abl chimaeric protein*. *Leukemia*, 1991. **5**(1): p. 49-55.
97. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **50**(2): p. 535-8.
98. Palacios, R. and M. Steinmetz, *Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo*. *Cell*, 1985. **41**(3): p. 727-34.
99. Warner, N.L., M.A. Moore, and D. Metcalf, *A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content*. *J Natl Cancer Inst*, 1969. **43**(4): p. 963-82.
100. Birnboim, H.C., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. *Methods Enzymol*, 1983. **100**: p. 243-55.
101. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
102. Webb, J.L., *Effect of more than one inhibitor*. *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Vol. 1. 1963, New York: Academic Press. 66-79, 488-512.
103. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
104. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
105. Palacios, R., et al., *Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro*. *Nature*, 1984. **309**(5964): p. 126-31.
106. Hayakawa, F., et al., *Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines*. *Oncogene*, 2000. **19**(5): p. 624-31.

107. Griffith, J., et al., *The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain*. Mol Cell, 2004. **13**(2): p. 169-78.
108. Fernandes, M.S., et al., *Novel oncogenic mutations of CBL in human acute myeloid leukemia that activate growth and survival pathways depend on increased metabolism*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32596-605.
109. Andoniou, C.E., C.B. Thien, and W.Y. Langdon, *Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4515-23.
110. Kales, S.C., P.E. Ryan, and S. Lipkowitz, *Cbl exposes its RING finger*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(2): p. 131-3.
111. Quentmeier, H., et al., *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 120-4.
112. Chase, A., et al., *Imatinib sensitivity as a consequence of a CSF1R-Y571D mutation and CSF1/CSF1R signaling abnormalities in the cell line GDM1*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 358-64.
113. Makishima, H., et al., *CBL mutation-related patterns of phosphorylation and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors*. Leukemia, 2012.
114. Taketani, T., et al., *FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1085-8.
115. Lyman, S.D., et al., *The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor*. Stem Cells, 1994. **12 Suppl 1**: p. 99-107; discussion 108-10.
116. Holmes, M.L., et al., *Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment*. Genes Dev, 2006. **20**(8): p. 933-8.
117. Speck, N.A. and D.G. Gilliland, *Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 502-13.
118. Mrozek, K. and C.D. Bloomfield, *Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2008(39): p. 52-7.
119. Opatz, S., et al., *Exome Sequencing Identifies Recurring FLT3 N676K Mutations in Core Binding Factor Leukemia*. ASH Annual Meeting, 2012. **abstract 404**.
120. Kindler, T., et al., *Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2005. **105**(1): p. 335-40.
121. Choudhary, C., et al., *AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations*. Blood, 2005. **106**(1): p. 265-73.
122. Schmidt-Arras, D., et al., *Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3568-76.
123. Cools, J., et al., *Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia*. Cancer Res, 2004. **64**(18): p. 6385-9.
124. Zhang, B., et al., *Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate*. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 427-42.
125. Pietschmann, K., et al., *Breakdown of the FLT3-ITD/STAT5 axis and synergistic apoptosis induction by the histone deacetylase inhibitor Panobinostat and FLT3-specific inhibitors*. Mol Cancer Ther, 2012.
126. Lamorte, L. and M. Park, *The receptor tyrosine kinases: role in cancer progression*. Surg Oncol Clin N Am, 2001. **10**(2): p. 271-88, viii.
127. Zheng, R., et al., *FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells*. Blood, 2004. **103**(1): p. 267-74.
128. Basson, M.A., et al., *Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction*. Dev Cell, 2005. **8**(2): p. 229-39.

129. Peschard, P., et al., *Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 995-1004.
130. Bache, K.G., T. Slagsvold, and H. Stenmark, *Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer*. EMBO J, 2004. **23**(14): p. 2707-12.
131. Peschard, P. and M. Park, *Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 519-23.
132. Ogawa, S., et al., *Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms*. Cell Cycle, 2010. **9**(6).
133. Ogawa, S., et al., *Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(15): p. 3825-31.
134. Toffalini, F. and J.B. Demoulin, *New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases*. Blood, 2010. **116**(14): p. 2429-37.
135. Yan, S.C., et al., *Ubiquitin ligase c-Cbl is involved in tamoxifen-induced apoptosis of MCF-7 cells by downregulating the survival signals*. Acta Oncol, 2010.
136. Levkowitz, G., et al., *Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1*. Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 1029-40.
137. Wehrle, C., P. Van Slyke, and D.J. Dumont, *Angiopoietin-1-induced ubiquitylation of Tie2 by c-Cbl is required for internalization and degradation*. Biochem J, 2009. **423**(3): p. 375-80.
138. Thien, C.B., F. Walker, and W.Y. Langdon, *RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 355-65.
139. de Melker, A.A., G. van der Horst, and J. Borst, *Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the epidermal growth factor receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55465-73.
140. Dou, H., et al., *Structural basis for autoinhibition and phosphorylation-dependent activation of c-Cbl*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(2): p. 184-92.
141. Kobashigawa, Y., et al., *Autoinhibition and phosphorylation-induced activation mechanisms of human cancer and autoimmune disease-related E3 protein Cbl-b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20579-84.
142. Barresi, V., et al., *Clonal selection of 11q CN-LOH and CBL gene mutation in a serially studied patient during MDS progression to AML*. Leuk Res, 2010. **34**(11): p. 1539-42.
143. Kohlmann, A., et al., *The Interlaboratory RObustness of Next-generation sequencing (IRON) study: a deep sequencing investigation of TET2, CBL and KRAS mutations by an international consortium involving 10 laboratories*. Leukemia, 2011. **25**(12): p. 1840-8.
144. Lengyel, E., K. Sawada, and R. Salgia, *Tyrosine kinase mutations in human cancer*. Curr Mol Med, 2007. **7**(1): p. 77-84.
145. Lupher, M.L., Jr., et al., *The Cbl protooncoprotein: a negative regulator of immune receptor signal transduction*. Immunol Today, 1999. **20**(8): p. 375-82.
146. Yuan, T.L. and L.C. Cantley, *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5497-510.
147. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-54.
148. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
149. Yamazaki, S., et al., *Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells*. EMBO J, 2006. **25**(15): p. 3515-23.
150. Tothova, Z., et al., *FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress*. Cell, 2007. **128**(2): p. 325-39.

151. Buitenhuis, M., et al., *Protein kinase B (c-akt) regulates hematopoietic lineage choice decisions during myelopoiesis*. Blood, 2008. **111**(1): p. 112-21.
152. Friedman, A.D., *Transcriptional control of granulocyte and monocyte development*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6816-28.
153. Xu, Q., et al., *Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation*. Blood, 2003. **102**(3): p. 972-80.
154. Nyakern, M., et al., *Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(6): p. 1559-70.
155. Kornblau, S.M., et al., *Studying the right cell in acute myelogenous leukemia: dynamic changes of apoptosis and signal transduction pathway protein expression in chemotherapy resistant ex-vivo selected "survivor cells"*. Cell Cycle, 2006. **5**(23): p. 2769-77.
156. Tamburini, J., et al., *Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients*. Blood, 2007. **110**(3): p. 1025-8.
157. Kharas, M.G., et al., *Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice*. Blood, 2010. **115**(7): p. 1406-15.
158. Yilmaz, O.H., et al., *Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 475-82.
159. Zhang, J., et al., *PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 518-22.
160. Rathinam, C., et al., *Myeloid leukemia development in c-Cbl RING finger mutant mice is dependent on FLT3 signaling*. Cancer Cell, 2010. **18**(4): p. 341-52.
161. Thien, C.B., et al., *Loss of c-Cbl RING finger function results in high-intensity TCR signaling and thymic deletion*. EMBO J, 2005. **24**(21): p. 3807-19.
162. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
163. Pal, S.K., et al., *Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2010. **19**(11): p. 1355-66.
164. Martelli, A.M., et al., *The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients*. Oncotarget, 2010. **1**(2): p. 89-103.
165. Yap, T.A., et al., *First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors*. J Clin Oncol, 2011. **29**(35): p. 4688-95.
166. Carpten, J.D., et al., *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 439-44.
167. Gutierrez, A., et al., *High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2009. **114**(3): p. 647-50.
168. Landgraf, K.E., C. Pilling, and J.J. Falke, *Molecular mechanism of an oncogenic mutation that alters membrane targeting: Glu17Lys modifies the PIP lipid specificity of the AKT1 PH domain*. Biochemistry, 2008. **47**(47): p. 12260-9.
169. Slovak, M.L., et al., *Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4075-83.
170. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2322-33.
171. Savage, D.G. and K.H. Antman, *Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy*. N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 683-93.
172. Taylor, S.J., et al., *Flt3 inhibitor AC220 is a potent therapy in a mouse model of myeloproliferative disease driven by enhanced wild-type Flt3 signaling*. Blood, 2012.
173. Di Fiore, P.P., S. Polo, and K. Hofmann, *When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 491-7.

174. Fang, S., et al., *Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8945-51.
175. Honda, R. and H. Yasuda, *Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase*. Oncogene, 2000. **19**(11): p. 1473-6.
176. Thompson, B.J., et al., *Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1395-408.
177. Rodriguez, S., et al., *The SKP2 E3 ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of HSCs*. Blood, 2011. **117**(24): p. 6509-19.
178. Karpiuk, O., et al., *The histone H2B monoubiquitination regulatory pathway is required for differentiation of multipotent stem cells*. Mol Cell, 2012. **46**(5): p. 705-13.
179. Naramura, M., et al., *Rapidly fatal myeloproliferative disorders in mice with deletion of Casitas B-cell lymphoma (Cbl) and Cbl-b in hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(37): p. 16274-9.
180. Li, Z., et al., *Chemically diverse toxicants converge on Fyn and c-Cbl to disrupt precursor cell function*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e35.
181. Ferron, S.R., et al., *Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 367-79.
182. Naramura, M., et al., *c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1192-9.
183. Yang, Y., et al., *Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells*. Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 547-59.
184. Issaeva, N., et al., *Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1321-8.
185. Vassilev, L.T., et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. Science, 2004. **303**(5659): p. 844-8.
186. Klapper, L.N., et al., *Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3384-8.
187. Penengo, L., et al., *c-Cbl is a critical modulator of the Ron tyrosine kinase receptor*. Oncogene, 2003. **22**(24): p. 3669-79.
188. Masson, K., et al., *Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation*. Biochem J, 2006. **399**(1): p. 59-67.
189. Xiong, Y., et al., *A CSF-1 Receptor Phosphotyrosine 559 Signaling Pathway Regulates Receptor Ubiquitination and Tyrosine Phosphorylation*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 952-60.
190. Rosenkranz, S., et al., *Src family kinases negatively regulate platelet-derived growth factor alpha receptor-dependent signaling and disease progression*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9620-7.
191. Kong-Beltran, M., et al., *Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 283-9.
192. Zeng, S., et al., *Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl)*. Blood, 2005. **105**(1): p. 226-32.
193. Luper, M.L., Jr., et al., *The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33140-4.
194. Vempati, S., et al., *Transformation by oncogenic mutants and ligand-dependent activation of FLT3 wild-type requires the tyrosine residues 589 and 591*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(14): p. 4437-45.
195. Jiang, X., et al., *Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(3): p. 858-70.
196. Rohde, C.M., J. Schrum, and A.W. Lee, *A juxtamembrane tyrosine in the colony stimulating factor-1 receptor regulates ligand-induced Src association, receptor kinase function, and down-regulation*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 43448-61.

197. Scott, R.P., et al., *Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13442-9.
198. Brunelleschi, S., et al., *Receptor tyrosine kinases as target for anti-cancer therapy*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(22): p. 1959-72.
199. Jansen, S.M., et al., *ErbB2 and ErbB4 Cbl binding sites can functionally replace the ErbB1 Cbl binding site*. Cell Signal, 2009. **21**(5): p. 810-8.
200. Lin, D.C., et al., *Adaptor protein Lnk binds to and inhibits normal and leukemic FLT3*. Blood, 2012. **120**(16): p. 3310-7.
201. Heiss, E., et al., *Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of Src family kinases and the protein tyrosine phosphatase SHP2*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1542-50.
202. Baxter, R.M., et al., *Full activation of the platelet-derived growth factor beta-receptor kinase involves multiple events*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 17050-5.
203. Kimura, Y., et al., *Targeted mutations of the juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6015-20.
204. Mori, S., et al., *Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases*. EMBO J, 1993. **12**(6): p. 2257-64.
205. Vaillancourt, R.R., et al., *Mitogen-activated protein kinase activation is insufficient for growth factor receptor-mediated PC12 cell differentiation*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(7): p. 3644-53.
206. Wrobel, C.N., et al., *Autocrine CSF-1R activation promotes Src-dependent disruption of mammary epithelial architecture*. J Cell Biol, 2004. **165**(2): p. 263-73.
207. Valgeirsdottir, S., et al., *Activation of Stat5 by platelet-derived growth factor (PDGF) is dependent on phosphorylation sites in PDGF beta-receptor juxtamembrane and kinase insert domains*. Oncogene, 1998. **16**(4): p. 505-15.
208. Leischner, H., et al., *SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML*. Blood, 2012. **119**(17): p. 4026-33.
209. Kazi, J.U., et al., *Suppressor of Cytokine Signaling 6 (SOCS6) Negatively Regulates Flt3 Signal Transduction through Direct Binding to Phosphorylated Tyrosines 591 and 919 of Flt3*. J Biol Chem, 2012. **287**(43): p. 36509-17.
210. Irusta, P.M., et al., *Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38627-34.
211. Ilsley, J.L., M. Sudol, and S.J. Winder, *The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton*. Cell Signal, 2002. **14**(3): p. 183-9.
212. Macias, M.J., S. Wiesner, and M. Sudol, *WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 30-7.
213. Sudol, M. and T. Hunter, *NeW wrinkles for an old domain*. Cell, 2000. **103**(7): p. 1001-4.
214. Lasota, J. and M. Miettinen, *Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours*. Histopathology, 2008. **53**(3): p. 245-66.
215. Padua, R.A., et al., *RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up*. Leukemia, 1998. **12**(6): p. 887-92.
216. Longley, B.J., Jr., et al., *Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1609-14.
217. Ridge, S.A., et al., *FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1377-80.
218. Carballo, M., et al., *Novel c-KIT germline mutation in a family with gastrointestinal stromal tumors and cutaneous hyperpigmentation*. Am J Med Genet A, 2005. **132**(4): p. 361-4.
219. Heinrich, M.C., et al., *Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor*. J Clin Oncol, 2003. **21**(23): p. 4342-9.

220. Antonescu, C.R., et al., *Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(9): p. 3329-37.
221. Corbacioglu, S., et al., *Newly identified c-KIT receptor tyrosine kinase ITD in childhood AML induces ligand-independent growth and is responsive to a synergistic effect of imatinib and rapamycin*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3504-13.
222. Mol, C.D., et al., *Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31655-63.
223. Dibb, N.J., S.M. Dilworth, and C.D. Mol, *Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 718-27.
224. Rosnet, O. and D. Birnbaum, *Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases*. Crit Rev Oncog, 1993. **4**(6): p. 595-613.
225. Hubbard, S.R., *Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 464-71.
226. Herbst, R., et al., *Substrate phosphorylation specificity of the human c-kit receptor tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1991. **266**(30): p. 19908-16.
227. Lev, S., Y. Yarden, and D. Givol, *Receptor functions and ligand-dependent transforming potential of a chimeric kit proto-oncogene*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(11): p. 6064-8.
228. Obermeier, A., et al., *Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction*. EMBO J, 1993. **12**(3): p. 933-41.
229. Seedorf, K., et al., *Differential effects of carboxy-terminal sequence deletions on platelet-derived growth factor receptor signaling activities and interactions with cellular substrates*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(10): p. 4347-56.
230. Dosil, M., S. Wang, and I.R. Lemischka, *Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6572-85.
231. Zhang, S., C. Mantel, and H.E. Broxmeyer, *Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 372-80.
232. DiNitto, J.P., et al., *Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance*. J Biochem, 2010. **147**(4): p. 601-9.
233. Spiekermann, K., et al., *Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 2140-50.
234. Rocnik, J.L., et al., *Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1339-45.
235. Boerner, J.L., et al., *Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7059-71.
236. Yang, S., et al., *Ligand-independent phosphorylation of Y869 (Y845) links mutant EGFR signaling to stat-mediated gene expression*. Exp Cell Res, 2008. **314**(2): p. 413-9.
237. Yuzawa, S., et al., *Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor*. Cell, 2007. **130**(2): p. 323-34.
238. Liu, H., et al., *Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 891-901.
239. Garrett, T.P., et al., *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha*. Cell, 2002. **110**(6): p. 763-73.
240. Ogiso, H., et al., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. Cell, 2002. **110**(6): p. 775-87.
241. Bouyain, S., et al., *The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 15024-9.

242. Burgess, A.W., et al., *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 541-52.
243. Cho, H.S., et al., *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 756-60.
244. Ferguson, K.M., et al., *EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 507-17.
245. Jura, N., et al., *Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1293-307.
246. Walton, G.M., et al., *Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates*. J Biol Chem, 1990. **265**(3): p. 1750-4.
247. Downward, J., P. Parker, and M.D. Waterfield, *Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor*. Nature, 1984. **311**(5985): p. 483-5.
248. Red Brewer, M., et al., *The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain*. Mol Cell, 2009. **34**(6): p. 641-51.
249. Thiel, K.W. and G. Carpenter, *Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19238-43.
250. Wood, E.R., et al., *6-Ethynylthieno[3,2-d]- and 6-ethynylthieno[2,3-d]pyrimidin-4-anilines as tunable covalent modifiers of ErbB kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2773-8.
251. Ellis, L., et al., *Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose*. Cell, 1986. **45**(5): p. 721-32.
252. Mitra, G., *Mutational analysis of conserved residues in the tyrosine kinase domain of the human trk oncogene*. Oncogene, 1991. **6**(12): p. 2237-41.
253. Longati, P., et al., *Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor)*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 49-57.
254. Middlemas, D.S., J. Meisenhelder, and T. Hunter, *Identification of TrkB autophosphorylation sites and evidence that phospholipase C-gamma 1 is a substrate of the TrkB receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 5458-66.
255. Mohammadi, M., et al., *Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 977-89.
256. Mohammadi, M., J. Schlessinger, and S.R. Hubbard, *Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism*. Cell, 1996. **86**(4): p. 577-87.
257. Hubbard, S.R., *Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog*. EMBO J, 1997. **16**(18): p. 5572-81.
258. Furdui, C.M., et al., *Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction*. Mol Cell, 2006. **21**(5): p. 711-7.
259. Lew, E.D., et al., *The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations*. Sci Signal, 2009. **2**(58): p. ra6.
260. Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh, *Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 661-75.
261. Zhang, X., et al., *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1137-49.
262. Pawson, T., *Protein modules and signalling networks*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 573-80.
263. Grovdal, L.M., et al., *Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation*. Exp Cell Res, 2004. **300**(2): p. 388-95.
264. Wodicka, L.M., et al., *Activation state-dependent binding of small molecule kinase inhibitors: structural insights from biochemistry*. Chem Biol, 2010. **17**(11): p. 1241-9.

265. Smith, C.C., et al., *Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 260-3.
266. Raymond, E., S. Faivre, and J.P. Armand, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy*. Drugs, 2000. **60 Suppl 1**: p. 15-23; discussion 41-2.
267. Ostman, A., C. Hellberg, and F.D. Bohmer, *Protein-tyrosine phosphatases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 307-20.
268. Persson, C., et al., *Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 2190-201.
269. Kovalenko, M., et al., *Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16219-26.
270. Li, E. and K. Hristova, *Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics*. Cell Adh Migr, 2010. **4**(2): p. 249-54.
271. Carow, C.E., et al., *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood, 1996. **87**(3): p. 1089-96.
272. Armstrong, S.A., et al., *FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3544-6.
273. Janke, H., et al., *FLT3 Mutations Impart a Continuous Spectrum of Oncogenic Potential in vitro*. manuscript in preparation.
274. Snyder, D.S., *Allogeneic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia*. Biol Blood Marrow Transplant, 2000. **6**(6): p. 597-603.
275. Catovsky, D., *Ph1-positive acute leukaemia and chronic granulocytic leukaemia: one or two diseases?* Br J Haematol, 1979. **42**(4): p. 493-8.
276. Druker, B.J., et al., *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1038-42.
277. Quentmeier, H., et al., *BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 6.
278. Hu, Y., et al., *Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 453-61.
279. Grundler, R., et al., *FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4792-9.
280. Pignon, J.M., *C-kit mutations and mast cell disorders. A model of activating mutations of growth factor receptors*. Hematol Cell Ther, 1997. **39**(2): p. 114-6.
281. Miselli, F.C., et al., *c-Kit/PDGFR α gene status alterations possibly related to primary imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(8): p. 2369-77.
282. Horn, S., et al., *Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells*. Oncogene, 2008. **27**(29): p. 4096-106.
283. Sanchez-Arevalo Lobo, V.J., et al., *Modulation of the p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway through Bcr/Abl: implications in the cellular response to Ara-C*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 1): p. 231-8.
284. Sattler, M. and R. Salgia, *Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(1): p. 63-79.
285. Chai, S.K., G.L. Nichols, and P. Rothman, *Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4720-8.
286. Shuai, K., et al., *Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia*. Oncogene, 1996. **13**(2): p. 247-54.

287. Ahmed, M., et al., *BCR-ABL and constitutively active erythropoietin receptor (cEpoR) activate distinct mechanisms for growth factor-independence and inhibition of apoptosis in Ba/F3 cell line*. *Oncogene*, 1998. **16**(4): p. 489-96.
288. Ilaria, R.L., Jr. and R.A. Van Etten, *P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(49): p. 31704-10.
289. Frank, D.A. and L. Varticovski, *BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats*. *Leukemia*, 1996. **10**(11): p. 1724-30.
290. Carlesso, N., D.A. Frank, and J.D. Griffin, *Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 811-20.
291. Frost, M.J., et al., *Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(12): p. 1115-24.
292. Heinrich, M.C., et al., *Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(29): p. 4764-74.
293. Dewar, A.L., et al., *Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib*. *Blood*, 2005. **105**(8): p. 3127-32.
294. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **295**(1): p. 139-45.
295. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells*. *Nat Med*, 1996. **2**(5): p. 561-6.
296. Bohmer, F.D., et al., *A single amino acid exchange inverts susceptibility of related receptor tyrosine kinases for the ATP site inhibitor STI-571*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 5148-55.
297. Guerrouahen, B.S., et al., *Dasatinib inhibits the growth of molecularly heterogeneous myeloid leukemias*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(4): p. 1149-58.
298. Gozgit, J.M., et al., *Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies*. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(6): p. 1028-35.
299. Talpaz, M., Shah, N. P., Deininger, M. W., Mauro, M. J., Flinn, I. W., Lustgarten, S., Lindmark, W., Gozgit, J. M., Clackson, T., Turner, C. D., Haluska, H., Kantarjian, H., Cortes, J. E., *Ponatinib in patients with acute myeloid leukemia (AML): Preliminary findings from a phase I study in hematologic malignancies*. *ASCO Annual Meeting*, 2011. **abstract 6518**.
300. Zirm, E., et al., *Ponatinib may overcome resistance of FLT3-ITD harbouring additional point mutations, notably the previously refractory F691I mutation*. *Br J Haematol*, 2012. **157**(4): p. 483-92.
301. Santos, F.P., et al., *Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia*. *Cancer*, 2011. **117**(10): p. 2145-55.
302. Care, R.S., et al., *Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(5): p. 775-7.
303. Boissel, N., et al., *Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML)*. *Leukemia*, 2006. **20**(6): p. 965-70.
304. Takahashi, S., *Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia*. *J Hematol Oncol*, 2011. **4**: p. 36.
305. Abbas, S., et al., *Exon 8 splice site mutations in the gene encoding the E3-ligase CBL are associated with core binding factor acute myeloid leukemias*. *Haematologica*, 2008. **93**(10): p. 1595-7.
306. Okuda, T., et al., *Biological characteristics of the leukemia-associated transcriptional factor AML1 disclosed by hematopoietic rescue of AML1-deficient embryonic stem cells by using a knock-in strategy*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(1): p. 319-28.

307. Yuan, Y., et al., *AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10398-403.
308. Castilla, L.H., et al., *The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia*. Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 144-6.
309. Dash, A.B., et al., *A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7622-7.
310. Haferlach, C., et al., *AML with CBFB-MYH11 rearrangement demonstrate RAS pathway alterations in 92% of all cases including a high frequency of NF1 deletions*. Leukemia, 2010. **24**(5): p. 1065-9.
311. Valk, P.J., et al., *Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16)*. Haematologica, 2004. **89**(1): p. 106.
312. Heidel, F., et al., *Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain*. Blood, 2006. **107**(1): p. 293-300.
313. Pauwels, D., B. Sweron, and J. Cools, *The N676D and G697R mutations in the kinase domain of FLT3 confer resistance to the inhibitor AC220*. Haematologica, 2012.
314. Frohling, S., et al., *Identification of driver and passenger mutations of FLT3 by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles*. Cancer Cell, 2007. **12**(6): p. 501-13.
315. Thiede, C., et al., *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4326-35.
316. Chen, L.L., et al., *A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 5913-9.
317. Debiec-Rychter, M., et al., *Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 270-9.
318. McLean, S.R., et al., *Imatinib binding and cKIT inhibition is abrogated by the cKIT kinase domain I missense mutation Val654Ala*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(12): p. 2008-15.
319. Frohling, S., et al., *Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4372-80.
320. Kottaridis, P.D., et al., *The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1752-9.
321. Rombouts, W.J., et al., *Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene*. Leukemia, 2000. **14**(4): p. 675-83.
322. Schlessinger, J., *Signal transduction. Autoinhibition control*. Science, 2003. **300**(5620): p. 750-2.
323. Kiyoi, H. and T. Naoe, *FLT3 in human hematologic malignancies*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(8): p. 1541-7.
324. Pratz, K.W. and M.J. Levis, *Bench to bedside targeting of FLT3 in acute leukemia*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(7): p. 781-9.
325. Fischer, T., *Rethinking bioactivity of FLT3 inhibitors*. Blood, 2011. **117**(12): p. 3247-8.
326. Levis, M., et al., *In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1145-50.

327. Small, D., *FLT3 mutations: biology and treatment*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 178-84.
328. Shao, W., et al., *Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance*. Int J Cancer, 2010. **127**(9): p. 2199-208.
329. Giles, F., et al., *A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4628-35.
330. Prince, H.M., M.J. Bishton, and R.W. Johnstone, *Panobinostat (LBH589): a potent pan-deacetylase inhibitor with promising activity against hematologic and solid tumors*. Future Oncol, 2009. **5**(5): p. 601-12.
331. Buchwald, M., et al., *Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation*. Leukemia, 2010. **24**(8): p. 1412-21.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.2.1.1: Rezeptorfamilien	3
Abb. 1.2.1.2: Struktur einer Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinase.....	5
Abb. 1.2.2: Onkogen in der FLT3-Signalgebung.....	7
Abb. 1.3.1: Domänen des CBL-Proteins.....	9
Abb. 1.3.2: Humane CBL-Mutationen.....	10
Abb. 3.1.1.1: Expression von Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	44
Abb. 3.1.1.2: Rezeptor-Stimulation.....	45
Abb. 3.1.2.1: Koexpression der CBL-Konstrukte.....	46
Abb. 3.1.2.2: Proliferation von EGFR/CBL und CBL-exprimierenden Zellen.....	47
Abb. 3.1.3: Proliferation von Rezeptor-WT/CBL-exprimierenden Zellen.....	49
Abb. 3.1.4: Apoptose von FLT3-WT/CBL-exprimierenden Zellen.....	50
Abb. 3.1.5: Internalisierung von Rezeptor-WT/CBL-exprimierenden Zellen.....	51
Abb. 3.1.6: CBL-Deletionsmutante führt zu einer stärkeren Phosphorylierung von RTK-Klasse-III-Rezeptoren.....	52
Abb. 3.1.7: PTK-Inhibition der etablierten Zelllinien.....	54
Abb. A1: Koexpression eines Kinase-inaktiven FLT3-Rezeptors.....	131
Abb. 3.1.8: Proliferation der Kinase-inaktiven FLT3-rezeptor-exprimierenden Zellen.....	55
Abb. 3.1.9.1: Expression der CBL-Mutanten und FLT3.....	57
Abb. 3.1.9.2: Proliferation und Apoptose der FLT3-WT/CBL-Varianten-koexprimierenden Zellen.....	57
Abb. 3.1.10: Mutationen in der LINKER- und RING-Finger-Domäne.....	58
Abb. 3.1.11: Mutationen in der LINKER-Domäne beeinträchtigen E3-Aktivität.....	59
Abb. 3.2.1: AKT ist stärker aktiviert in RTK-Klasse-III- und CBL-Mutante-koexprimierenden Zellen.....	61
Abb. 3.2.2: Pharmakologische Inhibitor der Signalwege.....	61
Abb. 3.2.3: Dephosphorylierung von AKT nach LY294002 Behandlung.....	63
Abb. 3.2.4: Immunblot-Analyse der CBL-Mutanten.....	64
Abb. 3.2.5: Pharmakologische Inhibition von CBL Δ exon8-transformierten FLT3-Zellen.....	65
Abb. 3.2.6.1: Immunblot-Analyse der FLT3/AKT-Zellen.....	66
Abb. 3.2.6.2: Einfluss von AKT-E17K auf Apoptose und Proliferation in FLT3-exprimierenden Zellen.....	67
Abb. 3.2.7: Immunblot-Analyse der durch FLT3 aktivierten Signalwege.....	68
Abb. 3.2.8: Pharmakologische Inhibition der AKT-Mutante.....	69
Abb. 3.2.9.1: Endogene Aktivierung von AKT in AML-Zelllinien.....	70
Abb. 3.2.9.2: PTK- mit PI3K/AKT-Inhibition in AML-Zelllinien.....	71
Abb. 3.3.1: Juxtamembranöse Domänen von Rezeptor-Tyrosinkinasen und CBL-Interaktionsmutanten.....	72
Abb. 3.3.2: Proliferation und Apoptose der CBL-Zellen mit FLT3-Varianten.....	73
Abb. 3.3.3: Proliferation und Apoptose der FLT3-WT-Zellen mit CBL-Varianten.....	74
Abb. 3.3.4: Internalisierung der FLT3-CBL-Interaktionsmutanten.....	75
Abb. 3.4: Chimäre Rezeptoren.....	76
Abb. A2: Expression der chimären Rezeptoren.....	131

Abb. 3.4.2: Wachstum und Apoptose der chimären Rezeptoren-exprimierenden Zellen.....	78
Abb. 3.4.3: Signalwege der chimären Rezeptoren.....	79
Abb. 3.4.4: Proliferation und Apoptose in Zellen mit chimären Rezeptoren und CBL-Mutation	80
Abb. 3.4.5: Pharmakologische Inhibition der chimären Rezeptoren/CBL Δ 8-Zellen.....	81
Abb. 3.4.6: Signalwege der chimären Rezeptoren/CBL Δ 8-Zellen.....	82
Abb. 3.5.1.1: FLT3-TKD-Mutation in ALL.....	83
Abb. A3: FLT3-D839N trägt nicht zur Transformation der SD-1-Zellen bei.....	132
Abb. 3.5.1.3: FLT3-D839N und BCR-ABL in Ba/F3-Zellen.....	86
Abb. 3.5.1.4: FLT3-D839N ist konstitutiv aktiviert.....	87
Abb. 3.5.1.5: PTK-Inhibition der FLT3-D839N/BCR-ABL-Zellen.....	88
Abb. 3.5.2: Expression von FLT3-TKD und -ITD in Ba/F3-Zellen.....	89
Abb. 3.5.2.1: Proliferation und Apoptose der FLT3-Mutanten.....	91
Abb. 3.5.2.2: Analyse der Signalwege der FLT3-Mutanten.....	92
Abb. 3.5.2.3: FLT3-Inhibition der TKD- und ITD-Zellen.....	93
Abb. 3.5.3: Duale HDAC- und FLT3-Inhibition in FLT3-ITD-transformierten Zellen.....	94
Abb. 4.2: Schema des FLT3-CBL-Signalweges.....	100
Abb. 4.4: Signalproteine als Interaktoren von FLT3.....	105

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Klassifizierung der myeloischen Neoplasien.....	2
Tabelle 2.1.1: Verwendete Vektoren.....	12
Tabelle 2.1.2: Verwendete Primer.....	14
Tabelle 2.1.3: Verwendete Zelllinien.....	17
Tabelle 2.1.4: Verwendete Antikörper.....	18
Tabelle 2.1.5: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen.....	19
Tabelle 2.1.6.1: Verwendete Chemikalien.....	21
Tabelle 2.1.6.2: Verwendete Enzyme.....	22
Tabelle 2.1.6.3: Verwendete Inhibitoren.....	22
Tabelle 2.1.6.4: Verwendete Zytokine.....	23
Tabelle 2.1.7: Verwendete Kitsysteme.....	23
Tabelle 2.1.8.1: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 2.1.8.2: Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	25
Tabelle 2.1.9: Verwendete Software.....	26
Tabelle 3.1.1: Rezeptoren und Liganden.....	44
Tabelle 3.1.8: Transformierender Phänotyp der CBL-Mutante CBL Δ exon8.....	56
Tabelle 3.1.11: CBL-Mutationen in CMML-Patienten.....	59
Tabelle 3.3.4: CBL-FLT3-Signalweg Interaktionsstellen.....	75
Tabelle 3.5.1.1: FLT3-Mutationsanalyse in Zelllinien und primären Proben.....	84
Tabelle 3.5.2.3: Phänotypen der transduzierten Mutationen.....	93

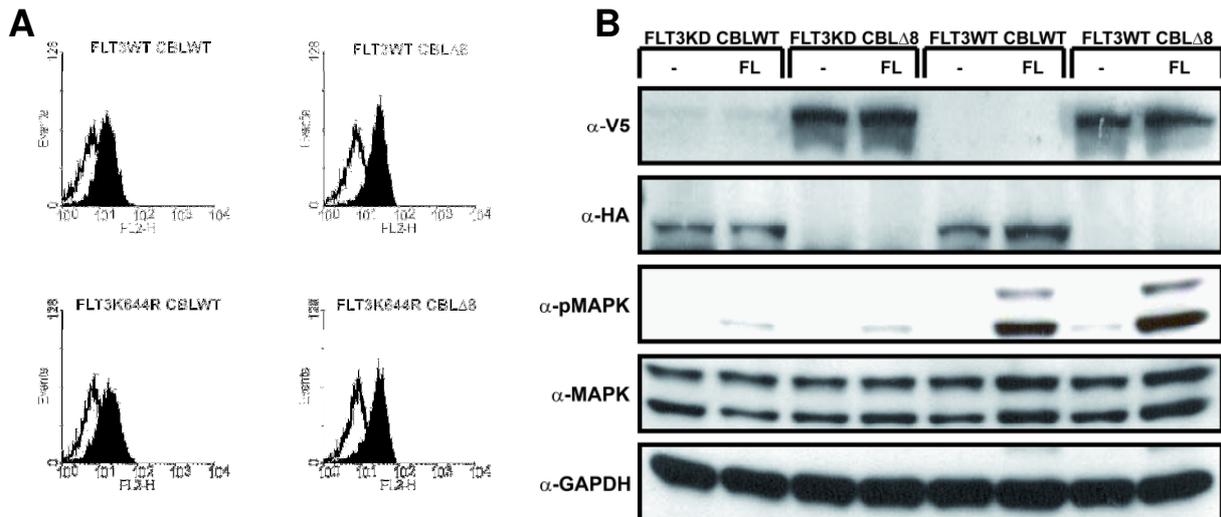


Abb. A1: Koexpression eines Kinase-inaktiven FLT3-Rezeptors. (A) Die Histogramme zeigen die Expression der FLT3-Rezeptoren (schwarz) in den stabilen Ba/F3-Zelllinien. (B) Die etablierten Zelllinien wurden 24 h ausgehungert und dann unstimuliert oder nach 10 minütiger Stimulation mit 100 ng/ml FL lysiert. Die Proteine der gewonnenen Ganzzelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf die Expression der CBL-Konstrukte und der Phosphorylierung von MAPK untersucht.

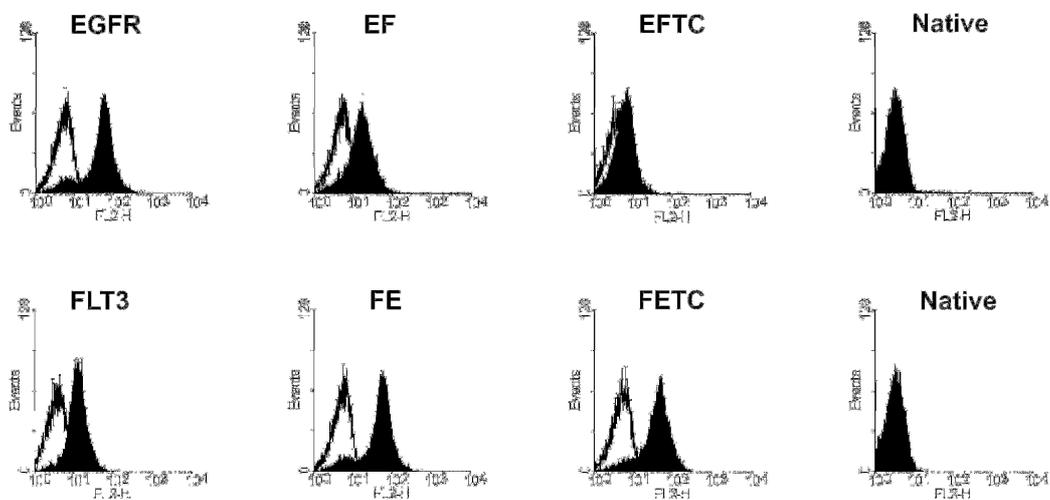


Abb. A2: Expression der chimären Rezeptoren. Die Expression der Rezeptoren in den etablierten Ba/F3-Zellen wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern über Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Histogramme zeigen die Expression der in die Zellen stabil eingebrachten Rezeptoren (schwarz) im Vergleich zur Isotypkontrolle (weiß).

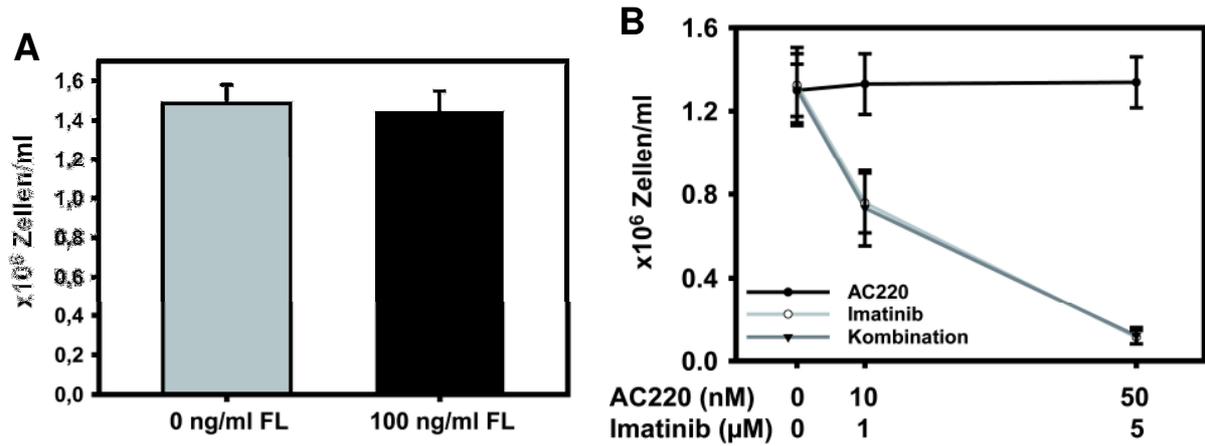


Abb. A3: FLT3-D839N trägt nicht zur Transformation der SD-1-Zellen bei. (A) Proliferation der SD-1-Zellen in Gegenwart von 100 ng/ml FL. (B) Proliferation von SD-1-Zellen mit FLT3-Inhibitor AC220 und BCR-ABL-Inhibitor Imatinib einzeln und in Kombination.

9 Danksagung

Vielen Dank...

- an Herrn Professor Karsten Spiekermann, der es mir ermöglichte die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Sowie für seine aktive Betreuung und Vorkorrektur dieser Arbeit.
- an Herrn Professor Dirk Eick für die Übernahme der offiziellen Betreuung und Korrektur dieser Arbeit.
- an meine Laborkollegen Carola, Diana, Verena, Nadine, Steffi, Jutta, Hanna, Judith, Werner und Daniel für die Hilfe im Labor und das angenehme Arbeitsklima.
- an alle anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der KKG Leukämie und AG Eick für die Hilfestellungen und die gute Atmosphäre: Grit, Yvonne, Marc, Medhanie, Anna, Sayan, Dity, Naresh, Belay, Sebastian, Philipp, Bianka, Sabrina, Kostj, Martin und Roland.
- an Bernhard und meinen Vater für die geduldige Korrektur meiner Arbeit.
- an meine Eltern und Julia für Ihre liebevolle Unterstützung in meinem Leben.

