

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Vergleichende Genexpressionsprofilierung zur Charakterisierung
zielgerichteter Krebstherapeutika an den Beispielen von
FLT3-Kinaseinhibitoren und anti-CD20-Antikörpern**

Andreas Franke
aus
Mühlhausen, Deutschland
2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 14.04.2014

.....

Dissertation eingereicht am: 05.06.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

2. Gutachter: Prof. Dr. Georg-Burkhard Kresse

Mündliche Prüfung am: 17.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Therapie maligner Neoplasien</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Zielstrukturen für Therapeutika im Rahmen dieser Arbeit</i>	<i>3</i>
1.2.1 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3	3
1.2.2 Der B-Zellmarker CD20	7
1.3 <i>Angewandte Technologien.....</i>	<i>10</i>
1.3.1 RNA-Interferenz.....	10
1.3.2 Vergleichende Expressionsanalyse als Mittel der funktionellen Charakterisierung	11
1.4 <i>Zielsetzung.....</i>	<i>12</i>
2 Material und Methoden.....	13
2.1 <i>Geräte</i>	<i>13</i>
2.1.1 Allgemeine Geräte	13
2.1.2 Geräte für die Zellkultur	13
2.1.3 Geräte für Absorptions-, Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen	13
2.1.4 Geräte für qPCR	13
2.1.5 Geräte für Affymetrix-Experimente	13
2.1.6 Geräte für Proteinanalysen.....	14
2.1.7 Geräte für die Durchflusszytometrie	14
2.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>14</i>
2.2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	14
2.2.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	14
2.2.3 Verbrauchsmaterialien für RNA-Isolierung und Real-Time-PCR	14
2.2.4 Verbrauchsmaterialien für Proteinanalytik	15
2.2.5 Verbrauchsmaterialien für Affymetrix-Analysen	15
2.3 <i>Reagenzien und Kits.....</i>	<i>15</i>
2.3.1 Allgemeine Reagenzien.....	15
2.3.2 Reagenzien und Kits für zellbiologische Experimente	15
2.3.2.1 Zellkulturmedien und –reagenzien.....	15
2.3.2.2 Reagenz für Proliferationstests.....	16
2.3.2.3 Transfektionsreagenzien.....	16
2.3.2.4 Reagenzien für die Durchflusszytometrie	16
2.3.2.5 Kinase-Inhibitoren	16
2.3.3 Allgemeine Reagenzien und Kits für molekularbiologische Experimente	17

2.3.4	Reagenzien und Lösungen für die Präparation der Affymetrix-Proben.....	18
2.3.5	Reagenzien und Kits für proteinbiochemische Experimente.....	19
2.3.5.1	Lyse und SDS-Gelelektrophorese	19
2.3.5.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	20
2.3.5.3	<i>Western Blot</i>	20
2.3.5.4	Primärantikörper.....	20
2.3.5.5	Sekundärantikörper für <i>Western Blot</i>	20
2.3.5.6	ELISAs	20
2.4	<i>Oligonukleotide</i>	21
2.4.1	siRNAs	21
2.4.2	Oligonukleotide für die qPCR	21
2.5	<i>Zelllinien</i>	22
2.6	<i>Software und Datenbanken</i>	22
2.7	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	23
2.7.1	Quantitative PCR (qPCR).....	23
2.7.1.1	Aufreinigung von Gesamt-RNA.....	23
2.7.1.2	cDNA-Synthese.....	23
2.7.1.3	Quantitative PCR / <i>Real time</i> PCR	23
2.7.2	Probenvorbereitung für die Expressionsprofilierung.....	24
2.7.2.1	cDNA-Synthese.....	24
2.7.2.2	Aufreinigung der cDNA	24
2.7.2.3	<i>In-vitro</i> -Transkription	24
2.7.2.4	Fragmentierung und Hybridisierung.....	24
2.8	<i>Zellbiologische Methoden</i>	25
2.8.1	Zellkultur	25
2.8.2	Viabilitätsbestimmung.....	25
2.8.3	Transfektionen	26
2.8.4	Durchflusszytometrie	26
2.9	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	26
2.9.1	Gewinnung von Zelllysaten.....	26
2.9.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA)	26
2.9.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.9.4	Western Blotting.....	27
2.9.5	ELISA.....	28
2.10	<i>Analyse der Genexpression</i>	28
2.10.1	Filterung und Funktionelle Analysen	28
2.10.2	<i>Gene set enrichment analysis</i> (GSEA).....	29

3	Ergebnisse	31
3.1	<i>FLT3-Modulation mit niedermolekularen Substanzen und siRNAs</i>	31
3.1.1	Expressionsprofilierung von Zelllinien	31
3.1.2	Charakterisierung der siRNAs gegen FLT3.....	32
3.1.2.1	Herunterregulation von FLT3-mRNA und -Protein durch FLT3-siRNAs.....	32
3.1.2.2	Viabilität und Proliferation von MV4;11-Zellen werden durch FLT3-siRNAs stark beeinträchtigt	35
3.1.2.3	Auswirkungen der FLT3-siRNAs auf die Zellmorphologie und Zellzyklus	35
3.1.2.4	FLT3-siRNA induzierte Genexpressionveränderungen bei der Zelllinie MV4;11	37
3.1.2.5	Analysen zur Aktivität und Expression von Transkriptionsfaktoren	45
3.1.3	Charakterisierung der niedermolekularen Kinaseinhibitoren.....	48
3.1.3.1	Hemmung der rekombinanten FLT3-Kinase (biochemischer Test).....	48
3.1.3.2	Hemmung der FLT3-Aktivierung.....	49
3.1.3.3	Ermittlung der zellulären IC50 (Proliferationstest)	51
3.1.3.4	Genexpressionsanalyse bei MV4;11 nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren	52
3.1.3.5	Vergleich der frühen Transkriptionsänderungen nach Behandlung mit Inhibitoren bzw. FLT3-siRNAs.....	60
3.1.3.6	Extrapolation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch die Behandlung mit Kinaseinhibitoren	64
3.2	<i>Aktivieren Antikörper gegen CD20 die B-Zell-Rezeptor-Kaskade?</i>	67
3.2.1	Transkriptionsänderungen bei verschiedenen Zelllinien nach Behandlungen mit anti-B-Zell-Rezeptor-Antikörpern.....	67
3.2.2	Transkriptionsänderungen nach Behandlung mit Antikörpern gegen CD20	70
3.2.3	Vergleich der Expressionsänderungen nach anti-CD20-Behandlung und nach anti-BCR-Behandlung.....	70
3.2.4	Vergleich der Aktivierungsmuster in verschiedenen Zelllinien	72
3.2.5	Einfluss der SYK-Inhibition und der siRNA-vermittelten SYK-Repression auf die Behandlung mit Antikörpern gegen CD20 bzw. den BCR.....	76
4	Diskussion	79
4.1	<i>FLT3-Inhibition</i>	79
4.1.1	Charakterisierung der verwendeten Inhibitoren.....	80
4.1.2	RNAi als spezifische Modulation	85
4.1.3	Hierarchische Clusterbildung zur Ermittlung der relativen Ähnlichkeit	88
4.1.4	Die Expressionsprofile der Behandlungen mit FLT3-siRNAs sind spezifisch	91
4.1.5	Die FLT3-Inhibition induziert Differenzierung und einen <i>Kinase Switch</i>	92
4.1.6	FLT3- und PIM1-Expression beeinflussen sich gegenseitig	92
4.2	<i>Die Signalwege downstream von CD20 und BCR interferieren</i>	94
4.2.1	Anti-IgM/IgG-Antikörper aktivieren den BCR-Signalweg.....	94

4.2.2	Der anti-CD20-Antikörper-induzierte Signalweg umfasst Komponenten des BCR-Signalwegs.....	95
4.3	<i>Vergleich von Expressionsmustern</i>	97
4.4	<i>Ausblick</i>	100
5	Zusammenfassung	101
6	Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	102
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	103
8	Literaturverzeichnis	107
9	Appendix	121
9.1	<i>Ermittlung der zellulären IC50 der Inhibitoren auf MV4;11 und RS4;11-Zellen</i>	121
9.2	<i>Listen der Genexpressionsprofilierung (downstream)</i>	122
9.2.1	Differenziell exprimierte Gene in der Zelllinie RS4;11 (FLT3-Wildtyp) nach Behandlung mit der FLT3-siRNAs	122
9.2.2	MV4;11 und FLT3-siRNAs (Behandlungsdauer 24 Stunden)	123
9.2.3	<i>Downstream-Funktionen bei 24-stündiger Behandlung von MV4;11 mit verschiedenen Inhibitoren</i>	136
9.3	<i>Extrapolierte Aktivität von Transkriptionsregulatoren, Kinasen und Phosphatasen</i>	137
9.3.1	Extrapolierte Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren nach 24-stündiger Behandlung bei der Zelllinie MV4;11	137
9.3.2	Extrapolierte Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung	143
9.3.3	Extrapolierte Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren nach vier-, acht- bzw. 16-stündiger Behandlung	145
9.4	<i>Gene set enrichment-Analysen</i>	150
9.5	<i>Schnittmengen der Transkriptionsmuster der Behandlungen mit Kinaseinhibitoren</i>	151

1 Einleitung

1.1 *Therapie maligner Neoplasien*

Im Jahr 2005 galten 13 % der weltweiten Todesfälle als krebsbedingt (Giamas et al., 2007). In Deutschland scheint sogar ein Viertel aller Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückzuführen zu sein (Wolf et al., 2011). Bei den meisten Krebsarten (außer Krebserkrankungen der Lunge, des Larynx und des Ösophagus bei Frauen bzw. Leberkrebs und Non-Hodgkin-Lymphomen bei Männern) werden zwar seit einem Jahrzehnt leicht sinkende Mortalitätsraten beobachtet. Nur bei wenigen Krebsarten, (wie Magenkrebs bei beiden Geschlechtern und Lungenkrebs bei Männern) sinken auch die Inzidenzraten. Bei den meisten Krebsarten bleiben sie konstant und bei einigen, wie Lungenkrebs bei Frauen und Prostatakrebs bei Männern, steigen die Inzidenzraten sogar an (Becker et al., 2007). Die Gründe für diese entgegengesetzte Bewegung der Raten sind je nach Krebsart entweder Prävention, frühere Diagnose- und verbesserten Behandlungsoptionen (Becker et al., 2007).

Als Ursachen für das Auftreten maligner Neoplasien gelten so unterschiedliche Faktoren wie vererbte und erworbene Mutationen, epigenetische Modifikationen oder Viren und deren Kombination. Jedoch sind die genauen molekularen Zusammenhänge, wie Zellen entarten und sich daraus - meist über einen längeren Zeitraum - eine Krebserkrankung entwickelt, selten genau bekannt. Darüber hinaus sind auch die Zellen eines Tumors aufgrund der genomischen Instabilität, unterschiedlichen Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und der unmittelbaren Umgebung im Gewebe (*tumor microenvironment*) heterogen. Allerdings weisen alle Tumor- und Leukämiezellen (mit Ausnahme der „ruhenden“ Tumorzellen / *dormant tumor cells*) einige übereinstimmende Merkmale wie ständige Proliferations-Signalgebung, Resistenz gegen Zelltod, Erreichen replikativer Immortalität, Invasion und Metastasierung auf (Hanahan & Weinberg, 2011).

Bei der Zytostatikatherapie setzt man daher auf die Konsequenz dieser Gemeinsamkeiten: eine gegenüber den meisten gesunden Körperzellen erhöhte Teilungsrate. Da aber auch einige gesunde Zellarten wie blutbildende Zellen eine erhöhte Teilungsrate aufweisen, werden diese bei Therapien mit Paclitaxel, Anthracyclinen und/oder Cytarabin besonders beeinträchtigt, sodass die Nebenwirkungen oft gravierend sind (Daver & Cortes, 2012). Um diese unerwünschten Nebenwirkungen zu minimieren, werden seit einigen Jahren analog zu Paul Ehrlichs Konzept der „magischen Kugel“ gegen Mikroorganismen, zielgerichtete Alternativen wie niedermolekulare Inhibitoren, monoklonale Antikörper, Peptid-Mimetika und inhibitorische Oligonukleotide entwickelt. Dies setzt aber voraus, dass die Zielstrukturen und ihre Bedeutung für die jeweilige Zelle gut bekannt sind. Daher wird u. a. mit der Suche auf Genomebene versucht, zusätzlich zu den bekannten, neue relevante somatische Mutationen zu finden (Greenman et al., 2007).

Im Sinne einer personalisierten Medizin mündet dies in der Hoffnung, dass Patienten anhand einer maßgeschneiderten Diagnostik optimal stratifiziert werden können, um die für sie beste, adäquate Therapie zu erhalten. Besonderes Augenmerk gilt dabei den prädiktiven Biomarkern bzw. Zielstrukturen wie Überexpressionen (ERBB2/Her2 neu), aktivierenden Mutationen (FLT3-ITD, BRAF V600E, EGFR und KRAS) sowie aktivierten Fusionsprodukten (EML4-ALK und BCR-ABL) (Ong et al., 2012).

Von den unerwünschten Wirkungen abgesehen, stellen Resistenzen und damit einhergehend eine nur zeitweilige Remission das größte Problem sowohl bei konventionellen Radio- oder Chemotherapien wie auch zielgerichteten Therapien dar. So werden nur knapp die Hälfte der unter 60-jährigen und sogar nur 10 bis 20 % der über 60-jährigen Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) dauerhaft geheilt (Daver & Cortes, 2012). Bei Radio- und Chemotherapien wird dann meist versucht die Intensität zu erhöhen, um dadurch die Resistenz der Krebszellen zu überwinden. Auch bei zielgerichteten Therapien kommt es vor, dass sie gar nicht, nicht mehr oder nur teilweise zum Erfolg führen. So werden beispielsweise Imatinib (Glivec®) bzw. dessen Nachfolger Nilotinib (Tasigna®) und Dasatinib (BMS-354825 / Sprycel®) sehr erfolgreich bei der Behandlung von BCR-ABL-assoziiierter Chronische Myeloische Leukämie (CML) und KIT-abhängigen gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eingesetzt. Jedoch wurden auch hier Resistenzen beobachtet, ebenso gegen Inhibitoren der EGFR-Familie wie Erlotinib (Tarceva®), Lapatinib (Tyverb®) oder Gefitinib (Iressa®) (Quintas-Cardama et al., 2007).

Wie solche Resistenzen gegen Therapeutika entstehen, ist noch unverstanden. Grundlegende Erklärungsansätze gehen davon aus, dass das Zielprotein für die Tumore z. B. aufgrund klonaler Selektion nicht mehr kritisch ist, dass die Zielstruktur nur unvollständig gehemmt oder in den Krebszellen ein alternativer Signalweg (*bypass*) aktiviert wird (Moore et al., 2012; Sullivan & Flaherty, 2013).

Um Resistenzen gegen Kinaseinhibitoren vorzubeugen, versucht man daher mittlerweile u. a. auch Inhibitoren zu finden, die nicht nur eine bestimmte Kinase (und ihre Mutanten) hemmen, sondern ein ganz definiertes Inhibitionsprofil aufweisen (Gossage & Eisen, 2010). Allerdings ist es bisher sehr aufwändig die Inhibitoren mit dem richtigen Profil zu finden, da die meisten Kinaseinhibitoren verschiedene Kinasen (in unterschiedlichem Ausmaß) hemmen. Eine Möglichkeit diesen Aufwand zu reduzieren, verspricht ein Phagen-Display-Ansatz, mit dem *in vitro* die Kinasehemmung getestet werden kann (Fabian et al., 2005). Dies könnte die Hochdurchsatz-Profilierung von Inhibitoren verbessern, indem die Potenz und die Selektivität eines potentiellen Wirkstoffes gleichzeitig bestimmt werden, und dazu dienen, eben jene Inhibitoren mit definiertem Inhibitionsmuster auszuwählen (Goldstein et al., 2008). Hierbei stellt allerdings die Beschränkung des Blickfeldes auf Kinasen ein nicht unerhebliches Problem dar, da potentielle Wechselwirkungen mit anderen Molekülen (z. B. Cytochrom P450 / CYPs oder *multidrug resistance pumps* / MDR) mit dieser Art des Screening nicht erfasst werden.

Jedoch beeinflussen besonders diese Efflux-Transporter wie das p-Glycoprotein ABCB1 (MDR1 / multidrug resistance protein 1) und ABCC1 (MRP1 / multidrug resistance-associated protein 1) sowie ABCG2 (BCRP / Breast cancer resistance protein), dessen Einfluss noch umstritten ist, die Aufnahme der Wirkstoffe im Darm und somit die Wirksamkeit auf Tumore und leukämische Zellen (Kappelmayer et al., 2007; Lemos et al., 2008). Auch Plasmaproteine wie AAG (alpha-1-acid glycoprotein) spielen für die Wirksamkeit verschiedener Wirkstoffe wie Tyrosinkinaseinhibitoren eine große Rolle (Fournier et al., 2000; Kretz et al., 2004; McKillop et al., 2004), weil das Gleichgewicht von „an AAG gebundenen“ und „freien“ Wirkstoffen durch andere Wirkstoffe, die die gleiche Bindungsstelle besetzen, verschoben werden kann. Bei der Etablierung von Kombinationstherapien können solche Interaktionen zwischen spezifischen Inhibitoren, Zytostatika und körpereigenen Proteinen

problematisch werden, wenn sie schwere toxische (Neben-) Wirkungen verursachen oder die Wirkung der Medikamente ungünstig beeinflussen (Chassany et al., 1996; Pratz & Levis, 2008).

Ein gravierendes Problem des traditionellen Suchens nach und Bewertens von Wirkstoffen (*Screening*) ist, dass es sich um einen linearen Prozess handelt. Mittels Bindestudien mit rekombinanten Proteinen, Zellkulturversuchen und Phosphorylierungstests werden zuerst die pharmakodynamischen Aspekte überprüft, um sicherzustellen, dass die Substanzen entsprechend dem ihnen zugeschriebenen Mechanismus wirken. Anschließend wird versucht, die pharmakokinetischen Interaktionen und Toxizität für die Anwendung im Menschen durch Studien mit (chimären) Maus- und Affen-Modellen vorherzusagen (Kitamura & Sugihara, 2014). Die Ergebnisse solcher Studien sind jedoch nur begrenzt auf den Menschen übertragbar und derzeit Gegenstand der Diskussion (Basketter et al., 2012). Schließlich wird in drei klinischen Phasen die Wirksamkeit am Patienten überprüft und die Dosierung ausgetestet. Allerdings zeigen 89 % der in die klinischen Phasen eingegangenen Prüfmedikamente keine ausreichende Wirksamkeit oder sehr starke unerwünschte und unerwartete Nebenwirkungen, sodass sie nicht die Marktreife erreichen. In der Onkologie liegt diese Ausfallrate sogar bei 95 % (Kola & Landis, 2004).

Nicht nur im Sinne der Kostenersparnis für Pharmaunternehmen sondern vor allem für die an den Studien teilnehmenden Patienten ist es dringend erforderlich, hier eine höhere Erfolgsrate zu erzielen. Daher ist für die potentiellen Medikamente früher als bisher eine funktions- bzw. therapierelevante Charakterisierung nötig.

Die Technologie der Expressionsprofilierung kann dabei helfen, nicht nur die Wechselwirkungen eines Wirkstoffes mit vorher definierten, einzelnen Molekülen, sondern seine integrierten Effekte auf die Zellen zu untersuchen. Zwar beschränkt man sich auch dabei auf die zelluläre Ebene während organismische Auswirkungen unbeachtet bleiben. Allerdings kann die Expressionsprofilierung eine Stufe dahin sein, dass zukünftig neue Therapeutikagenerationen durch die Integration aller relevanten Informationen mit systembiologischen Ansätzen (Transcriptomics zusammen mit den Proteomics- und Methyloomics-Daten) zu Wirkstoff-Zielmolekül-Netzen (*drug-target network*) entwickelt werden (Yildirim et al., 2007).

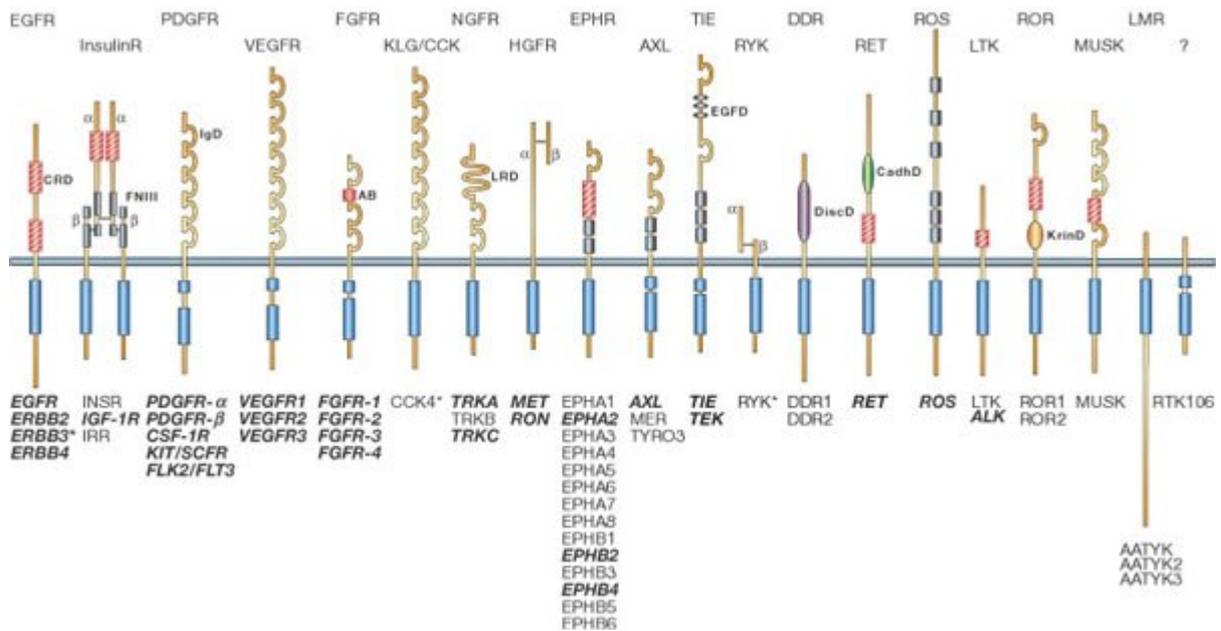
1.2 Zielstrukturen für Therapeutika im Rahmen dieser Arbeit

1.2.1 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

Von den ca. 32000 proteinkodierenden Genen des menschlichen Genoms sind ca. 20 % an Signalweiterleitungsprozessen beteiligt. Signale von der Zelloberfläche werden u. a. über verschiedene Pfade bzw. Netzwerke von Kinasen in den Zellkern weitergeleitet und verändern dort die Transkription responsiver Gene (Fambrough et al., 1999; Pawson & Saxton, 1999).

Die meisten der 518 bekannten humanen Kinasen phosphorylieren entweder die Seitenketten der Aminosäuren Serin bzw. Threonin oder Tyrosin, manche auch beide (Manning et al., 2002). Die 58 membranständigen Tyrosinkinasen werden aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in ca. 20 Familien eingeteilt, die 32 zytosolischen in zehn Familien (siehe Abbildung 1.2-1).

A



B

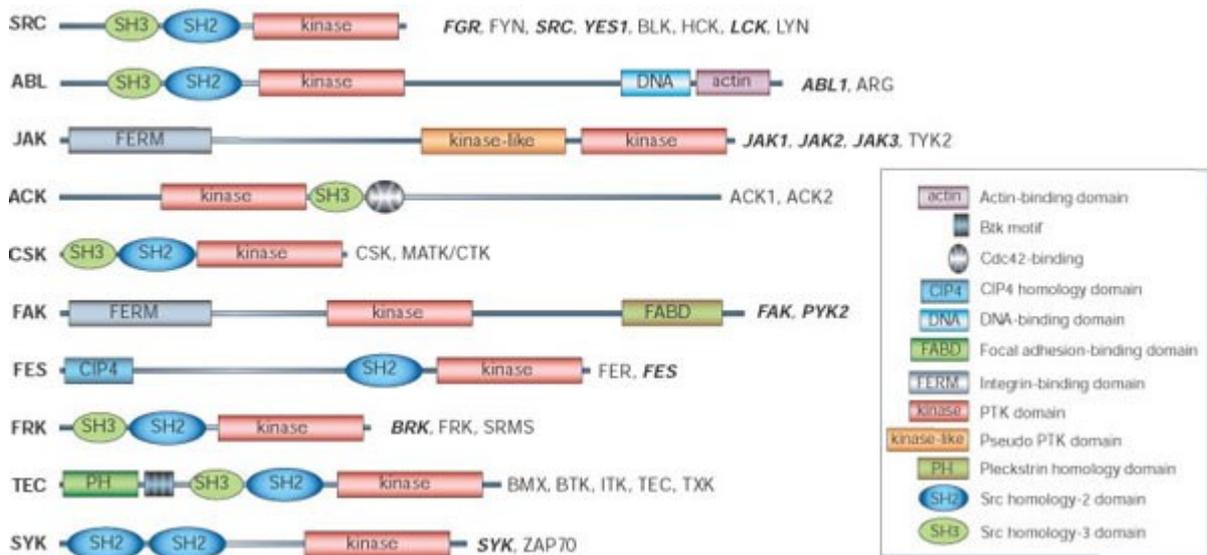


Abbildung 1.2-1: Überblick über die humanen Tyrosinkinasen

A: Rezeptortyrosinkinasen B: zytoplasmatische Kinasen Die Kinasen oberhalb (bei A) bzw. links (bei B) der jeweiligen schematischen Darstellung stellen den Prototyp der entsprechenden RTK-Familie dar. Einzelne Mitglieder sind bei A) darunter und bei B) rechts davon angegeben. (Blume-Jensen & Hunter, 2001)

Zur Klasse III der Rezeptortyrosinkinasen gehört neben PDGFRA, PDGFRB, KIT und CSF1R auch die Kinase FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) (Rosnet & Birnbaum, 1993). Für letztere wurden zwei Glyco-Formen beschrieben: eine stark glycosylierte, reife, membranständige Form und eine nicht glycosylierte, unreife, zytoplasmatische Form (Lyman, 1995). Strukturell wird FLT3 in eine extrazelluläre Domäne für die Ligandenbindung, eine Transmembrandomäne und zwei intrazelluläre Domänen, die Juxtamembran- und die Kinasedomäne, unterteilt.

Die Kinasedomäne ist wiederum durch eine Insertion geteilt, weshalb FLT3 auch zur Gruppe der „*split-kinase domain*“-Rezeptortyrosinkinasen gezählt wird. Diese Gruppe umfasst neben der PDGFR-Familie auch die VEGFR- und FGFR-Familien. Aufgrund dieser engen Verwandtschaft hemmen niedermolekulare Inhibitoren, welche die ATP-Tasche blockieren, neben FLT3 oft auch andere Mitglieder dieser Gruppe (Fabian et al., 2005).

Funktionell ist die Kinase FLT3 für die normale Hämatopoese essentiell, da sie an der Differenzierung, der Proliferation und dem Überleben von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen und lymphoiden sowie dendritischen Vorläuferzellen beteiligt ist (Hieronymus et al., 2008; Lyman & Jacobsen, 1998; Mackarechtschian et al., 1995). Mit fortschreitender Differenzierung dieser Zellen geht die FLT3-Expression normalerweise zurück (Rappold et al., 1997).

Die Wildtyp-FLT3-Kinase wird durch die Bindung des Liganden FLT3LG und damit verbundene Dimerisierung aktiviert (siehe Abbildung 1-2). Der FLT3-Ligand wird in der Regel von im Knochenmark ansässigen Stromazellen sekretiert. Bei Leukämiezellen kann jedoch eine autokrine Stimulation des Liganden eine konstitutiven Aktivierung der Kinase bewirken (Zheng et al., 2004).

Bei Zellen mit mutierten FLT3-Rezeptoren, z. B. mit D835-Mutationen oder mit einer Tandem-Duplikation in der Juxtamembran-Domäne (*internal-tandem-duplication* / ITD) ist die Bindung des Liganden hingegen nicht notwendig, da diese Kinasen liganden-unabhängig dimerisieren, autophosphorylieren und somit konstitutiv aktiv sind (Kiyoi et al., 1998). Mechanistisch liegt dem zugrunde, dass die ITD-Mutation in diesem Bereich eine Autoinhibition verhindert, während beim Wildtyp-FLT3 im monomeren Zustand ebenjene Juxtamembran-Domäne die Kinase-Aktivität inhibiert (Griffith et al., 2004; Hubbard, 2001; Stirewalt & Radich, 2003).

Die intrazelluläre Signaltransduktion von FLT3 ist komplex und nur unvollständig verstanden, da sowohl der Jak (Januskinase)/STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5)-, als auch der MAPK (Ras/mitogen-aktivierte Proteinkinase)- und der PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase)-Weg beteiligt zu sein scheinen (Fenski et al., 2000; Hayakawa et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Tse et al., 2000).

Auch der Mechanismus der FLT3-assoziierten Transformation ist noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Autoren sind der Ansicht, dass sich das *Signalling* von mutiertem, konstitutiv aktivem FLT3 von dem des Wildtyp-Rezeptors unterscheidet. Beispielsweise ist STAT5 in BaF3 und 32D Zellen, die mit konstitutiv aktiven FLT3-Konstrukten transfiziert wurden, konstitutiv phosphoryliert. Wenn die Zellen aber mit Wildtyp-FLT3 transfiziert und anschließend mit FLT3-Ligand stimuliert wurden, scheint STAT5 nicht phosphoryliert zu werden. Des Weiteren unterscheiden sich vermutlich auch die zellulären Signalwege der Mutationen in der FLT3-Tyrosinkinasedomäne (TKD) von denen bei der FLT3-ITD (Baud & Karin, 2009; Choudhary et al., 2005b; Lu et al., 2007; Schmidt-Arras et al., 2004). Inwieweit diese Erkenntnisse auf reale Leukämiezellen zutreffen, bleibt offen, da sie fast ausschließlich *in vitro* an transfizierten Zelllinien gewonnen wurden und die Verknüpfungen von Rezeptoren mit den nachgeschalteten Signalkaskaden zelltypabhängig ist.

Gesichert scheint, dass der liganden-aktivierte FLT3-Signalweg via PI3K/AKT die pro-apoptischen Proteine BIM und CDKN1B (p27KIP1) phosphoryliert und somit reprimiert, sowie den

Transkriptionsfaktor FOXO3 aktiviert (Jonsson et al., 2004). Die Signaltransduktion von FLT3 mit der ITD-Mutation führt über die Repression der typisch myeloischen Transkriptionsfaktoren SPI1 (Pu.1) und CEBPA (C/EBP α) zur Blockade der myeloiden Differenzierung (Mizuki et al., 2003; Zheng & Small, 2005).

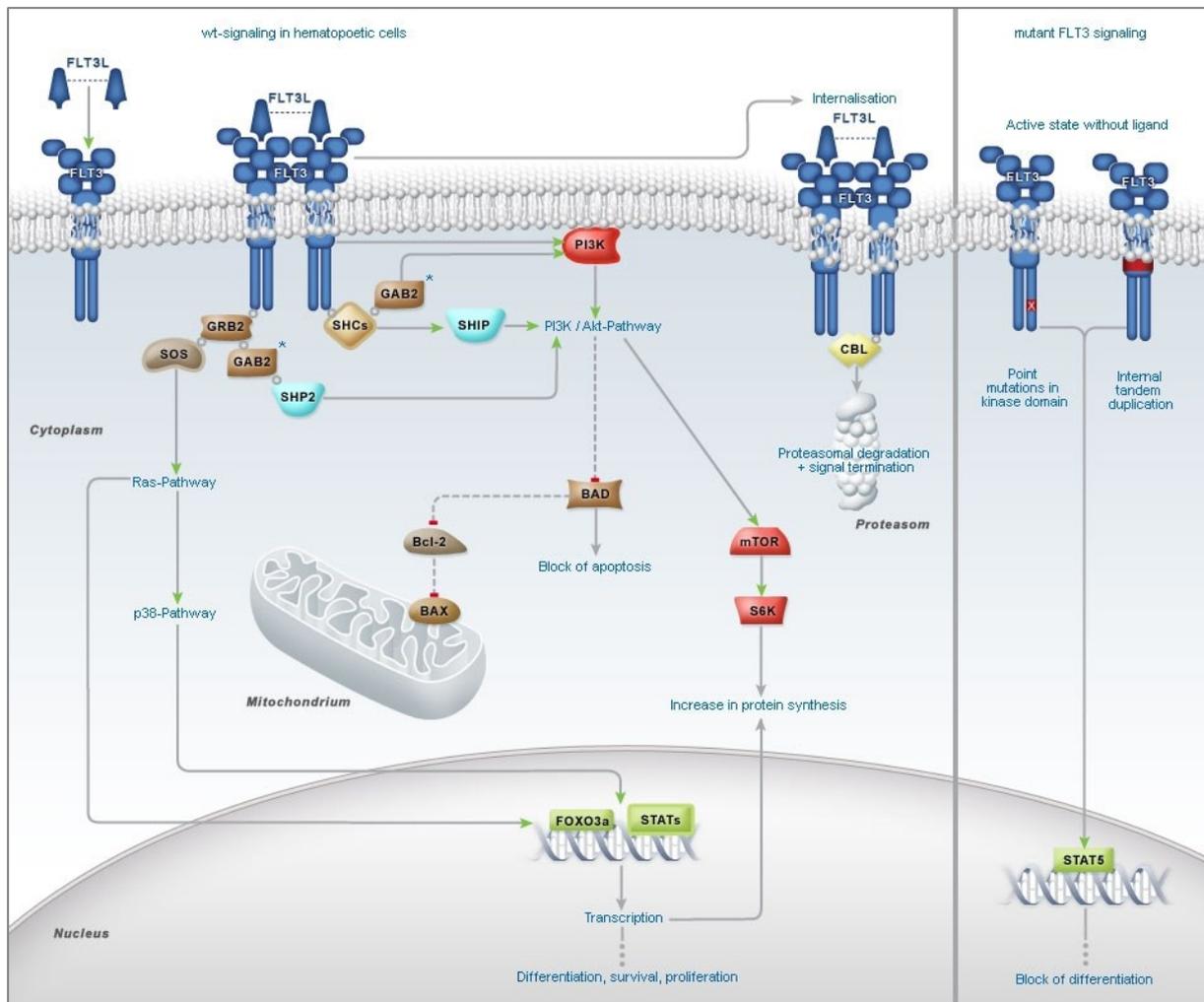


Abbildung 1.2-2: Signalweiterleitung von FLT3

modifiziert nach (Choudhary et al., 2005a; Stirewalt & Radich, 2003)

Klinische Bedeutung erlangt die Kinase FLT3 dadurch, dass mit einer Überexpression oder dem Auftreten einer Mutation eine schlechte Prognose verbunden ist (Birg et al., 1992; Carow et al., 1996). Bei 5 bis 10 % der Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) wurden *missense*-Punkt-Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne (TKD) detektiert: diese *gain-of-function*-Mutationen betreffen vor allem die Aminosäuren D835 oder I836, sowie N841H oder K663Q (Schittenhelm et al., 2006; Yamamoto et al., 2001).

Bei 17 bis 34 % der AML- und ALL-Patienten (Akute Lymphoblastische Leukämie) sowie bei 5 % der Patienten mit einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) wurden Duplikationen zwischen drei und 400 Nukleotiden (ITD) gefunden (Gilliland & Griffin, 2002; Nakao et al., 1996; Yokota et al., 1997).

Mit derzeitigen Standardtherapien erleiden ca. 16 % der Patienten ohne ITD-Mutation innerhalb von zwei Jahren nach der ersten Komplettremission einen Rückfall, hingegen 30 % der Patienten mit einer ITD-Mutation (Brunet et al., 2012).

Die Art der FLT3-Mutation ist auch für die Wirksamkeit der spezifischen Inhibitoren entscheidend. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die IC50s des Inhibitors MLN518 (Tandutinib von Millenium Pharmaceuticals) für die Mutationen D835Y und D835V im Vergleich zu ITD 20-fach höher sind (Clark et al., 2004) und dass die Mutation N676D eine Resistenz gegenüber PKC412 (Midostaurin von Novartis) verursacht (Heidel et al., 2006).

In den klinischen Phasen zur Therapie der FLT3-ITD-abhängigen Leukämien erwiesen sich bereits AC-220 (Quizartinib), CEP701 (Lestaurtinib), PKC412 (Midostaurin), MLN-518 (Tandutinib), SU11248 (Sunitinib) und BAY43-9006 (Sorafenib) als wirksam (Daver & Cortes, 2012; Tam & Gilliland, 2008). Verglichen mit den Kontrollgruppen verlängerte jeder dieser Inhibitoren in Kombination mit Zytostatika die Überlebenszeit der Patienten signifikant. Anders als bei der durch BCR/ABL verursachten CML, bei der jede Zelle die mutierte Kinase trägt, kann sich bei der AML der Status der FLT3-Kinase im Laufe der Therapie ändern, d.h. eine ITD-Mutation kann erworben werden, erhalten bleiben oder verloren gehen (Park et al., 2011) Vielleicht ist dies ein Grund dafür, dass hier bisherige Monotherapien keine durchschlagenden Erfolge gezeigt haben.

Die oben genannten Inhibitoren hemmten zwar als Monotherapie die FLT3-Aktivität (mit/ohne ITD) auch im Patienten und führten dort zu einer starken Reduktion der Blasten im Blut, aber weniger im Knochenmark (Fathi & Chabner, 2011). Für die höhere Resistenz der Blasten im Knochenmark könnten die lokalen Gegebenheiten (*microenvironment*) verantwortlich sein, da die dort vorhandenen Wachstumsfaktoren und Stromazellen die Blasten vor mit anti-apoptotischen Signalen schützen, während den Zellen im peripheren Blut diese Unterstützung fehlt (Mony et al., 2008). Um die Wirkung von FLT3-Inhibitoren zu verbessern, könnte man versuchen, die Blasten im Knochenmark zu mobilisieren (Tam & Gilliland, 2008), oder gleichzeitig weitere Signalwege zu blockieren. So zeigte Kombination des FLT3-Inhibitors Sunitinib (SU11248) mit einem MEK/ERK-Inhibitor eine deutlich stärkere Wirkung als die Einzelbehandlungen (Nishioka et al., 2008).

Somit scheint es für die Behandlung der FLT3-assoziierten AML erforderlich zu sein, dass ein FLT3-spezifischer Inhibitor mit anderen Kinaseinhibitoren oder Chemotherapeutika kombiniert wird oder dass der Inhibitor neben FLT3 auch bestimmte andere Kinasen hemmt, um eine Komplettremission zu erreichen und ein Rezidiv aufgrund einer Resistenz zu verhindern (Levis et al., 2004; Pratz & Levis, 2008; Yee et al., 2004).

1.2.2 Der B-Zellmarker CD20

CD20 (MS4A1) ist ein B-Zell spezifisches Oberflächenprotein mit vier Transmembran-Domänen und bisher ohne bekannten Liganden und ohne bekannte Funktion. Obwohl es sich strukturell um einen Calciumkanal handeln könnte, deuten verschiedene Beobachtungen funktionell auf eine Verbindung zum B-Zell-Rezeptor (B-cell-receptor / BCR) hin (Eeva & Pelkonen, 2004; Mayumi et al., 1995; Mimori et al., 2003; Mizuno & Rothstein, 2005a; Mizuno & Rothstein, 2005b; Shan et al., 2000).

Der BCR ist ein multimerer Proteinkomplex, der zwei membranständige Immunglobulinmoleküle und die Ko-Rezeptoren CD79A und CD79B sowie weitere Adaptorproteine enthält (Chaouchi et al., 1995). Die durch Antigenbindung aktivierte BCR-Signalkaskade ist der zentrale Taktgeber in der Entwicklung von B-Zellen (Harwood & Batista, 2008). Aufgrund der Komplexität der nachgeschalteten Signalkaskaden kann eine Aktivierung zu verschiedenen Ergebnissen führen: Abhängig vom Reifegrad der B-Lymphozyten, der zellulären Umgebung und der dadurch bedingten Modulation dieser Signalkaskade durch andere (CD19, CD22, CD32, CD40, CD45, PIRB) kann eine BCR-Aktivierung zur Proliferation, Differenzierung, Toleranz, Überleben oder Apoptose führen (siehe Abb. 1-3). Zusätzlich spielen Ausmaß und Dauer der BCR-Aktivierung eine Rolle (Batlle et al., 2009).

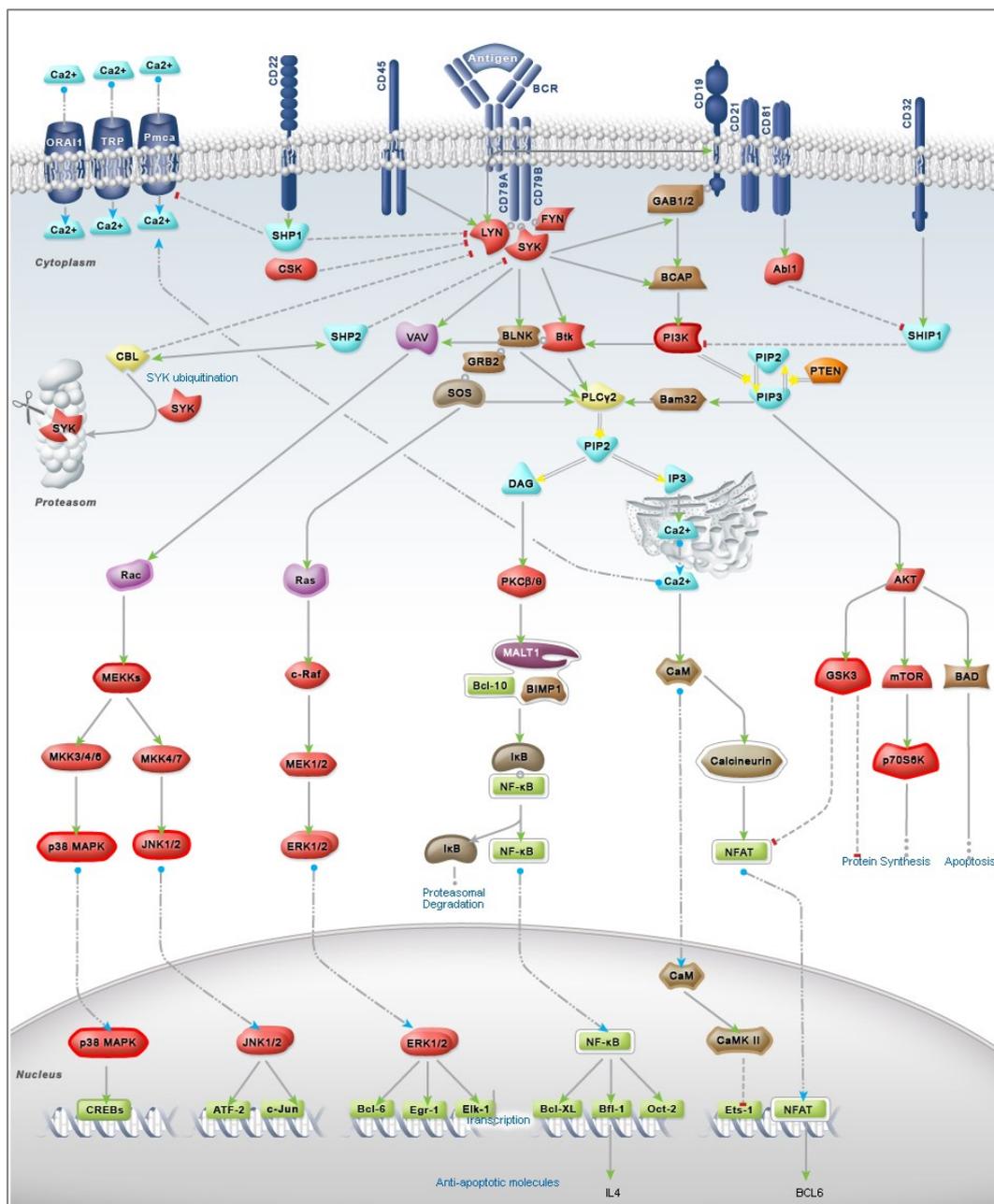


Abbildung 1.2-3: Signalnetzwerk des B-Zell-Rezeptors

Zusammengestellt aus (Niiri & Clark, 2002; Scupoli & Pizzolo, 2012)

Es ist seit langem bekannt, dass Zellen in Kultur sterben, wenn BCRs aneinander gebunden werden und wenn CD20-Moleküle über Antikörper miteinander gekoppelt werden. Inwieweit CD20 und BCR jedoch miteinander in Verbindung stehen ist noch unvollständig verstanden. Interessanterweise werden in Anwesenheit anti-apoptotischer Faktoren wie BAFF (TNFSF13B) die pro-apoptotischen Wirkungen beider Wege blockiert (Kheirallah et al., 2010; Saito et al., 2008). Immunfluoreszenzexperimente legen eine Ko-Lokalisation von BCR und CD20 in detergentien-resistente Membranbereiche (*lipid rafts*) nahe (Petrie & Deans, 2002) und Kopräzipitationen deuten sogar auf direkte Kontakte zwischen ihnen hin (Polyak et al., 2008). Ähnlichkeiten der stimulationsabhängigen Phosphoprotein-Muster führten zu der Vermutung, dass ein von CD20 ausgehender Signalweg eventuell auch Komponenten des BCR-Signalweges umfasst (Walshe et al., 2008). Auch am Ende der Signalwege, auf Transkriptionsebene, scheint es Übereinstimmungen zu geben: So wurden nach Behandlung mit anti-CD20- bzw. anti-BCR-Antikörpern für sechs Gene gleichartige Änderungen beobachtet (Mathas et al., 2000).

Da, von wenigen bekannten Ausnahmen abgesehen, Antikörper im Allgemeinen keine Schalter für Signalkaskaden der Zielzelle sind, ist es bemerkenswert, dass sowohl anti-CD20- wie auch anti-BCR-Antikörper Signaltransduktionswege aktivieren und dass diese Kaskaden eventuell sogar interagieren (Cancro, 2009; Kheirallah et al., 2010).

In den letzten Jahren hat der anti-CD20-Antikörper Rituximab zu signifikanten Verbesserungen in der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und rheumatoider Arthritis geführt (Perosa et al., 2010). Bislang ist die Wirkungsweise dieses Antikörpers jedoch nicht vollständig verstanden, da sich mehrere Effekte zu überlagern scheinen bzw. zu unterschiedlichem Anteil zum Therapieerfolg beitragen (Glennie et al., 2007; Pedersen et al., 2002). So sind direkte, durch den F(ab')₂-Anteil vermittelte, und indirekte, über den Fc-Anteil des Antikörpers vermittelte Wirkungen bekannt.

Die Fc-vermittelten Effekte werden in die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (*Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity* / ADCC) und die komplementabhängige Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity* / CDC) unterteilt. Sie sind recht gut verstanden und können gezielt beeinflusst werden.

Die direkten, durch die Bindung an bzw. Verbrückung von CD20 vermittelten Effekte wie Hemmung der Proliferation und Absterben der B-Zellen sind hingegen weniger gut verstanden (Mossner et al., 2010). Dies liegt u.a. daran, dass es zwei Typen von Antikörpern gegen CD20 gibt: Antikörper vom Typ I (Rituximab, Ofatumumab) bewirken eine Translokation der CD20-Moleküle in *lipid rafts*, vermitteln CDC und lösen Apoptose aus. Typ II anti-CD20-Antikörper (Obintuzumab/GA101; B1) verursachen keine Translokation, weisen aufgrund verminderter Bindung von Complement-Komponenten weniger CDC auf, aber sie induzieren homotypische Aggregation, vermitteln stärker ADCC und induzieren einen lysosomen-vermittelten, nicht-apoptotischen programmierten Zelltod (Alduaij et al., 2011; Kern et al., 2013; Mossner et al., 2010).

1.3 *Angewandte Technologien*

1.3.1 RNA-Interferenz

Mit dem Begriff RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet man einen konservierten, natürlichen Mechanismus zur spezifischen Stilllegung von Genen durch sequenzhomologe doppelsträngige RNA, der ursprünglich wahrscheinlich vor mobilen genetischen Elementen wie viralen Nukleinsäuren oder Transposons schützte (Waterhouse et al., 2001).

Diesen Mechanismus nutzt man, um mittels künstlich hergestellter siRNAs (*small interfering RNAs*), gezielt einzelne Gene durch mRNA-Degradation auszuschalten. Die siRNA-Moleküle bilden zusammen mit Proteinen der Argonaute-Familie den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC). In Säugetieren besitzt Argonaute 2 eine Ribonuclease H-Domäne und ist die katalytische Maschine der RNAi, die die Ziel-RNA schneidet (Liu et al., 2004).

Da auch unvollständige Übereinstimmungen zur Stilllegung von Transkripten führen können, stellen sogenannte *off-target*-Effekte ein nicht zu unterschätzendes Problem bei RNAi-Experimenten dar. Überzeugend wurde dies beispielsweise bei der Expressionsprofilierung verschiedener siRNAs gegen das Zielprotein MAPK14 dargelegt, bei der die einzelnen siRNAs eigene Expressionsmuster aufwiesen und sich nur bei wenigen Genen überschneiden (Jackson et al., 2003). Es wird vermutet, dass vor allem die Übereinstimmungen im 3' untranslatierten Bereich mit der *seed*-Region (Positionen 2-7 oder 2-8) des Antisinn-Strangs der siRNA, zu *off-target*-Effekten führen (Anderson et al., 2008; Birmingham et al., 2006). Um diese unerwünschten Nebeneffekte zu minimieren, wurden verschiedene Strategien entwickelt: computergestütztes Design der siRNA-Duplexe um Sequenzähnlichkeiten weitestgehend zu vermeiden, die Modifizierung der Position 2 im Antisinn-Strang (*guide strand*) durch 2'-O-Methyl-Substitution und Blockierung des Sinn-Strangs um die gewünschten Wechselwirkungen am RISC zu fördern (Jackson et al., 2006).

Aufgrund ihrer Spezifität wären siRNAs eigentlich optimale Therapeutika. Zwar stehen für die Anwendung *in vitro* mehrere Methoden zur Verfügung, um siRNAs oder Vektoren für shRNAs in Zellen einzubringen, aber diese Methoden sind mehr oder weniger toxisch für die Zellen. Daher werden, je nach Zelltyp und nach Abwägung von Toxizität gegen Effizienz, die Transfektionen mit Lipid- oder Peptid-komplexen, Liposomen oder per Elektroporation durchgeführt.

Für die Anwendung *in vivo* bestehen jedoch gravierende Probleme in der Stabilität und Lieferung an den Wirkort (*Delivery efficiency*), Toxizitäten und unspezifische Stimulation des Immunsystems. Um dies zu adressieren, wurden siRNAs mit lipophilen Molekülen wie Cholesterin, Chitosan und Gallensäuren konjugiert (Wolfrum et al., 2007).

Bei einer intravenösen Applikation können schon die Blutbestandteile wie Albumin oder Fibrinogen die verpackten RNA-Partikel aggregieren oder negativ geladenen Blutbestandteile mit der RNA um die Bindung an die kationischen Polymere konkurrieren, sodass die Komplexe zerfallen, und die Bestandteile über die Niere ausgeschieden werden. Weitere Probleme stellen extrazelluläre Nukleasen, die Aufnahme in die Zielzelle und Entfaltung der Wirkung dar (Foged, 2012; Ragelle et al., 2013).

1.3.2 Vergleichende Expressionsanalyse als Mittel der funktionellen Charakterisierung

Für die Expressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit wurden „cRNA Gene Chips“ der Firma Affymetrix verwendet. Auf einem solchen Microarray befinden sich 1,3 Millionen verschiedene Oligonukleotide, die die prozessierten mRNAs von ungefähr 39000 gut charakterisierten, humanen Genen detektieren können.

Um die Wirkungsweisen verschiedener Agenzien direkt miteinander zu vergleichen, werden Listen der verändert exprimierten Gene auf Gemeinsamkeiten hin überprüft. Das Ausmaß der Überschneidung gibt einen Hinweis auf die Ähnlichkeit der bis dahin in der Zelle abgelaufenen Prozesse. In der Literatur wird oft der Begriff „Fingerabdruck“ für eine solche Liste verwendet. Dies könnte den Eindruck erwecken, ein Expressionsprofil sei konstant. Das ist natürlich nicht der Fall.

Basierend auf publizierten, in Datenbanken hinterlegten Interaktionen wird auf *downstream*-gelegene Funktionen und mögliche *upstream*-agierende Transkriptionsfaktoren rückgeschlossen. Hierfür existieren mittlerweile sehr viele Programme, die sich in der Art der verwendeten Statistik, Terminologie, Visualisierung etc. unterscheiden. Eine Übersicht über frei verfügbare, Ontologie basierte Analysesoftware bietet der Artikel von Khatri und Draghici (Khatri & Draghici, 2005).

Die Expressionsanalyse und der Vergleich von Patientenprofilen mit bekannten Mustern wird heutzutage erfolgreich in der Diagnostik angewendet, um das Ansprechen auf eine bestimmte Behandlung oder die generelle Prognose vorherzusagen (Tyner et al., 2013). So können Expressionsprofile mit 20 FLT3-abhängigen Genen bei AML-Patienten die Entwicklung genauer vorhersagen als der eigentliche FLT3-Mutationsstatus (Bullinger et al., 2008).

1.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen Genexpressionsmuster von Kinaseinhibitoren und anti-CD20-Antikörpern erstellt werden, da diese (zielgerichteten) Therapeutika neben den eigentlichen Zielstrukturen häufig weitere treffen bzw. ihr Wirkmechanismus unvollständig verstanden ist. In diesem Zusammenhang sollen auch mögliche Mechanismen zur Entstehung von Resistenzen berücksichtigt werden.

Durch Vergleich von Expressionsprofilen für siRNAs und Inhibitoren soll die Frage geklärt werden, ob durch Kombination von Transkriptionsänderungen spezifische Wirkungen definiert werden können und ob durch Subtraktion von Transkriptionsprofilen auf (Neben-) Wirkungen geschlossen werden kann. Hierfür werden nach eingehender biochemischer Analyse die Genexpressionsprofile für verschiedene niedermolekulare FLT3-Inhibitoren sowie für verschiedene FLT3-siRNAs erstellt, auf Konsistenz geprüft und miteinander verglichen. Des Weiteren wird auf die zugrunde liegenden Transkriptionsfaktoren extrapoliert, um herauszufinden, welche *upstream*-Signalwege in gleicher oder unterschiedlicher Weise durch die Inhibitoren beeinträchtigt sein könnten.

In ähnlicher Weise werden die Expressionsprofile von anti-CD20-Antikörpern mit denen von anti-BCR-Antikörpern verglichen. Darüber hinaus wird durch die Inhibition beider Signalwege und Vergleich der *downstream*-Effekte die Wirkungsweise der Antikörper auf sekretorischer Ebene untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Allgemeine Geräte

Pipetman P (verschiedene Modelle)	Gilson
Pipet-Lite LTS-Pipette 1000 µl	Rainin
Multipette stream	Eppendorf
Pipetboy comfort	Integra
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Labofuge 400e	Heräus
Vortex	GFL
Speedvac Concentrator	Savant
Waagen	Sartorius
GeneAmpPCR System 2400	PerkinElmer
Kühlschrank	Liebherr
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	GFL

2.1.2 Geräte für die Zellkultur

Brutschrank BBD6220	Heraeus/Kendro
Laminar-Flow-Werkbank	BDK
N ₂ -Tank Chronos	Messer
Hämazytometer Neubauer	Optik Labor
Mechanisches Zählgerät	IVO
Casy® automatisches Zählsystem	SchärfeSystem/Innovatis
Mikroskop Labovort	Leitz
Megafuge 3.0 R	Heraeus/Kendro
Cryo 1°C/min Freezing Container	Nalgene

2.1.3 Geräte für Absorptions-, Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen

Nanodrop ND-1000	Peqlab
SpectrafluorPlus	Tecan

2.1.4 Geräte für qPCR

LightCycler® 480 II	Roche
---------------------	-------

2.1.5 Geräte für Affymetrix-Experimente

Heizschrank	Memmert
Rotor Reax2	Heidolph

GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix
GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix

2.1.6 Geräte für Proteinanalysen

Xcell Sure Lock MiniCell	Invitrogen
Xcell II Blot Module	Invitrogen
PowerEase 500 PowerSupply	Invitrogen
Lumilmager F1	Roche

2.1.7 Geräte für die Durchflusszytometrie

FACS Calibur	BD Biosciences
FACS Flow Supply	BD Biosciences

2.2 Verbrauchsmaterial

2.2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

PCR SoftStripes 0,2 ml	Biozym
Reaktionsgefäße, RNase-frei, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße, amber	Biozym
Collections Tubes, 2 ml	Qiagen
BlueMax® Polypropylene Tubes	BD Biosciences
BlueMax® Polystyrene Tubes	BD Biosciences
Glaswaren	Schott
Bottle Top Filter PES	Nalgene
SafeSeal-Tips®	Biozym
Gel Loading Tips	Invitrogen
Pipettenspitzen, aerosolresistent	Rainin

2.2.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Serological Pipets	BD Biosciences
Falcon Multiwell Plates	BD Biosciences
Cellstar Tissue Culture Flasks, Filter cap	Greiner Bio-one
Cell Scraper	Corning
Cryoware Cryogenic vials	Nalgene
Falcon Polystyrene Tubes (FACS)	BD Biosciences

2.2.3 Verbrauchsmaterialien für RNA-Isolierung und Real-Time-PCR

QIAshredder	Qiagen
MicroAmp™	AppliedBiosystems
LightCycler® 480 Multiwell Plates	Roche

2.2.4 Verbrauchsmaterialien für Proteinanalytik

NuPAGE BisTris-SDS-Gele	Invitrogen
PVDF Membran	Invitrogen

2.2.5 Verbrauchsmaterialien für Affymetrix-Analysen

GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0	Affymetrix, High Wycombe, UK
--------------------------------------	------------------------------

2.3 Reagenzien und Kits

2.3.1 Allgemeine Reagenzien

DEPC-treated H ₂ O	Ambion
EDTA 0,5M	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
NaCl 5M, RNase frei	Ambion
Nonidet® P40	Fluka
PBS (10x)	Roche
Tris-HCl 1M pH8,0	Sigma-Aldrich
Trizma Base	Sigma-Aldrich
Triton-X 100	Roche
Tween-20	Fluka
DMSO	Sigma-Aldrich
Ethanol p.a.	Merck
Ethanol technisch	Merck
Isopropanol	Fluka
Essigsäure, mind. 99,8 %	Fluka
Salzsäure 25 %	Merck
CaCl ₂	Merck
Kaliumacetat	Merck
Magnesiumacetat	Merck
MgCl ₂	Merck
NaCl	Merck

2.3.2 Reagenzien und Kits für zellbiologische Experimente

2.3.2.1 Zellkulturmedien und –reagenzien

RPMI1640 mit GlutaMAXI	Invitrogen/Gibco
Fötales Kälberserum, zertifiziert, hitzeinaktiviert	Invitrogen/Gibco
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen/Gibco

Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA)	Invitrogen/Gibco
TrypanBlau 0,4 %	Invitrogen/Gibco
OptiMEM I	Invitrogen/Gibco
FLT3LG (FLT3-Ligand)	RnD-Systems

2.3.2.2 Reagenz für Proliferationstests

Cell Titer Glo (Luminescent Cell Viability Assay)	Promega
---	---------

2.3.2.3 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine2000	Invitrogen
Nucleofector Kits (L, V)	Amaxa

2.3.2.4 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

FACS Flow	BD Biosciences
FACS Clean	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
Propidiumiodid (1,0 mg/ml)	Sigma-Aldrich
RNase A	Calbiochem
BSA Fraction V, fatty acid free	Roche

RNase-Stammlösung

RNase auf 2500U/ml einstellen, für 15 Minuten auf 99°C erhitzen um evtl. vorhandene DNasen zu inaktivieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Propidium-Iodid-Färbepuffer

100 mM Tris-HCl, pH7,4

150 mM NaCl

1 mM CaCl₂

0,5 mM MgCl₂

0,2 % BSA Fraction V

0,1 % Nonidet P40

Sterilfiltriert, bei 4°C lagern, vor Verwendung 1:50 PI zusetzen, Endkonzentration ist 20 µg/ml

2.3.2.5 Kinase-Inhibitoren

Alle Kinase-Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, in der Stammlösung auf eine Konzentration von 10mM eingestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Serielle Verdünnungen wurden im jeweiligen Zellkulturmedium hergestellt.

Sorafenib / BAY 43-9006 / Nexavar: Ursprünglich war Sorafenib als Inhibitor der Ser/Thr-Kinase Raf1 für die Therapie solider Tumore entwickelt worden (Lowinger et al., 2002). Später wurde auch eine Hemmung der Tyrosinkinase PDGFR-, FLT3- sowie FLT3-Mutanten festgestellt und daher

Anwendung in der Leukämie-Therapie vorgeschlagen (Auclair et al., 2007). Bei FLT3-überexprimierenden BaF3-Zellen wurde eine unterschiedliche Hemmung von FLT3-ITD und FLT3-D385G gegenüber Wildtyp-FLT3 beobachtet (Zhang et al., 2008). Leukämie-Zelllinien (MV4;11 und Molm13), welche konstitutiv aktives FLT3-exprimieren, werden gehemmt, da Sorafenib eine Blockade des Zellzyklus und Apoptose hervorruft. Die leukämischen Zelllinien HL60 und K562, welche kein oder wenig Wildtyp-FLT3 exprimieren, zeigten keine Inhibition (Lierman et al., 2007).

VX-680 / MK-0457 / Tozasertib: auch dieser Inhibitor war ursprünglich gegen Ser/Thr Kinasen wie die Aurora-Kinasen entwickelt worden, inhibiert aber wie Sorafenib auch Tyrosinkinasen.

CHIR-265 / RAF265 inhibiert BRAF- und VEGFR2 (Mordant et al., 2010).

Roche-Inhibitor 1 (RKI-1), Roche-Inhibitor (RKI-2), Roche-Inhibitor RKI-3 sind Roche-eigene Kinase-Inhibitoren. Für diese Substanzen waren hinsichtlich Bindung an Kinasen nur die AMBIT-Daten bekannt.

Calbiochem FLT3 Inhibitor I (# 343020, CFI-1) ist laut Hersteller ein Thienylcarboxamid, welches die Zellmembran penetrieren kann. Diese Substanz wirkt ATP-kompetitiv und hemmt FLT3 mit einer IC_{50} von 42 nM während andere getestete Kinasen erst mit $IC_{50} > 3 \mu M$ gehemmt werden.

Calbiochem FLT3-Inhibitor II (# 343021, CFI-2) ist ein membrangängiges Indolylmethanone-Derivat. Die angegebene IC_{50} der zellulären FLT3-Phosphorylierung für FLT3 beträgt 40 nM, für PDGFR 300 nM, in zellfreien Assays betragen sie 33 nM bzw. 171 nM. Andere Kinasen wie ABL oder KIT werden erst bei höheren Konzentrationen behemmt 4.2 bzw. $\geq 0.5 \mu M$ (Mahboobi et al., 2006).

Calbiochem FLT3-Inhibitor III (# 343022, CFI-3) ist ein 5-Phenyl-2-Thiazolamin-Derivat, welches FLT3 mit einer IC_{50} von 50 nM hemmt und andere Kinasen wie c-Kit, KDR, c-Abl, Cdk1, c-Src, oder Tie-2 bei deutlich höheren Konzentrationen ($IC_{50} = 0.26, 0.91, 1.2, 2.1, 2.8$ bzw. $8.0 \mu M$) hemmt. In MV4:11-ITD, BaF3-ITD, and BaF3-D835/Y-Zellen hemmt dieser Inhibitor die Proliferation mit IC_{50} von 52, 240, and 760 nM (Furet et al., 2006).

SYK-Inhibitor I: Calbiochem # 574711

SYK-Inhibitor IV: Calbiochem # 574714

2.3.3 Allgemeine Reagenzien und Kits für molekularbiologische Experimente

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Agarose MP (Multi Purpose)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Roche
DNA Molecular Weight Marker	Roche
DEPC-behandeltes Wasser	Ambion
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich

EthidiumBromid-Lösung	Merck
Restriktionsenzyme inkl. Puffer	Roche
RNeasy Mini Kit	Qiagen (#74104)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche (#04379012)

2.3.4 Reagenzien und Lösungen für die Präparation der Affymetrix-Proben

Microarray cDNA Synthesis Kit (#3315622)	Roche
Microarray RNA Target Synthesis Kit(T7) (#3266877)	Roche
Microarray Target Purification Kit (#3266885)	Roche
Biotin-16-UTP (#11388908)	Roche
Kontroll-Oligonukleotid B2	Affymetrix
100x <i>staggered</i> Kontroll-cRNAs	Affymetrix
Biotinylated Anti-Streptavidin (<i>Goat/Ziege</i>)	Vector Laboratories / Biozol Eching
Bovine Serum Albumin (BSA, 50 mg/ml)	Invitrogen
<i>Goat</i> (Ziege) IgG	Sigma-Aldrich
Herring Sperm DNA	Promega
MES Sodium Salt	Sigma-Aldrich
MES Monohydrate	Sigma-Aldrich
SSPE Buffer	Invitrogen
Streptavidin, rekombinant	Roche
Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (SAPE)	Molecular Probes
Surfact-Amp20	Perbio (Pierce)

<u>5x cRNA-Fragmentierungspuffer</u> 4,0 ml 1M Trisacetat pH8,1 0,64 g Magnesiumacetat 0,98 g Kaliumacetat DEPC-H ₂ O ad 20ml Sterilfiltrieren, aliquotieren, bei RT lagern	<u>12x MES-Puffer</u> 35,2 g MES-Monohydrat 96,65 g MES Natrium Salz DEPC-H ₂ O ad 500ml pH sollte zwischen 6,5 und 6,7 liegen, Sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
<u>2x MES-Hybridisierungspuffer</u> 8,3 ml 12x MES-Puffer 17,7 ml NaCl 5M 4,0 ml EDTA 0,5M 0,1 ml Tween20 10 % 19,9 ml DEPC-H ₂ O Bei 4°C und dunkel lagern	<u>2x Färbepuffer</u> 41,7 ml 12x MES-Puffer 92,5 ml NaCl 5M 2,5 ml Tween20 10 % 113,3 ml DEPC-H ₂ O Sterilfiltrieren, bei 4°C und dunkel lagern

<u>Stringenter Waschpuffer</u> 83,3 ml 12x MES-Puffer 5,2 ml NaCl 5M 1,0 ml Tween20 10 % 910,5 ml ddH ₂ O Sterilfiltrieren, bei 4°C und dunkel lagern	<u>Nicht-stringenter Waschpuffer</u> 600 ml 20xSSPE 2 ml Tween20 10 % 1398 ml ddH ₂ O Sterilfiltrieren, bei RT lagern
<u>Streptavidin-Lösung</u> 270 µl H ₂ O 300 µl 2x Färbepuffer 24 µl BSA 6 µl Streptavidin, rekombinant	<u>Antikörper-Lösung</u> 266,0 µl H ₂ O 300,0 µl 2x Färbepuffer 24,0 µl BSA 6,0 µl IgG (Ziege) 3,6 µl Biotinylierter Antistreptavidin-Ak (Ziege)
<u>SAPE-Lösung</u> 270 µl H ₂ O 300 µl 2x Färbepuffer 24 µl BSA 6 µl SAPE	

2.3.5 Reagenzien und Kits für proteinbiochemische Experimente

2.3.5.1 Lyse und SDS-Gelelektrophorese

Aprotinin	Sigma-Aldrich
CompleteMini, (Protease-Inhibitoren)	Roche
Leupeptin	Sigma-Aldrich
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE LDS Sample Buffer(4x)	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS RunningBuffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
Orthovanadat	Sigma-Aldrich
Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham Biosciences
RIPA-Lysepuffer (10x)	Upstate Upstate
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Pierce

<u>RIPA-Lyse-Puffer</u> 10,0 % 10x RIPA-Puffer 75,7 % dH ₂ O 14,3 % CompleteMini (7x Stammlsg.)	<u>NP40-Lyse-Puffer</u> 1 % NP-40 20mM Tris-HCl pH 8,0 137 mM NaCl 10 % Glycerin 2 % EDTA
--	--

Direkt vor Verwendung frisch dazugeben: 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM Orthovanadat und 10 µg/ml Leupeptin oder CompleteMini (Protease-Inhibitoren)1x und Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail 1x.

2.3.5.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

BCA Protein Assay Reagent Kit Uptima

2.3.5.3 Western Blot

Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk BioRad
 Gelatine Sigma-Aldrich
 LumiLight^{Plus} Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit) Roche
 NuPAGE Transfer Buffer (20x) Invitrogen
 Restore Western Blot Stripping Buffer Perbio
 iBlot™ Gel Transfer Stacks, PVDF- bzw. Nitrocellulose-Kits Invitrogen

<u>Blockierungspuffer</u> 4 % Milchpulver 96 % 1x PBS-T	<u>Waschpuffer(1x PBS-T)</u> 10,0 % 10x PBS 89,9 % dH ₂ O 0,1 % Tween-20
<u>NET-Gelatine Puffer</u> 150 mM NaCl 5 mM EDTA 50mM Tris-HCl 0,05 % TritonX-100 0,25 % Gelatine	<u>Transferpuffer</u> 5,0 % 20x Transferpuffer 0,1 % NuPAGE Antiox. 10,0 % Methanol 84,9 % dH ₂ O

2.3.5.4 Primärantikörper

Anti-FLT3 / Fik2 (S-18) sc480, Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen Santa Cruz Biotechnology
 Anti-beta Actin (ab6276, Monoklonaler Antikörper aus Kaninchen) Abcam
 Rituximab (chimärer anti-CD20-Antikörper) Roche
 LT20 (muriner anti-CD20-Antikörper) Pierce
 Anti-IgM und Anti-IgM-F(ab)₂ (aus Ziege) Jackson Immuno Research
 Anti-IgG (aus Ziege) Jackson Immuno Research
 Anti-phospho-Tyr (clone 4G10) Upstate Biotechnologies
 Alle Antikörper gegen die *Cluster of Differentiation* für FACS-Analysen (FITC-, APE- oder PE-gelabelte monoklonale Antikörper) wurden von BD Biosciences bezogen.

2.3.5.5 Sekundärantikörper für Western Blot

Anti-Maus (*anti-mouse*) IgG-POD aus dem LumiLight-Kit (s.o)
 Anti-Kaninchen (*anti-rabbit*) IgG-POD aus dem LumiLight-Kit (s.o)

2.3.5.6 ELISAs

DuoSet® IC Human Phospho-FLT3/Fik2-Kit (DYC368-5) R&D Systems
 DuoSet® IC Human Total-FLT3/Fik2-Kit (DYC912-5) R&D Systems

Quantikine® Human CCL3/MIP1 α Immunoassay (DMA00)	R&D Systems
Quantikine® Human CCL4/MIP1 β Immunoassay (DMB00)	R&D Systems

2.4 Oligonukleotide

2.4.1 siRNAs

FLT3-siRNAs siGenome duplexes: (MQ-003137-01-0010, Dharmacon) FLT3-siRNA1: GAAGGCAUCUACACCAUUAUU FLT3-siRNA2: GAAGGAGUCUGGAAUAGAAUU FLT3-siRNA3: GAAUUUAAGUCGUGUGUUCUU FLT3-siRNA4: GGAAUUCAUUUCACUCUGAUU	FLT3-siRNAs On-TargetPlus: (LQ-003137-00-0010, Dharmacon) FLT3-siRNA10: GAAUUUAAGUCGUGUGUUC FLT3-siRNA11: CGAAUGAUUUUGGGACUA FLT3-siRNAs12: CGCAACAGCUUAUGGAAUU
SYK-siRNAs On-TargetPlus Smartpool: (L-003176-00-0005, Dharmacon) SYK-siRNA 10: AGAAAUGUGUUGCAGUUA SYK-siRNA 11: CGGAAUGCAUCAACUACUA SYK-siRNA 12: GAGCAAUUGUCCUGAUAG SYK-siRNA 13: GCUGCGCAAUUACUACUAU	Luciferase-siRNA: (Sigma) CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT siGenome RISC free-siRNA, (D-001220-01: Dharmacon) AllStarCellDeath®-siRNA: (Qiagen) Leider gibt der Hersteller die genauen Zielmoleküle nicht bekannt.

2.4.2 Oligonukleotide für die qPCR

Assays für die Haushaltsgene ACTB, TBP; PDK1, GUSB und GAPDH sowie Sonden aus der Universal Probe Library® von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Primer von Sigma-Aldrich, Steinheim:

DUSP6 mit Sonde #66 Vorwärtsprimer: CGACTGGAACGAGAATACGG

Variante 1 reverser Primer: GGAGAACTCGGCTTGGAACT

Variante 2 reverser Primer: AATGTACCAAGACACCACAGTTCT

FLT3 mit Sonde #5

Vorwärtsprimer: CTTTAAGCACAGCTCCCTGAA

Reverser Primer: TGACCATGGAACAACCTCCTC

FLT3 mit Sonde #18

Vorwärtsprimer: GGATCAGCCATTTTATGCTACA

Reverser Primer: GCCGTTTCCTTGAGTCAAAA

SYK mit Sonde #29

Vorwärtsprimer GAGTGTTGATGTGGGAAGCA

Reverser Primer: GCGGTGACTTCACTTCCTTT

2.5 Zelllinien

Zelllinie	Isolat./Krankheitsmodell	Relevante Eigenschaften	Herkunft, Medium
MV4; 11	Akute monocytische Leukämie, (AML)	Diese Zellen exprimieren FLT3-ITD.	Roche-interne Zellbank, ATCC; RPMI1640 mit 10 % FKS
RS4;11	Akute Lymphocytische Leukämie (ALL)	Diese Zellen exprimieren die Wildtypform der Kinase FLT3.	Roche-interne Zellbank, ATCC; RPMI1640 mit 10 % FKS
OCI-LY18	B-Zell-Lymphom, DLBCL	Diese Zellen exprimieren CD20.	Roche-interne Zellbank, ATCC; RPMI1640 mit 10 % FKS
SU-DHL-4	B-Zell-Lymphom, B-Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL	Diese Zellen exprimieren CD20.	Roche-interne Zellbank, ATCC; RPMI1640 mit 10 % FKS
REC-1	B-Zell-Lymphom; Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL, transformiert zu Mantelzell-Lymphom	Diese Zellen exprimieren CD20.	Roche-interne Zellbank, DSMZ; RPMI1640 mit 10 % FKS
Z-138	B-Zell-Lymphom; Non-Hodgkin-Lymphom, Mantelzell-Lymphom	Diese Zellen exprimieren CD20.	Roche-interne Zellbank, ATCC; RPMI1640 mit 10 % FKS

2.6 Software und Datenbanken

MS Excel®

MS Word®

Xlfit3 (MS Excel Add-in)

Xfluor4 (MS Excel Add-in)

Spotfire Descision Site®

CellQuestPro

LightCycler® Software 5.0

GeneChip® Operating Software 1.4

Microsoft©

Microsoft©

IDBD©

Tecan©

TIBCO© Software AB

BD Biosciences©

Roche©

Affymetrix©

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Ingenuity Systems Inc.

Broad Institute

Die in dieser Arbeit verwendeten Roche-eigenen Kinase-Inhibitoren (RKIs) wurden anhand der von der Firma AMBIT® einlizenzierten Daten ausgewählt. Dabei handelt es sich um einen Kompetitionsbindetest auf Basis eines Phagen-Displays, welcher *in vitro* die Affinitäten von Kinase-Inhibitoren für 317 Kinasen (287 verschiedene sowie einige klinisch relevante mutierte Kinasen) ermittelt (Fabian et al., 2005; Karaman et al., 2008; Manning et al., 2002). Die Auswertung dieser Daten für die vorliegende Arbeit erfolgte mit der Software Spotfire.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Quantitative PCR (qPCR)

2.7.1.1 Aufreinigung von Gesamt-RNA

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit RLT-M-Puffer lysiert, mittels Qiashredder (Qiagen) und Zentrifugieren homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol und Applikation auf das Säulchen des RNeasy Mini Kit (Qiagen) wurde zentrifugiert. Nach einem ersten Waschschrift mit RW1 wurde mit DNase inkubiert, um DNA-Kontaminationen zu minimieren. Anschließend wurde mit den Waschpuffern RW1 und RPE gewaschen. Die Elution erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Die Konzentration und Reinheit der RNA im Eluate wurde mit dem Nanodrop (Peglab) bestimmt. Die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

2.7.1.2 cDNA-Synthese

Ein µg der zuvor isolierten Gesamt-RNA wurde mittels *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) gemäß Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben.

Dazu wurden Oligo-dT- und *Random-Hexamer-Primer* bei 65°C für zehn Minuten mit der RNA inkubiert, anschließend Reaktions-Puffer, dNTPs und Reverse Transkriptase zugegeben und für 30 Minuten auf 55°C erhitzt. Um die Reaktion zu stoppen wurde anschließend für fünf Minuten auf 85°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren.

2.7.1.3 Quantitative PCR / Real time PCR

Anschließend wurde der Reaktionsmix als Mehrfach-Ansatz vorbereitet und eine 96-*well*-Platte verteilt, sodass sich pro Reaktionsansatz folgende Zusammensetzung ergibt:

Roche Probes Master 480	10 µl
Sonden	Je Gen/Haushaltsgen 0,25 µM
Primer (Vorwärts/Rückwärts)	Je Gen und Richtung 0,5 µM
Wasser	Ad 18 µl

Anschließend wurden zu jedem Ansatz 2 µl der cDNA gegeben. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen.

Nach dreiminütiger Zentrifugation wurden die 96-*well*-Platten in den LightCycler480® überführt. Das untenstehende Temperaturprofil wurde angewendet und die Fluoreszenz aufgezeichnet. Mittels der LC480® Software wurden daraus die *cp*-Werte errechnet.

2.7.2 Probenvorbereitung für die Expressionsprofilierung

Für die Hybridisierung auf Affymetrix Gene Chips wurde cRNA in einem mehrstufigen Verfahren aus Total-RNA hergestellt. Der erste Schritt, die Aufreinigung der RNA aus Zelllysaten, erfolgte wie für die qPCR allerdings ohne die DNase-Inkubation.

2.7.2.1 cDNA-Synthese

Die Methode der cDNA-Synthese mittels *Microarray cDNA Synthesis Kit* (Roche) nach van Gelder und Eberwine basiert auf einer reversen Transkriptase-Reaktion mit T7-Promotorsequenz-konjugierten Oligo-dT-Primern bei 42°C und anschließender Zweitstrang-Synthese (Van Gelder et al., 1990).

Dafür werden mittels RNase H Einzelstrangbrüche in den RNA-Strang des RNA/DNA-Hybrids erzeugt, sodass die DNA-Polymerase I die entstandenen 3'OH-Enden als Primer für die Synthese des Zweitstranges verwenden kann und die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I entfernt die in Syntheserichtung gebundenen RNA-Nukleotide. Das Enzym *E. coli* Ligase verknüpft unverbundene Nukleotide im Zweitstrang, um die Synthese zu komplettieren.

Anschließend werden durch die T4-DNA-Polymerase 3'-Überhänge entfernt, sodass die Enden der ds-cDNA glatt sind. Abschließend wird durch die RNase I sämtliche RNA hydrolysiert, sodass im folgenden Schritt die ds-cDNA gereinigt werden kann.

2.7.2.2 Aufreinigung der cDNA

Die doppelsträngige cDNA wurde mittels *Microarray Target Purification Kits* (Roche) über Säulchen gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

2.7.2.3 In-vitro-Transkription

Unter Verwendung des *Microarray RNA Target Synthesis Kit (T7)* (Roche) dienen in einer *in-vitro*-Transkription die bei der cDNA-Synthese verwendeten Primersequenzen des T7-Promotors als Bindestelle für die T7-RNA-Polymerase. Während der Transkription (3h bei 37°C) werden biotin-konjugierte Uridin-Nukleotide in die Sequenz mit eingebaut (Verhältnis unmarkiertes zu markiertem dUTP 1:4). So entsteht ein biotin-markierter Einzelstrang cRNA für die Hybridisierung. Der mRNA-Anteil in der totalRNA wird dabei ca. 100-fach linear amplifiziert. Abschließend wurde mittels RNeasy Mini-Kit (Qiagen) die biotinylierte cRNA aufgereinigt und per Nanodrop quantifiziert.

2.7.2.4 Fragmentierung und Hybridisierung

Um ein optimales Hybridisierungsergebnis zu erhalten, sind Fragmentlängen zwischen 35 und 200 Basenpaaren nötig. Hierfür wurde die biotinylierte cRNA fragmentiert, indem mit 8 µl fünffach Fragmentierungspuffer für 35 Minuten bei 95°C inkubiert wurde. Anschließend wurde sie entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die Herstellung des Hybridisierungsmix verwendet.

Des Weiteren ist für die Bindung der cRNA-Fragmente an die Oligo-Nukleotide des *Microarrays* ein optimaler pH- und Salzgehalt entscheidend. Darüber hinaus müssen unspezifische Bindungen vermieden werden und die Spezifität der Hybridisierung kontrolliert werden. Der Hybridisierungsmix enthält:

- 30 µl der fragmentierten cRNA,
- 3 µl Kontroll-oligonukleotid B2,
- 3 µl *staggered* Kontroll-cRNA (100x)
- 3 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml)
- 3 µl BSA (50 mg/ml)
- 150 µl MES-Puffer (2x)
- 108 µl RNase-freie Wasser

200 µl dieser Mischung rotierten in den vorbehandelten *Microarrays* bei 45°C für 16 Stunden. Danach wurden die Chips mit nicht-stringentem Waschpuffer befüllt und in einer *Fluidics*-Station nach dem Herstellerprotokoll EukGE-ws2-v4 mit den unter 2.3.3.1 beschriebenen Lösungen (SA-Lösung, Antikörper-Lösung und SAPE-Lösung) gefärbt und gewaschen. Anschließend wurden sie am Affymetrix Scanner ausgelesen.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Zellkultur

Die Führung der Zellkultur erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Adhärente Zellen wurden in Plastikgefäßen mit adhäsiven Oberflächen kultiviert. Suspensionszellen wurden in nicht-adhäsiven Plastikgefäßen kultiviert.

2.8.2 Viabilitätsbestimmung

Die Zellzahl wurde indirekt mittels des *CellTiterGlo*®-Tests bestimmt. Der Test beruht auf der Bestimmung des intrazellulären ATPs, da die Zellen nach Zugabe der Lösung lysieren.

Die Umsetzung des ATP mit Luciferin und Sauerstoff zu Oxyluciferin, AMP, PP und CO₂ unter Lichtemission, ist die Grundlage der Detektion am SpectrafluorPlus® (Tecan).

Der Mittelwert der Lumineszenz der Triplikate wird um den Mittelwert der Triplikate der Leerwerte vermindert:

$$M_{lum.korr} = m_{lum.repl} - m_{lum.leer}$$

Aus dem Quotienten der korrigierten Absorption der behandelten Ansätze zur korrigierten Absorption der Kontrollansätze ergibt sich die Proliferationsaktivität:

$$\% \text{ Proliferationsaktivität} = (m_{lum.korr}(\text{behandelt}) / m_{lum.korr}(\text{Kontrolle})) * 100 \%$$

Um den Effekt der Inhibitoren auf die Zellviabilität vergleichen zu können, wurden Inhibitionskurven erstellt, mittels XLfit wurde der IC₅₀ berechnet.

Die Inhibition wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Inhibition} = ((1 - m_{lum.korr}(\text{behandelt})) / m_{lum.korr}(\text{Kontrolle})) * 100 \%$$

Das mathematische Modell einer einseitigen Dosis-Wirkungskurve, wird durch diese Gleichung beschrieben:

$$y = A + ((B - A) / (1 + (C/x)^D))$$

(x = Substratkonzentration, y = prozentuale Inhibition, B = maximale y-Wert, C = IC₅₀, D = Steigungsfaktor)

2.8.3 Transfektionen

Die leukämischen Zellen konnten mit keinem Transfektionsmittel auf Lipid- oder Protein-Basis erfolgreich transfiziert werden. Dies steht in Einklang mit der Literatur, da diese Zellen als schwer zu transfizieren beschrieben sind. Als relativ harsche Alternative gibt es die Elektroporation.

Die Firma Amaxa bietet zwar spezielle Protokolle für einzelne Zelllinien, aber auch diese müssen auf den jeweils vorliegenden Subklon einer Zelllinie adaptiert werden, um akzeptable Transfektionsraten zu erhalten. Die Anzahl der Zellen pro Elektroporation, die Menge der eingesetzten Nukleinsäure und die Art der Supplementierung wurde mit einem Plasmid optimiert, das für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert. Die Transfektionseffizienz für die Kombination der verschiedenen Parameter wurde jeweils durchflusszytometrisch bestimmt.

2.8.4 Durchflusszytometrie

Adhärente Zellen eines 6-Well wurden mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vorsichtig vom Plastik abgelöst. Suspensionszellen wurden ebenfalls mit kaltem PBS gewaschen aber direkt in ein FACS-Röhrchen überführt und 5 Minuten mit 300 g zentrifugiert.

Die Zellen wurden in 200 µl verdünnter ChromPure Human IgG-Lösung ($2 \mu\text{g}/1 \times 10^5$ Zellen) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert, um Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu blockieren und damit unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an die Zellen zu verhindern. 25 µl Zellsuspension wurden pro Well einer 96-Well-Rundbodenplatte (Costar® Storage Plate) pipettiert und mit 25 µl Antikörperlösung (jeweils 4 µl Antikörper mit FACS-Färbepuffer auf 25 µl aufgefüllt) 2 Stunden im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Zellen werden in 150 µl FACS-Färbepuffer suspendiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 150 µl Färbepuffer bzw. 150 µl Färbepuffer mit 1 µg/ml Propidiumiodidlösung resuspendiert. Propidiumiodid dringt in tote Zellen ein und interkaliert in die DNA. Die Messungen wurden am FACS Canto II durchgeführt. Zur Auswertung der FACS-Ergebnisse wurde das Programm FACSDiva 6.1.3 verwendet.

2.9 *Proteinbiochemische Methoden*

2.9.1 Gewinnung von Zelllysaten

Suspensionszellen und adhärenente Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt, wurde das Pellet in einem entsprechenden Volumen eiskaltem Lysepuffer aufgenommen (1×10^7 Zellen auf 1 ml RIPA-Lysepuffer). Um die Bestandteile der Zellmembran zu solubilisieren, wurden die Lysate mit einer 10G-Kanüle mehrfach aufgezogen und anschließend für 20 Minuten unter Schütteln auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann 10 Minuten mit 12000 g bei 4° C zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80° C eingefroren.

2.9.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA)

Die Albumin-Stammlösung wurde in einer Standardreihe verdünnt:

Stufe	BSA-Konzentration [µg/ml]	Volumen an BSA-Lösung [µl]	Volumen an PBS [µl]
1	2000	100 (Stammlösung)	----
2	1500	375 (Stammlösung)	125
3	1000	150 (Stammlösung)	150
4	750	150 von Stufe 2	150
5	500	150 von Stufe 3	150
6	250	150 von Stufe 5	150
7	125	150 von Stufe 6	150
8	25	50 von Stufe 7	200

Von jeder Standardverdünnung bzw. Probenverdünnung wurden 10 µl in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Das BCA-Reagenz wurde aus 1 ml BCA-Protein-Assay-Reagent B und 49 ml Reagent A (Uptima) hergestellt. Davon wurden 200 µl in jedes Well der Platte pipettiert. Nachdem 30 Sekunden auf dem Schüttler gemischt wurde, wurde die Platte für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Am TECAN SPECTRA Rainbow wurde die Absorption bei einer Messwellenlänge von 562 nm und einer Referenzwellenlänge von 700 nm gemessen. Um die Lysate auf eine Proteinkonzentration zu normieren, wurden sie mit Lysepuffer verdünnt und auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt.

2.9.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die 4-12 % Bis-Tris Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die innere Kammer wurde mit Laufpuffer (1 x MOPS-SDS-Running Buffer plus 500 µl Antioxidanz) aufgefüllt. Die äußere Kammer wurde bis ca. zur Hälfte mit Laufpuffer gefüllt. Nach dem Spülen der Taschen mit Laufpuffer, werden diese je nach verwendeter Gelgröße mit 15 µl bis 30 µl Lysat oder Molekulargewichtsstandard (3,5 µl MagicMark™ XP Western Standard oder 6 µl Benchmark™ Prestained Protein Ladder) beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei max. 200 V für ca. 50 min.

2.9.4 Western Blotting

Für das Überführen der Proteine aus dem Gel auf eine Membran wurden zwei verschiedene Systeme benutzt: entweder die *iBlot*-Methode mit vorgefertigten Anoden- und Kathodenstapeln, die nach Herstellerangaben verwendet wurde oder die Semi Dry-Methode. Bei letzterer wurde die PVDF-Membran für 30 Sekunden in Methanol aktiviert, dann in Millipore-Wasser gewaschen und mindestens 5 Minuten in Transferpuffer getränkt. Die Schwämme und Filterpapiere wurden ebenfalls mindestens 5 Minuten in Transferpuffer getränkt. Nach dem Aufbau des *Western Blots* in der inneren *Blotting*-Kammer (Kathode, zwei Schwämme, ein Filterpapier, SDS-Gel, aktivierte PVDF-Membran, ein Filterpapier, zwei Schwämme, Anode) wird die innere Kammer bis zu oberen Kante des *Blotting*-Stapels mit Transferpuffer versetzt. Die äußere Kammer wird zur Kühlung mit Millipore-Wasser und Eis gefüllt. Der Transfer erfolgte 90 Minuten bei 30 V und 215 mA. Im Anschluss wurde die Membran zunächst für 10 Minuten in *Western-Blot*-Blockierungspuffer inkubiert, gewaschen und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler blockiert. Dabei soll das im Milchpulver enthaltene

Protein unspezifisch an jene Stellen auf der Membran binden, auf die kein Protein aus dem Gel übertragen wurde, um so zu verhindern, dass die Detektionsantikörper unspezifisch an die Membran binden. Die blockierte Membran wurde mit dem Primäantikörper in der entsprechenden Verdünnung in Blockierungspuffer über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit *Western-Blot*-Waschpuffer wurde die Membran mit dem gegen den Primäantikörper gerichteten HRP-gekoppelten Sekundäantikörper im Blockierungspuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier zehnminütigen Waschschritten wurde die Membran entwickelt. Dabei wurde die Membran zwischen zwei Folien für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit *Lumi-Light Western Blotting* Substrat (Peroxide Solution und Enhancer Solution 1:1 gemischt) benetzt. Die Auswertung erfolgt am Lumi-Imager F1 von Roche. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, welches über den entsprechenden Primär- und Sekundäantikörper spezifisch angefärbt wurde.

2.9.5 ELISA

Die ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die FLT3-ELISA waren die Platten nicht vom Hersteller mit dem Fangantikörper beschichtet, daher wurden sie über Nacht bei 4°C mit dem Fangantikörper beladen. Für die CCL-ELISAs waren die Platten bereits beladen. Die Standardverdünnungsreihe wurde als serielle Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurden je Well 100 μ l der Standardlösung, der Lysate bzw. der Überstände aufgetragen und entsprechend der Anleitung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, um die Zielproteine an den Fangantikörper zu binden.

Nach fünf Waschschritten mit 400 μ l des jeweiligen Waschpuffers wurden 200 μ l der Lösung des mit Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundäantikörpers aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiteren vier Waschschritten wurden 200 μ l Substratlösung aus gleichen Teilen Wasserstoffperoxid und stabilisiertem Tetramethylbenzidin auf die Platte aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mit 50 μ l 2 N Schwefelsäure abgestoppt. Anschließend wurde die Platte am Tecan Spectra Rainbow bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm gemessen.

2.10 Analyse der Genexpression

Für alle Genexpressionsexperimente wurden GeneChips® vom Typ Human Genome U133 Plus 2.0 der Firma Affymetrix verwendet. Auf der Chipoberfläche befinden sich 1,3 Millionen verschiedene DNA-Oligonukleotidsonden in 54000 Probesets, wobei elf verschiedene Sonden zu einem Probeset zusammengefasst sind. Sie repräsentieren ca. 38500 gut charakterisierte Gene.

(Quelle: http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/hgu133arrays_datasheet.pdf)

2.10.1 Filterung und Funktionelle Analysen

Um herauszufinden, welche Wirkungen eine Behandlung auf das Transkriptom der Zellen gehabt hat, wurde die jeweilige Behandlung (Antikörper, siRNA gegen ein Zielprotein oder Inhibitor) mit den Kontrolleexperimenten (Vehikel oder Kontroll-siRNA) verglichen. In der vorliegenden Arbeit wurden standardmäßig drei zusammengehörige Chips also 3x Behandlung bzw. 3x Kontrolle zusammengefasst. Ausnahmen gab es nur bei der Kinetik der FLT3-Hemmung durch die siRNAs.

Hierbei wurden pro Zeitpunkt und FLT3-siRNA nur zwei Chips gemessen. Es wurde jedoch immer die Überschneidung aus mindestens zwei siRNAs pro Zeitpunkt ausgewertet, sodass hier mindestens vier Messungen zugrunde liegen.

Die Auswahl der Filterkriterien (Signalmittelwert mindestens 100, $Call > 0,5$ und Änderung um den Faktor 2) beruht auf anerkannten und in vielen Publikationen verwendeten Größen, die falsch-negativ und falsch-positive Resultate minimieren.

Das wichtigste Maß bei der Detektion einer *Probe* ist die Fluoreszenzintensität, die von Affymetrix als „Signal“ bezeichnet wird. Nach Normierung über alle Chips eines Experiments werden alle *Probes* eines *Probesets* zu einem Signalmittelwert (*Mean*) zusammengefasst. Des Weiteren wurde für jeden Chip das Hintergrundrauschen bestimmt, welches in der Regel bei einem Signalmittelwert um 60 lag. Daher konnte der Filter für den Signalmittelwert (*Mean*) auf ≥ 100 gesetzt werden.

Auf dem *Microarray* existiert zu jeder *Probe* (*perfect match*) eine Kontrolle (*mismatch*). Aus dem Verhältnis *perfect match* / *mismatch* ergibt sich ein Maß für die Detektierbarkeit (*Call*). Bei einem *Call* $\geq 0,5$ gilt die Probe als zuverlässig detektiert. Daher wurde bei den Filterungen immer ein *Call* von $\geq 0,5$ gefordert.

Aus dem mittleren Signalwert wurde der Änderungsfaktor (*change factor*) folgendermaßen berechnet:

- falls Signal (behandelt) \geq Signal (Kontrolle): (Signal (behandelt) / Signal (Kontrolle)) - 1
- falls Signal (behandelt) < Signal (Kontrolle): - (Signal (Kontrolle) / Signal (behandelt)) + 1

Als Kriterium für eine Expressionsänderung wurde daher gefordert, dass das Signal nach der Behandlung entweder mindestens doppelt oder halb so groß ist: $|change\ factor| \geq 1$.

Die aus den Filterungen erhaltenen Gen-Listen wurden mittels Einzelrecherchen, verschiedener Analysen mit der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) auf ihre möglichen funktionellen Zusammenhänge und zugrundeliegende Aktivität von Transkriptionsfaktoren untersucht.

2.10.2 Gene set enrichment analysis (GSEA)

Mittels GSEA kann man ohne Schwellenwerte berechnen, ob in einem zu analysierenden Expressionsdatensatzes die Gene von (vorher) festgelegten Genlisten (*Gene set*) überrepräsentiert sind. Die unten genannten Erklärungen zur Wirkungsweise entstammen der Publikation „Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles“ (Subramanian et al., 2005) sowie der zugehörigen Homepage des Broad-Instituts (www.broadinstitute.org/gsea/).

Als erstes werden die Gene im Expressionsdatensatz mittels eines auswählbaren Testverfahrens (T-Test, Pearson) in eine geordnete (*ranked*) Liste überführt. Im Regelfall wird hierfür das Signal-Rausch-Verhältnis oder die Korrelation des Datensatzes mit der Genliste verwendet. Dann wird festgelegt, welche Klassen/Bedingungen man miteinander vergleichen will (z. B. Behandelt gegen Unbehandelt). Anschließend wird die Anzahl und Art der Permutationen festgelegt. Der GSEA-Algorithmus prüft dann, ob und an welcher Stelle in der geordneten Expressionsdatenliste Übereinstimmungen mit der Genliste vorhanden sind. Anhand dessen werden der Enrichment Score, der Normalisierte Enrichment Score, eine *False Discovery Rate* und ein Nominaler p-Wert berechnet:

Der ES (*enrichment score*) gibt an, wie stark die Genliste am oberen oder unteren Ende der geordneten Expressionsdatenliste überrepräsentiert ist. Der GSEA-Algorithmus berechnet den ES, indem er die geordnete Expressionsliste auf Übereinstimmungen mit einer festgelegten Genliste überprüft, um einen statistischen Wert (*Score*) bei einer Übereinstimmung zu erhöhen, bzw. zu verringern wenn kein Treffer dabei ist. Die Größe des Inkrements hängt dabei vom Ausmaß der Korrelation ab. Die maximale Entfernung von der Nulllinie wird dann als ES bezeichnet. Positive ES zeigen Überrepräsentationen im oberen Bereich der geordneten Liste an, negative ES zeigen Überrepräsentationen am unteren Ende der Liste an. Diejenigen Gene, die zum Erreichen des Extremums beitragen, werden als „leading edge subset“ bezeichnet und sind als die relevanteren zu betrachten.

Der Normalisierte ES dient als primäre Kenngröße, um GSEA-Ergebnisse auszuwerten und zu vergleichen. Durch Normalisierung des ES werden Unterschiede in den Größen der Genlisten und in den Korrelationen von Genlisten und Expressionsdatensätzen mit einbezogen. Er berechnet sich folgendermaßen: $NES = ES / (\text{Mittelwert (ESs gegen alle Permutationen des Datensets)})$.

Der nominale p-Wert schätzt die statistische Signifikanz eines ES für eine einzelne Genliste. Da dieser Wert aber nicht hinsichtlich Listengröße und Alphafehler-Inflation korrigiert ist, eignet er sich nicht für den Vergleich mehrerer Genlisten.

Die Falschbestimmungsrate (*False Discovery rate= FDR*) ist die geschätzte Wahrscheinlichkeit, dass eine Genliste mit einem bestimmten NES eine falsch positive Zuordnung ist. Die FDR wird als Verhältnis zweier Verteilungen berechnet: 1. der eigentliche ES versus den ESs für alle Genlisten gegen alle Permutationen des Datensatzes und 2. der eigentliche ES versus den ESs für alle Genlisten gegen den eigentlichen Datensatz. Die Autoren von GSEA sind der Ansicht, dass eine Schwelle von <25% aufgrund der geringen Anzahl an Datensätzen und der oft geringen Kohärenz in den Datensätzen gerechtfertigt ist.

3 Ergebnisse

3.1 *FLT3-Modulation mit niedermolekularen Substanzen und siRNAs*

Bei der Affinitätsbestimmung mit der *Display*-Technologie zeigten einige neue, Roche-eigene Kinaseinhibitoren eine vergleichbare Affinität für die (verwandten) Kinasen FLT3, FLT4, KDR, PDGFR und KIT.

Die ursprüngliche Idee zielte darauf ab, die Inhibitoren in Zelllinien, die mehrere oder alle diese Kinasen exprimieren, zu testen. Die fünf genannten Kinasen sollten einzeln mittels RNAi stillgelegt werden, um die Transkriptionsmuster direkt miteinander vergleichen zu können. Von den Zelllinien Jurkat, THP1, RS4;11, MOLM13 und MV4;11 sowie den primären Zellen HUVEC, die laut Literatur mindestens eine der relevanten Kinasen exprimieren, wurden Transkriptionsprofile erstellt. Von 75 weiteren Zelllinien wurden vorhandene Profile der Roche-Datenbank verwendet.

3.1.1 Expressionsprofilierung von Zelllinien

Keine der untersuchten Zelllinien exprimiert alle fünf der gesuchten Kinasen: in HUVEC wurden drei, in THP1 und MOLM13 jeweils zwei und in allen anderen untersuchten Zelllinien nur eine der fünf gesuchten Kinasen mit einem Signal über dem Hintergrund detektiert.

Die Kinase PDGFR wird in keiner der profilierten Zelllinien ausreichend exprimiert, die Kinase KDR nur in HUVECs. Die Kinase FLT4 wird in HUVEC und Jurkat exprimiert. Für die Kinase KIT sind laut der Affymetrix Profilierung die Zelllinien DLD1, UT7, THP1 und MOLM13 positiv. Die Zelllinien RS4;11, HL60, THP1, MOLM13 und MV4;11 exprimieren die Kinase FLT3 deutlich über dem Hintergrund (vgl. Tabelle 3.1-1).

Tabelle 3.1-1: Expression der fünf relevanten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in ausgewählten Zelllinien

Von den analysierten Tumorzelllinien und primären Zellen (HUVEC, HMVEC) werden nur diejenigen aufgeführt, die für eine oder mehrere der fünf relevanten Rezeptortyrosinkinasen einen Signalmittelwert > 100 (Affymetrix) aufweisen.

Gen-symbol	AFFY_ID	HUVEC	DLD1	JURKAT	K562	UT7	RS4;11	HL60	THP1	MOLM13	MV4;11
PDGFRB	202273_at	6	5	8	16	8	76	6	27	5	10
KDR	203934_at	935	9	26	16	26	14	13	9	8	6
KIT	205051_s_at	190	486	4	4	949	10	91	222	113	7
FLT3	206674_at	14	18	4	7	12	1139	133	565	2787	2177
FLT4	210316_at	103	28	188	7	32	11	63	16	18	20

Für den Versuchsansatz war es unerlässlich, dass das Einbringen der siRNAs in die Zelle so effizient und zugleich so schonend wie möglich erfolgt, um Störeffekte von vornherein zu minimieren. Bei einigen Zelllinien (Jurkat, THP1, MOLM13, DLD1 HL60) und den primären Zellen (HUVEC) gelang es

trotz ausführlicher Testung mit verschiedenen Methoden nicht, die siRNAs mit vertretbarer Zytotoxizität und ausreichender Effizienz (> 90 %) zu transfizieren, so dass auf diese Zelllinien und damit auch auf die Untersuchung der dort exprimierten Kinasen verzichtet werden musste. Als Konsequenz hieraus musste der ursprüngliche Gedanke verworfen werden, in einer Zelllinie die genannten fünf Kinasen mittels RNAi auszuschalten; stattdessen wurde der Fokus auf die Kinase FLT3 in den Zelllinien RS4;11 und MV4;11 gelegt. Untersuchungen zum Signalweg von FLT3 sind im Vergleichsmodell von RS4;11 mit MV4;11 deshalb besonders geeignet, da RS4;11 den Wildtyp dieser Kinase und MV4;11 eine konstitutiv aktive Mutante (internal tandem domain / ITD) exprimiert (Quentmeier et al., 2003).

3.1.2 Charakterisierung der siRNAs gegen FLT3

3.1.2.1 Herunterregulation von FLT3-mRNA und -Protein durch FLT3-siRNAs

Um die Spezifität der hier verwendeten FLT3-siRNAs zu testen, wurden vier verschiedene siRNAs mittels Elektroporation in RS4;11-Zellen eingeschleust. Von den nach 24, 48 und 72 Stunden geernteten Zellen wurde die relative Menge FLT3-mRNA per qPCR bestimmt. Die FLT3-siRNAs 1, 2 und 4 führten zu einer Reduktion der FLT3-mRNA um 71 bis 87 %, die FLT3-siRNA3 erreichte hier nur 53-70 % und wurde daher nicht weiter verwendet.

Die *Western-Blot*-Analyse zeigt, dass auch die Menge des FLT3-Proteins verringert wird (vgl. Abbildung 3.1-1). Man erkennt in den Kontrollversuchen mit unbehandelten, RISC-free- bzw. Luciferase-siRNA transfizierten Zellen bei einer Laufhöhe oberhalb der Markerbande bei 120 kDa zwei Banden von FLT3 (unglykosyliert 130 kDa bzw. glykosyliert 160 kDa). In den Spuren mit Lysaten der FLT3-siRNA behandelten Zellen ist diese Bande deutlich schwächer bzw. nicht mehr erkennbar.

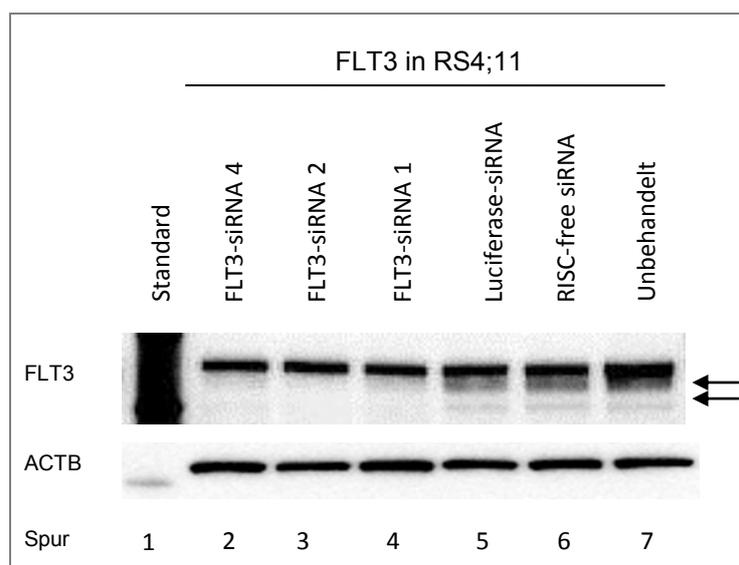


Abbildung 3.1-1: Detektion von FLT3 in RS4;11 nach siRNAs-Transfektion per *Western Blot*

RS4;11-Zellen wurden mit FLT3-siRNAs bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert und 24 Stunden später lysiert (Spur 1: Proteinstandard MagicMark™ 120kDa, Spuren 2-4: FLT3-siRNAs, Spuren 5-7: Kontrollansätze). Detektion mit anti-FLT3-Antikörper bzw. anti-ACTB-Antikörper. Aufgetragen sind 20 µg Lysat pro Spur. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von FLT3, die starke Bande (ohne Pfeil) repräsentiert ein für FLT3 zu hohes Molekulargewicht sowie eine zu starke Intensität und stellt daher vermutlich eine unspezifische Färbung dar.

Für die Verifizierung der im *Western Blot* detektierten, siRNA-medierten FLT3-Reduktion wurde die Expression von FLT3 per FACS-Analyse bestimmt. Normiert auf die Kontrollversuche zeigten die FLT3-siRNA transfizierten Zellen nach 16 Stunden eine FLT3-Restexpression von 33-37 %.

Für die Analyse der Auswirkungen der siRNA-Behandlung auf das Transkriptom von RS4;11 wurden die Zellen nach 24 Stunden lysiert (vgl. Tabelle 3.1-2). Wenn man die mit RISC-free siRNAs behandelten Proben als Referenzwert zugrunde legt, wurden mit den Standardkriterien nur sehr wenige Gene als dereguliert herausgefiltert. Um herauszufinden, ob dies eventuell an der verwendeten Referenz lag, wurden in einer weiteren Filterung unbehandelte Zellen als Basis verwendet. Hier ergaben sich ebenfalls nur sehr wenige Änderungen: Die vier durch RISC-free-siRNA-Behandlung hochregulierten Gene fanden sich auch bei den anderen siRNAs wieder, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um unspezifische Änderungen handelt. Die Anzahl der herab regulierten Gene ist sehr gering, aber FLT3 ist immer enthalten und bei der FLT3-siRNA1 sogar als einziges Gen (siehe Tabelle 9.2-1). Hier wurde das Signal durch die siRNAs um 76-77 % vermindert.

Tabelle 3.1-2 Anzahl der deregulierten Gene in der Zelllinie RS4;11 nach 24-stündiger Behandlung mit siRNAs

	Unbehandelt (↑/↓)	RISC-free-siRNA (↑/↓)	Luciferase-siRNA (↑/↓)	FLT3-siRNA1 (↑/↓)	FLT3-siRNA2 (↑/↓)	FLT3-siRNA4 (↑/↓)
RISC-free als Basis	0/4	-	1/0	0/1	0/4	0/3
Unbehandelt als Basis	-	4/0	5/1	6/1	8/6	5/4

(induziert ↑/ reprimiert ↓; Für den *change factor* der einzelnen Gene siehe Tabelle 9.2-1)

Des Weiteren wurde geprüft, wie sich die siRNA-medierte Herunterregulation von FLT3 auf die Stimulierbarkeit mit dem Liganden FLT3LG auswirkt. In den Kontrollversuchen (untransfizierte Zellen, RISC-free bzw. Luciferase-siRNA transfizierte RS4;11-Zellen) bewirkte eine zweistündige Inkubation mit dem Liganden eine übereinstimmende Induktion von fünf Genen (DUSP6, BATF3, SPRED2, EMP1 und PTPN7) und eine Repression von zwei Genen (SLC35E3 und LOC440864), während in den FLT3-siRNA transfizierten RS4;11-Zellen (Restexpression der FLT3-mRNA nach 24 Stunden < 25 %) keines dieser Gene bzw. überhaupt kein Gen durch Zugabe des FLT3-Liganden dereguliert wurde. Die beobachtete Verminderung der mRNA von FLT3 (siehe Tabelle 9.2-1) steht im Einklang mit der beobachteten Verringerung der FLT3-Proteinexpression (siehe *Western-Blot*, Abbildung 3.1-1).

Diese verschiedenen Ansätze zeigten, dass die hier verwendeten FLT3-siRNAs 1, 2 und 4 dazu führten, dass das Protein Wildtyp-FLT3 wirksam heruntermoduliert wurde und dass diese siRNAs sehr wenige bzw. keine unspezifische Effekte (*off target*) entfalteten.

Analog zum Vorgehen bei der Zelllinie RS4;11 (wt-FLT3) wurde die Zelllinie MV4;11 (FLT3/ITD) mittels Elektroporation transfiziert (siehe 2.8.3). Anfangs wurden unmodifizierte siRNAs (FLT3-siRNAs 1, 2 und 4) verwendet, später wurden sogenannte *On-Target Plus* (OTP)-siRNAs (FLT3-siRNAs 10,

11 und 12) eingeschleust, die laut Herstellerangaben aufgrund von O-Methylierungen des Sinn-Strangs weniger *Off-target*-Effekte hervorrufen sollten.

Die in der qPCR für relative Quantifizierung von mRNA allgemein gebräuchliche $\Delta\Delta$ -ct-Methode, bei der die Expressionshöhe eines bestimmten Transkriptes auf die Expressionshöhe eines Referenzgens normalisiert wird, erwies sich hier leider als nicht zielführend, da sich die *ct*-Werte der Referenzgene in den FLT3-siRNA-Ansätzen ähnlich denen von FLT3 zu höheren Zyklen verschoben, sodass nach Normierung jeweils nur ein geringer Knock-down festgestellt werden konnte. Allerdings war bereits bei den Inhibitorversuchen beobachtet worden, dass auch sämtliche Referenzgene durch die FLT3-Hemmung reprimiert wurden. Da die Transfektionskontrollen mit einem GFP-Vektor eine gute Transfektionseffizienz gezeigt haben und gleiche Mengen cDNA in die qPCR eingesetzt wurden, konnte angenommen werden, dass die Verschiebung der *ct*-Werte der Referenzgene auf die Hemmung von FLT3 zurückzuführen ist. Bei der Transkriptionsprofilierung mittels *Microarrays* wird nicht auf einzelne Referenzgene normiert sondern über das gesamte messbare Transkriptom. Letztendlich konnte dabei dann die siRNA-medierte Repression der FLT3-mRNA bestätigt werden (siehe Tabelle 9.2-1).

Dies übersetzt sich auch in MV4;11 in einen *Knock-down* des FLT3-Proteins, wie mittels *Western Blot* eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1-2). Der Antikörper gegen das FLT3-Protein detektiert in den Kontrollansätzen drei Banden im Größenbereich von 130 bis 160 kDa für ITD-FLT3 in MV4;11. Zwei der Banden sind in den mit FLT3-siRNA behandelten Ansätzen nicht mehr zu sehen. Die dritte Bande mit etwas geringerem Molekulargewicht ist wahrscheinlich unspezifisch.

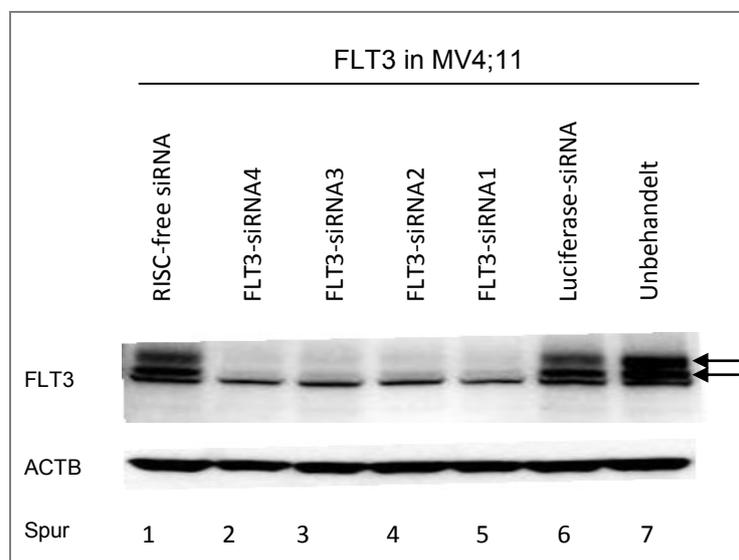


Abbildung 3.1-2: Detektion von FLT3 in MV4;11 nach siRNAs-Transfektion per *Western Blot*

MV4;11-Zellen wurden mit FLT3-siRNAs bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert und 24 Stunden später lysiert. Die Detektion erfolgte mit anti-FLT3-Antikörper bzw. anti-ACTB-Antikörper als Ladekontrolle. Spuren 2-5: FLT3-siRNAs; Spuren 1, 6 und 7: Kontrollansätze. Die Pfeile markieren die Laufhöhe von FLT3. Aufgetragen sind 20 μ g Lysat pro Spur.

3.1.2.2 Viabilität und Proliferation von MV4;11-Zellen werden durch FLT3-siRNAs stark beeinträchtigt

Nach der Elektroporation proliferieren die Zellen in den Kontrollansätzen (RISC-free- und Luciferase-siRNA transfiziert) ähnlich den unbehandelten Zellen, während die mit FLT3-siRNAs 10, 11 bzw. 12 transfizierten Zellen sterben. Innerhalb von drei Tagen fällt die Kurve auf etwa 20 % (siehe Abbildung 3.1-3).

Dass die siRNA-Transfektion an sich gut funktioniert hat, belegt der Ansatz mit der „AllStar All Cell Death (ACD)-siRNA“. Das Signal der ACD-transfizierten Probe beträgt 72 Stunden nach der Elektroporation weniger als 8 % der RISC-free-Kontrolle bzw. 31 % und zeigt, dass aufgrund der Transfektion der ACD-siRNA die meisten Zellen innerhalb kurzer Zeit sterben.

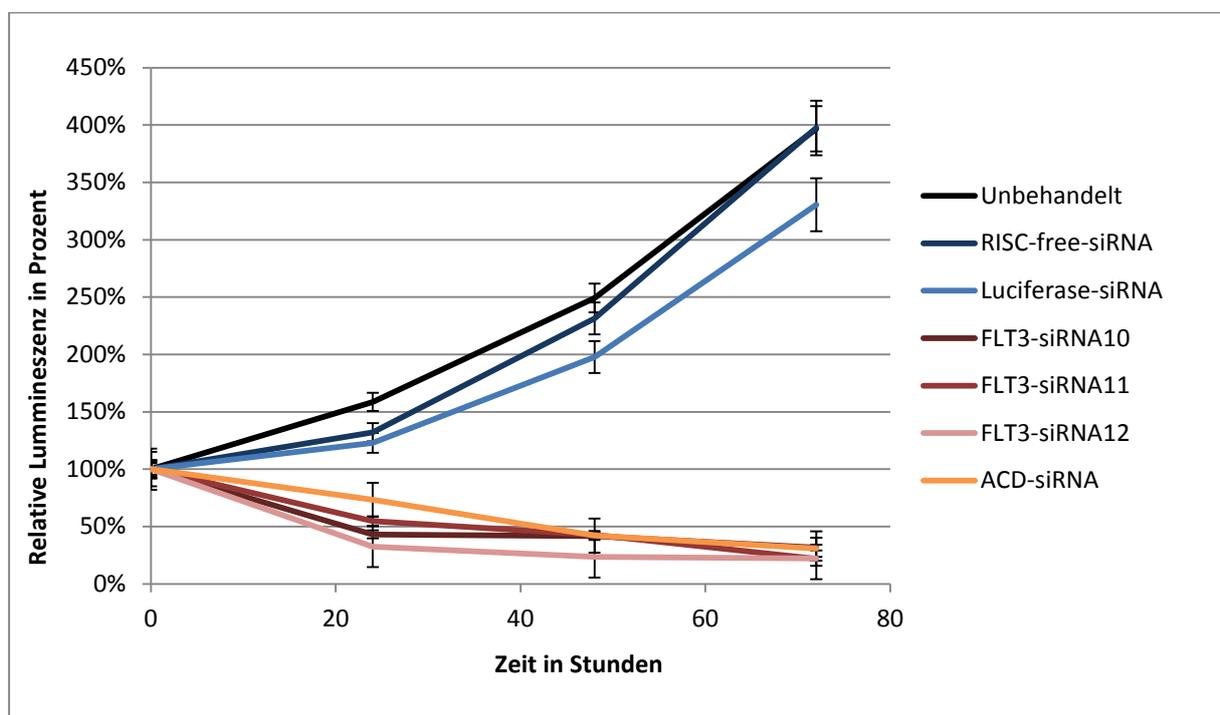


Abbildung 3.1-3: Viabilität von MV4;11-Zellen nach Transfektion von FLT3-siRNAs

MV4;11-Zellen wurden entweder nicht behandelt oder mit siRNAs transfiziert. 0, 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurde mittels CellTiterGlo®-Test der ATP-Gehalt als Maß für die Viabilität der ursprünglich gleich großen Teilmengen der Ansätze bestimmt. Es wurde jeweils auf den Zeitpunkt der Transfektion referenziert.

3.1.2.3 Auswirkungen der FLT3-siRNAs auf die Zellmorphologie und Zellzyklus

Zusätzlich zu den Effekten der Elektroporation auf die Zellviabilität wurden Effekte auf die Zellmorphologie untersucht. In Abbildung 3.1-6 erkennt man in den Kontrollversuchen (unbehandelte Zellen und RISC-free-siRNA-transfizierte Zellen) nur stark lichtbrechende kugelförmige Zellen, wie es für die Suspensionzelllinie MV4;11 typisch ist. Unter den mit FLT3-siRNAs transfizierten Zellen finden sich kaum noch Zellen dieser Größe und Morphologie, stattdessen erscheinen die Zellkörper etwas kleiner und granulärer. Des Weiteren sieht man vesikuläre Ausstülpungen an den Zellen und viele Zellfragmente, die auf Stress und Zelltod hindeuten.

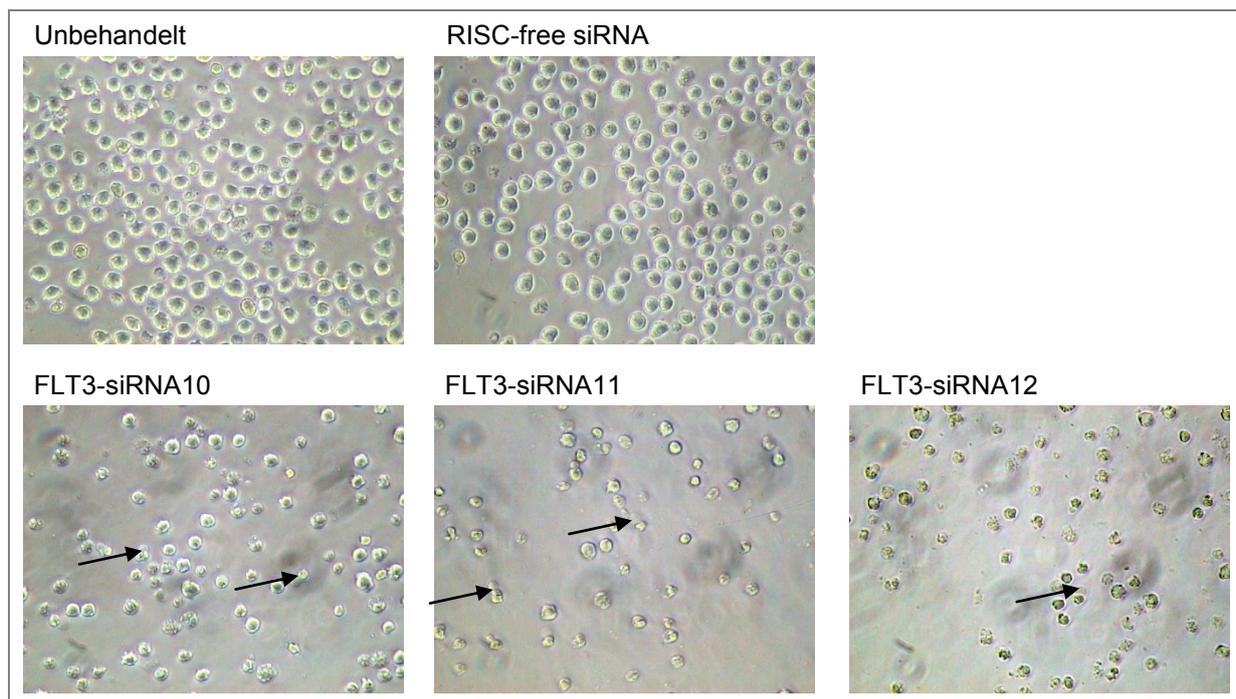


Abbildung 3.1-4: Veränderung der Morphologie von MV4;11-Zellen nach Transfektion verschiedener FLT3-siRNAs

Die Pfeile deuten bei den mit FLT3-siRNA behandelten Zellen auf vesikuläre Zellanhänge, kleinere granuläre Zellkörper und Zelltrümmer. (48 Stunden nach Transfektion, 400-fache Vergrößerung)

Parallel zu den Affymetrix- und *Western-Blot*-Studien wurden Teile der Zellpopulation hinsichtlich ihres Zellzyklus durchflusszytometrisch untersucht: Nach der Transfektion von FLT3-siRNAs veränderte sich die Verteilung deutlich. So ist der sogenannte subG1-Bereich in den FLT3-siRNA-Proben gegenüber den Kontrollproben deutlich größer. Da dieser Bereich hauptsächlich Zelltrümmer repräsentiert, ist von vermehrtem Zelltod auszugehen. Des Weiteren ist der prozentuale Anteil der G0/G1-Phase in den FLT3-siRNA-behandelten Proben leicht erhöht und der Anteil der Zellen in der S-Phase deutlich reduziert. Auf die G2/M-Phase ist die Auswirkung der FLT3-siRNA-Transfektion sogar noch stärker, da gegenüber den Kontrollversuchen nur noch ein Drittel der Zellen diese Phase des Zellzyklus aufweist (siehe Abbildung 3.1-5). Insgesamt deutet dies auf eine Hemmung des Zellzyklus innerhalb der G0/G1-Phase und schnellen Zelltod hin, sodass die Zellen gar nicht erst in die S-Phase eintreten und somit auch nicht in die G2- und M-Phasen übergehen können. Dies steht im Einklang mit den mikroskopisch beobachteten Veränderungen der Morphologie und den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.2.2.

Dass diese Zellzyklusveränderungen keine unspezifischen Folgen der siRNA-Transfektionen sind, zeigen einerseits die Ähnlichkeiten der Negativkontrollen (Luciferase-siRNA und *RISC free*-siRNA) mit den unbehandelten Zellen und andererseits die Unterschiede zur Positivkontrolle mit den Zelltod induzierenden *ACD*-siRNAs. Bei Transfektion mit letzteren ist der Anteil der Zellen in der subG1-Phase (Zelltrümmer) ebenfalls leicht erhöht, aber im Gegensatz zu den FLT3-siRNA-Proben ist der Anteil in der G0/G1-Phase gegenüber den Kontrollansätzen leicht vermindert und der Anteil der Zellen

in der G2/M-Phase gegenüber den Kontrollansätzen erhöht. Dies deutet auf einen G2/M-Arrest hin, bei dem die Trennung der Tochterzellen in der Telophase verhindert wird.

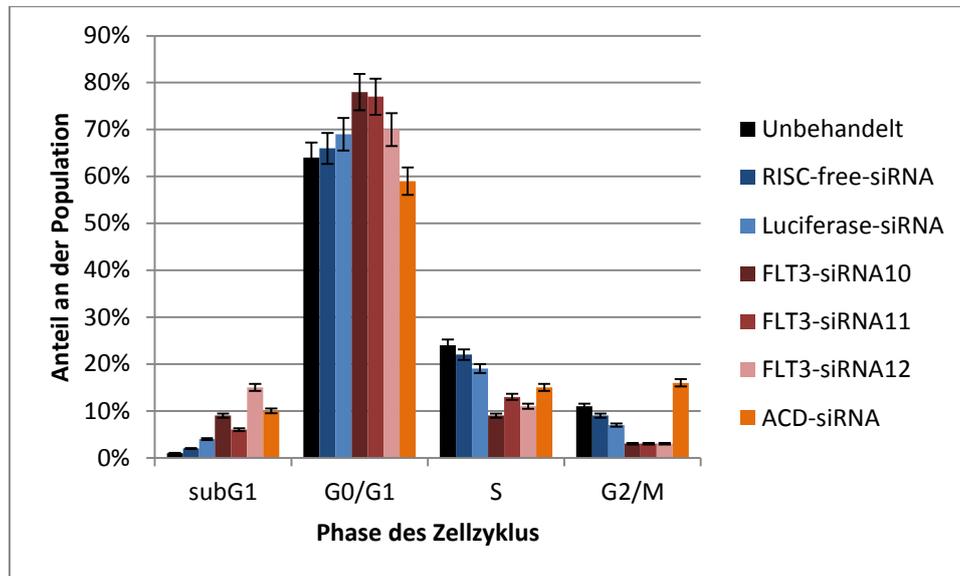


Abbildung 3.1-5: Durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklusstatus für die Zelllinie MV4;11 nach Behandlung mit verschiedenen siRNAs

3.1.2.4 FLT3-siRNA induzierte Genexpressionveränderungen bei der Zelllinie MV4;11

Für die Profilierung des FLT3-*knock-downs* nach 24-stündiger Behandlung wurden die Expressionsdaten der transfizierten MV4;11-Zellen nach den Standardkriterien gefiltert (vgl. 2.10). Die Anzahl der jeweils gegenüber den Kontrollexperimenten (Transfektion der *RISC-free-siRNA*) veränderten Gene sowie die Größe der Schnittmengen dieser Listen sind in Tabelle 3.1-3 zusammengefasst. Zum Vergleich ist dort auch die jeweilige Veränderung der FLT3-Expression angegeben.

Die unmodifizierten siRNAs verursachten übereinstimmend mit den modifizierten siRNAs die Induktion von 62 und die Repression von 112 Genen. Da diese 174 Gene also in 18 Experimenten (jeweils drei Replikate von drei unterschiedlichen, modifizierten bzw. unmodifizierten siRNAs) dereguliert wurden, wurde angenommen, dass sie zu diesem Zeitpunkt spezifisch für die FLT3-Hemmung sein sollten und für eine Signatur verwendet werden können.

Um die Spezifität dieser Änderungen zu bewerten, wurden sie mit den deregulierten Genen eines entsprechenden Kontrollversuchs (verschiedene siRNAs gegen Zellzyklusproteine / „AllStars cell death“ = ACD) verglichen. Dabei zeigte sich, dass von den 62 Genen, die durch alle sechs FLT3-siRNAs induziert wurden, nur drei Gene (AXL, CD44 und SLC7A11) ebenfalls durch die ACD-siRNA induziert wurden. Hingegen wurden von den 112 Genen, welche durch die FLT3-siRNAs reprimiert wurden, 66 durch die ACD-siRNA herunter reguliert. Da somit mehr als die Hälfte der reprimierten Gene der „FLT3-Signatur“ durch siRNAs, die nicht an FLT3 angreifen, beeinflusst wurde, musste die Spezifität dieses Teils der Transkriptionsänderung in Frage gestellt werden.

Tabelle 3.1-3: Expressionsveränderung von FLT3 und Anzahl an deregulierten Genen bei MV4;11 durch 24-stündige Behandlung mit siRNAs

Art der siRNA	FLT3-Expression (%)	Deregulierte Gene (↑/↓)	Schnittmenge (↑/↓)
Luciferase-siRNA	102	0/0	
FLT3-siRNA 1	52	193/339	140/274
FLT3-siRNA 2	44	241/593	
FLT3-siRNA 4	46	283/818	
Luciferase-siRNA (OTP)	107	3/4	
FLT3-siRNA 10 (OTP)	60	147/407	119/325
FLT3-siRNA 11 (OTP)	61	208/426	
FLT3-siRNA 12 (OTP)	46	285/725	
ACD-siRNA	101	188/510	

OTP = *On-TargetPlus*®

Eine funktionelle Analyse aller FLT3-siRNA- bzw. aller ACD-siRNA-medierten Transkriptionsänderungen ergab, dass durch beide siRNA-Spezies vor allem apoptose-assoziierte Gene beeinflusst wurden.

Die Schnittmenge (3↑/62↓) der sowohl von FLT3-siRNAs als auch von der ACD-siRNA deregulierten Gene bestand vor allem aus Genen der Zellzykluskontrolle bzw. Kontrolle der Replikation. Beispielsweise wurden BRCA1↓, CCNE2↓, CDC6↓, CDC25A↓, CENPK↓, CENPM↓, CHAF1A↓, CKS1B↓, DTYMK↓, ESCO2↓, FEN1↓, GINS1↓, GINS2↓, GINS3↓, HELLS↓, MCM2↓, MCM4↓, MCM6↓, MCM8↓, MCM10↓, MELK↓, MYBL2↓, NDC80↓, PLK4↓, POLE2↓, POLQ↓, RFC5↓, SPC25↓ und TOP2A↓ reprimiert und AXL↑, CD44↑ und SLC7A11↑ übereinstimmend induziert (siehe Tabelle 9.2-2). Die Gene in dieser Schnittmenge scheinen daher für ein potentielles FLT3-spezifisches-Muster nicht verwendbar.

Der Rest der durch die FLT3-siRNAs verursachten Transkriptionsänderungen hingegen könnte ein potentielles FLT3-Muster (46↓/59↑) darstellen (siehe Tabelle 9.2-3). Repräsentativ werden hier ARRB1↓, CALR↓, DUSP6↓, INHBA↓, IVNS1ABP↓, IL7R↓, PIM1↓, STK17B↓ und TFDP1↓ sowie BMF↑, CCR5↑, CDKN1C↑, CSF1R↑, DNASE2↑, ID2↑, IFG1↑, HTR2B↑, KIT↑, PECAM1↑, TSC22D3↑ und TXNIP↑ genannt. Zwar können auch sie, ebenso wie die unten genannten ACD-spezifischen Transkriptionsänderungen dem Umfeld von Zelltod und Apoptose zugeordnet werden, müssen aber als FLT3-spezifisch angesehen werden, da sie durch die ACD-siRNAs nicht signifikant beeinflusst wurden. Die ACD-spezifischen Transkriptionsänderungen (178↓/258↑) zeigten vor allem Bezug zum p53- oder GADD45-Signalweg: So wurden beispielsweise AGA↓, C5↓, CD302↓, CDCA7↓, CRLF3↓, CTSS↓, HIST1H1C↓, HIST1H2BD↓, HIST1H2BF↓,

ING2↓, KIF22↓, LY86↓, PRKACB↓, RTTN↓, RXFP1↓, TMEM71↓, TP53↓ bzw. ABTB2↑, ACSL1↑, ANPEP↑, CCND2↑, CDKN1A↑, CKAP4↑, CMBL↑, CYFIP2↑, CYTIP↑, DLX2↑, FAS↑, FNDC3B↑, GADD45A↑, ILR7↑, IL21R↑, NCF1↑, PTPRE↑, RHOC↑, STK17B↑, THBD↑, TNF↑ und TP53INP1↑ durch die ACD-siRNAs im Vergleich zu den FLT3-siRNAs anders beeinflusst (siehe Tabelle 9.2-4).

Aus den weitreichenden Überschneidungen trotz unterschiedlicher Ursachen ließ sich schließen, dass der Prozess des Zellsterbens zum Zeitpunkt der Messung (24 Stunden nach Transfektion) bereits weit fortgeschritten war. Daher wurden zusätzliche Messungen zu früheren Zeitpunkten (bei vier, acht und 16 Stunden) nach Transfektion durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der deregulierten Gene steigt, je stärker der FLT3-Knockdown und je mehr Zeit seit der Transfektion vergangen ist (siehe Tabelle 3.1-4).

Des Weiteren scheint das Ausmaß des FLT3-Knockdowns von der jeweiligen siRNA abhängig zu sein, da die nach vier Stunden erreichte Reduktion über acht, 16 und 24 Stunden weitgehend konstant blieb (Tabellen 3.1-3 und 3.1-4).

Tabelle 3.1-4: Veränderung der FLT3-Expression und Anzahl deregulierte Gene in MV4;11 vier, acht bzw. 16 Stunden nach Transfektion der siRNAs

Art der siRNA	Vier Stunden		Acht Stunden		16 Stunden	
	FLT3-Expression (%)	Deregulierte Gene (↑/↓)	FLT3-Expression (%)	Deregulierte Gene (↑/↓)	FLT3-Expression (%)	Deregulierte Gene (↑/↓)
Luciferase- siRNA	102	1 / 1	104	4 / 5	97	7 / 44
FLT3-siRNA 10	61	27 / 24	69	93 / 89	56	124 / 521
FLT3-siRNA 11	67	13 / 20	68	17 / 29	65	121 / 153
FLT3-siRNA 12	50	123 / 42	46	70 / 215	91	197 / 365
[Anz. aus Schnittmenge FLT3-siRNAs 10,11,12] minus [Anz. für Luciferase-siRNA]		8 / 1		14 / 7		59 / 88

Zunächst werden die Transkriptionsänderungen hinsichtlich bekannter Funktionen (*downstream* der Transkription) analysiert. Im nächsten Abschnitt wird auf Transkriptionsfaktoren und übergeordnete Modulatoren (*upstream* der Transkription) eingegangen.

Drei der acht übereinstimmenden Transkriptionsänderungen nach vierstündiger siRNA-Behandlung stehen funktionell direkt mit Transkription oder Translation in Zusammenhang: NFE2L2↑ (NRF2) ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der basischen Leucin-Zipper, dessen Aktivierung im Allgemeinen eine Antwort auf endogenen oder aus der Umwelt stammenden Stress darstellt. Infolge dessen können zytoprotektive Gene durch direkte Bindung von NFE2L2 an ein ARE (*anti-oxidant response element*) in deren Promotor induziert werden (Wakabayashi et al., 2010).

DDX17 \uparrow gehört zu den DEAD-Box-Proteinen, die durch das konservierte Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat-(DEAD)-Motiv charakterisiert werden. Diese (putativen) RNA-Helikasen spielen eine Rolle im RNA-Metabolismus: Je nach Umfeld fungieren sie als positive oder negative Transkriptionsregulatoren und interferieren mit der Sekundärstruktur von mRNAs, die wiederum das Ribosom- und Splicesosom-„Assembly“ beeinflusst (Fuller-Pace, 2013). Die Induktion der zytosolischen Leucin-t-RNA-Synthetase LARS \uparrow deutet auf Veränderungen bei der Translation hin. Da MAP4 in der Interphase oder Mitose zur Stabilisierung der Mikrotubuli beiträgt, deutet die hier beobachtete Induktion von MAP4 eine Störung dieses Prozesses an (Holmfeldt et al., 2007).

HIST1H1E \uparrow (H1.4; H1e, H1F4) kodiert für Histon H1E, eine der elf Isoformen von Histon H1 (Happel & Doenecke, 2009). H1E gehört also zu den basischen, nukleären Proteinen, die das Proteingerüst der Nucleosomen bilden. Dies könnte mit der veränderten DNA-Synthese zusammenhängen.

Des Weiteren wurden Induktionen bei Genen für Signaltransduktionsproteine detektiert: Die Serin/Threonin-Protein-Kinase WNK1 \uparrow (PSK) kann im ERK5-Signalweg die MAP-Kinasen MEKK2/3 aktivieren. Der Wachstumsfaktor PDGFA \uparrow (Platelet-derived growth factor A) kann als Hetero- oder Homodimer mit PDGF-Rezeptoren interagieren und dadurch diese Rezeptortyrosinkinasen mit deren Signalkaskaden aktivieren.

Die Repression des Zytokins TNF \downarrow bei vier und acht Stunden unter FLT3-Inhibition scheint insofern plausibel, als die Expression von TNF bei Mäusen durch mutiertes FLT3 erhöht wird (Eidenschenk et al., 2010). Nur diese eine Verbindung von FLT3 zu TNF wurde als indirekter Zusammenhang von der Software IPA gefunden. Die anderen deregulierten Gene können scheinbar nur über jeweils einen weiteren Knotenpunkt (hier entspricht dies den Transkriptionsfaktoren RB1, MYC und RELA, siehe 3.1.2.5) miteinander und mit FLT3 in Verbindung gebracht werden (siehe Abbildung 3.1-6).

gilt PRDM1 als eine Art Hauptschalter (*master regulator*) bei der Zelldifferenzierung (Bikoff et al., 2009; Hohenauer & Moore, 2012). Er reguliert u. a. die Transkriptionsfaktoren MYC↓, BCL6, BCL2A1, SPIB, FOS/AP1 und ESR1.

PNRC1↑ (proline-rich nuclear receptor coactivator; B4-2) beeinflusst als Coaktivator direkt die Transkription durch die RNA-Polymerasen II und III (Zhou et al., 2007). CREBRF (CREB3 regulating factor; LRF; C5orf41) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor für die RNA-Polymerase II und spielt eine Rolle in der „Unfolded protein response“ – einer zellulären Stressreaktion im Endoplasmatischen Retikulum, die bei dauerhafter Aktivierung in die Apoptose führt (Audas et al., 2008).

Neben den Veränderungen bei der Transkription scheint auch die pre-rRNA-Prozessierung beeinträchtigt, da das ebenfalls im Kern lokalisierte NIP7↓ (Nuclear import 7 homolog) reprimiert wurde. Dessen Repression kann die Zellproliferation beeinträchtigen (Morello et al., 2011). Zu ZC3H6↑ (zinc finger CCCH domain-containing protein 6) sowie zum Transporter TIMM8A↓ (mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A; DDP1) ist hinsichtlich Funktion wenig bekannt (Bassuk et al., 2013; Luo et al., 2013).

Einige Transkriptionsänderungen deuten acht Stunden nach der Transfektion der FLT3-siRNAs direkt auf die Veränderung des Zellzyklus bzw. Einleitung eines Zellzyklusarrests hin: Im Vergleich zu den bekannten Zellzyklusinhibitoren CDKN1A (CIP1) und CDKN1B (KIP1) aus derselben Proteinfamilie ist zu CDKN1C↑ (Cyclin-dependent kinase inhibitor; p57, Kip2) weniger bekannt (Borriello et al., 2011a). CDKN1C bindet in der G1-Phase an Cyclin-CDK-Komplexe, beeinträchtigt so den Zellzyklus (Larson et al., 2008), aber es kann auch unabhängig von CDKs über den intrinsischen (Mitochondrien)-Weg Apoptose auslösen (Vlachos et al., 2007). Durch BCR-ABL-Inhibitoren wird CDKN1C hochreguliert (Borriello et al., 2011b). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass CDKN1C mit der Zeit zunehmend stärker induziert wird. Den Zellzyklus-Inhibitor CDKN1A und das pro-apoptotische BAX kann SLC29A3↑ (solute carrier family 29 nucleoside transporters, member 3) regulieren (Cano-Soldado et al., 2008).

Der Zellzyklusregulator RGCC↑ (regulator of cell cycle) kann einen Komplex mit der PLK1 (polo-like kinase 1) formen, die für die Chromosomenverteilung wichtig ist. Außerdem kann RGCC die Aktivität der im Zellzyklus essentiellen Kinase CDC2/CDK1 regulieren. Vom atypischen Cyclin CCNG2↑ (Cyclin G2) ist bekannt, dass es durch anti-proliferative Stimuli induziert werden, die Mikrotubuli-Stabilität verändern und so ebenfalls zum Zellzyklusarrest beitragen kann (Arachchige-Don et al., 2006; Zimmermann et al., 2012). Die Serin/Threonin-Kinase ICK↑ (Intestinal cell MAK-like kinase; LCK2, MRK) kann RPTOR (regulatory associated protein of MTOR, RAPTOR, MIP1) regulieren, welches zusammen mit mTOR (mammalian target of Rapamycin) und GBL den mTOR-Komplex bildet. Es ist bekannt, dass durch zellulären Stress die Interaktion von RPTOR mit der Kinase mTOR stabilisiert wird, wodurch die Kinase inhibiert und der Zellzyklus angehalten wird (Alayev & Holz, 2013).

Neben den oben genannten werden auch die hinsichtlich ihrer Funktion weniger gut untersuchten Gene KLHL24↑, PYCRL↓, SEL1L3↑ und GABARAPL3↑ beeinflusst. Von KLHL24↑ (kelch-like 24) ist bekannt, dass es durch Zytokine wie EPO oder KITLG induziert wird (Kolbus et al., 2003) und somit,

in Analogie zu diesen, eine Verbindung zwischen KLHL24 und FLT3 durchaus möglich erscheint. PYCRL↓ (pyrroline-5-carboxylate reductase-like) ist an der L-Prolin-Biosynthese beteiligt und könnte auf eine Hemmung der Aminosäuresynthese hindeuten. Ob die Veränderungen bei SEL1L3↑ (suppressor of lin-12-like protein 3), welches mit Zytoskelett-Proteinen wie Vinculin und Tubulinen assoziiert (de Hoog et al., 2004) und GABARAPL3↑ für die Folgen des FLT3-Knock-downs von Bedeutung sind, bleibt offen.

Im Folgenden werden von den 147 Genen, die 16 Stunden nach der FLT3-siRNA-Transfektion übereinstimmend beeinflusst wurden, nur diejenigen Änderungen näher beschrieben, die untereinander oder mit den Beobachtungen zu früheren Zeitpunkten in Verbindung gebracht werden konnten.

Bei den Transkriptionsfaktoren ist besonders auffällig, dass der anti-apoptotische Transkriptions-Coaktivator BCL3↑ mit der Zeit immer stärker induziert wurde (siehe Tabelle 3.1-5). Der Transkriptionsfaktor DP1 (TFDP1↓) kann mit E2F-Proteinen heterodimerisieren, deren Bindung an die DNA fördern und somit die Transkription der E2F-abhängigen Gene regulieren. Darüber hinaus kontrolliert er die Expression verschiedener Zellzyklusgene, die im G1/S-Übergang eine Rolle spielen (Pruitt et al., 2012).

Eine gesteigerte Expression der TSC22 (Transforming growth factor beta-stimulated clone-22, TSC22-D1, D2, D3 und D4) kann zu Differenzierung, Apoptose oder Wachstumsverlangsamung von Zelllinien führen (Nakamura et al., 2012). Dies stünde mit der Induktion von TSC22D3↑ (DIP; GILZ) in diesen Versuchen in Einklang. Es ist aber auch berichtet worden, dass TSC22 durch die konstante Aktivierung von FLT3-TKD aber nicht durch FLT3-ITD induziert werden kann (Lu et al., 2007), was dem hier gefundenen zu widersprechen scheint. Allerdings stammen die Ergebnisse von Lu und Kollegen aus Versuchen mit FLT3-Überexpressionen, die im Vergleich zu physiologischen Expressionen andere Eigenschaften haben können.

Der Transkriptionsfaktor E2F8↓ reguliert die Expression von Genen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase benötigt werden. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor OLIG1↑ an BRCA1↓ und ID2↑ (Inhibitor of DNA binding 2) bindet (Ravasi et al., 2010; Samanta & Kessler, 2004). Der Tumorsuppressor BRCA1↓ bindet an die RNA-Polymerase II, interagiert mit HDACs und spielt daher sowohl bei der Transkription als auch bei der Reparatur beschädigter DNA eine wichtige Rolle. Zusätzlich fungiert er als Signalvermittler im G2/M-„Checkpoint“ (Pruitt et al., 2012).

Hinsichtlich des Zellzyklus werden zusätzlich zu dem bereits nach acht Stunden beeinflussten CDKN1C↑ auch die Phosphatase CDC25A↓, sowie die Cycline CCND2↓ und CCNE2↓ dereguliert. Im Laufe eines regulären Zellzyklus entfernt CDC25A inhibitorische Phosphat-Gruppen von den Kinasen CDC2/CDK1, CDK2 und CDK4 und ermöglicht somit den Übergang von der G1- zur S-Phase. Die Degradierung von CDC25A ist Teil des „DNA-Damage-Checkpoint“ und führt zum Zellzyklusarrest (Pruitt et al., 2012). CCND2↓ (Cyclin D2) reguliert die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4,

CDK6). CCNE2↓ wird auch als G1/S-spezifisches Cyclin E2 bezeichnet, da es CDK2 reguliert und mit den CDK-Inhibitoren CIPs/KIPs interagiert (Pruitt et al., 2012). Beide Cycline werden für den G1/S-Übergang benötigt.

Während das Transkript für Histon H1E (Histon 1 E; HIST1H1E) nur bei vier Stunden induziert war und später nicht mehr stark beeinflusst wurde, wurden die Transkripte für Histon H1.0 (H1F0), H2A (HIST1H2AC) und H2B (HIST1H2BD) mit der Zeit stärker induziert, was auf eine verstärkte DNA-Synthese deuten würde, aber dem beobachteten G1/G0-Arrest (siehe 3.1.2.3) widersprechen würde. Von dem hier wiederholt reprimierten Inhibin INHBA↓ ist bekannt, dass es die Zellproliferation verlangsamen und als Tumorsuppressor und Differenzierungsfaktor wirken kann (Zaragosi et al., 2010).

Die Repression von CDC6↓, CDC45↓ (cell division cycle 45 homolog), MCM4↓, MCM6↓, MCM8↓, MCM10↓, GINS1↓ und GINS2↓ deutet darauf hin, dass spätestens ab diesem Zeitpunkt auch die Replikation beeinträchtigt wird. Die „Mini-chromosome maintenance“-Proteine 2-7 formen als Hexamer eine DNA-Helikase und zusammen mit CDC6 und sechs ORC-Proteinen den Prä-Replikations-Komplex. Dieser wird erst durch die Bindung von CDC45 und GINS aktiviert (Boos et al., 2012). MCM8 ist kein Teil des MCM-Komplex, aber wichtig für dessen Bindung an die DNA. RNAi-vermittelte MCM8-Verringerung führt zu einem verspäteten Eintritt in die S-Phase (Gozuacik et al., 2003; Volkening & Hoffmann, 2005). MCM10 scheint an die DNA-Helikase zu binden und so die Initiation der Replikation zu fördern (Zhu et al., 2007).

Die Rezeptortyrosinkinase CSF1R↑ (colony stimulating factor 1 receptor; M-CSF-Rezeptor, FMS, CD115) ist der Rezeptor für CSF1 (M-CSF) und reguliert Überleben, Proliferation, Differenzierung und Motilität von Monozyten und verwandten Zellen dieser Differenzierungslinie CSF2RA↑ (colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity, granulocyte-macrophage; GM-CSF-Rezeptor-alpha, CD116) bildet zusammen mit CSF2RB den Rezeptor für CSF2 (GM-CSF). Das Zytokin CSF2 kontrolliert ebenfalls Überleben, Proliferation und Differenzierung von myeloiden Zellen.

Die Rezeptortyrosinkinase KIT↑ (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; SCFR, CD117) kann durch den Liganden SCF (stem cell factor) aktiviert werden und dadurch die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen unterstützen. Von aktivierenden Mutationen, Überexpression oder autokriner Stimulation von KIT profitieren aber auch die (Stamm-) Zellen vieler Tumorarten, besonders bei Leukämie und GIST (Lennartsson & Ronnstrand, 2006).

Aufgrund der großen Anzahl deregulierter Gene und da auf die meisten bereits weiter oben eingegangen wurde, wird hier nur auf die besonders relevant erscheinenden Gene eingegangen. (Die vollständige Liste ist unter 9.2-3 zu finden.).

Für eine potentielle FLT3-Inhibitions-Signatur (für den Zeitpunkt „24 Stunden nach der Transfektion“) scheinen CDKN1C (p57/Kip2), IFG1, ID2, AXL unter den induzierten Genen bzw. CDC2, CDC6, CDK2, TFDP1 und PIM1 als reprimierte Gene kennzeichnend. Ebenso sei der Transkriptionsfaktor ID2 hervorgehoben, da er während der Differenzierung als molekularer Schalter bekannt ist (Zenke & Hieronymus, 2006). Eine ausführlichere Beschreibung der weiteren beteiligten Gene findet sich beim Vergleich mit den Inhibitoren (3.1.3.5).

Des Weiteren wurde geprüft, ob durch die Transfektion der siRNAs möglicherweise als *off-target*-Effekt eine Interferonantwort ausgelöst wurde: von 23 überprüften Interferon-induzierbaren Genen hatten nur acht Gene ein messbares Signal und davon wiederum waren nur vier Gene schwach beeinflusst (9.2-23). Eine Interferonantwort erschien daher nicht relevant.

Der Vergleich der *downstream* verändert exprimierten Gene nach 24-stündigen Behandlungen war also nicht geeignet, aus den Transkriptionsmuster für die einzelnen Kinaseinhibitoren spezifische Signalwege abzuleiten. Daher wurden im Folgenden die Transkriptionsfaktoren (*upstream* der detektierten Transkriptionsänderungen) analysiert.

3.1.2.5 Analysen zur Aktivität und Expression von Transkriptionsfaktoren

Da anzunehmen ist, dass alle von den Inhibitoren gehemmten Kinasen über Signalkaskaden die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen, wurde durch den Vergleich mit publizierten Expressionsmustern versucht, auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach einer 24-stündigen Behandlung mit FLT3-siRNAs rückzuschließen (siehe Tabelle 9.2-6). Auch hierbei stehen Indikatoren für gestörten Zellzyklus und Zelltod im Vordergrund: Aktivierung von RB1, TP53, CDKN2A und Inhibition von E2F1, E2F2, E2F3 sowie MYC. Auf diese wird im Profilvergleich zwischen FLT3-siRNAs und Inhibitoren noch näher eingegangen.

Für kurze Behandlungsdauern wurde die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren ebenfalls analysiert. In Tabelle 3.1-5 sind die Veränderungen der Expression von beeinflussten Transkriptionsfaktoren gegen die Kontrollexperimente als *change factor* (+1 entspricht einer Induktion auf 200 %, -1 entspricht einer Repression auf 50 %) wiedergegeben. Auch wenn das Ausmaß der Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren zu einem bestimmten Zeitpunkt bei allen drei FLT3-siRNAs nicht immer gleich war, so war doch die Tendenz übereinstimmend.

Obleich Verbindungen zwischen den durch vierstündige Behandlung mit FLT3-siRNAs beeinflussten Genen (siehe Abbildung 3.1-6) zu den Transkriptionsfaktoren NFE2L2, MYC, RB1 und RELA angedeutet wurden, scheint nur NFE2L2 wirklich induziert. Aber MYC wird nur deshalb nicht als dereguliert ausgewiesen, weil die Repression durch FLT3-siRNA 11 nicht signifikant war (siehe Tabelle 3.1-5). Die FLT3-siRNAs 10 und 12 reprimierten MYC hingegen sowohl nach vier wie auch nach acht Stunden signifikant. Die Transkriptionsfaktoren CEBPD und PHB wurden nach acht Stunden ebenfalls nach diesem Muster gehemmt, während BCL3 und HDAC5 nur durch die siRNAs 10 und 12 signifikant induziert wurden. PRDM1 wurde nach acht Stunden hingegen durch alle drei FLT3-siRNAs induziert.

16 Stunden nach Transfektion war TFDP1 von allen drei FLT3-siRNAs reprimiert und HDAC5, BCL3 und STAT2 wurden übereinstimmend induziert. MED1 und TCF3 wurden zu diesem Zeitpunkt nur durch die FLT3-siRNAs 10 und 12 signifikant reprimiert während POU2F2 und NCOA3 durch diese induziert wurden. Wie oben bereits erwähnt, scheint die FLT3-siRNA 11 die mRNA von FLT3 und somit vermutlich auch das aktive Protein in etwas geringerem Umfang herab zu regulieren und daher weniger signifikante bzw. geringere Transkriptionsänderungen zu verursachen.

Tabelle 3.1-5: Expressionsveränderungen von Transkriptionsfaktoren bei MV4;11 nach vier-, acht- und 16-stündiger Behandlung mit FLT3-siRNAs

Regulator	Vier Stunden				Acht Stunden				16 Stunden			
	FLT3-siRNA10	FLT3-siRNA11	FLT3-siRNA12	Lucif.-siRNA	FLT3-siRNA10	FLT3-siRNA11	FLT3-siRNA12	Lucif.-siRNA	FLT3-siRNA10	FLT3-siRNA11	FLT3-siRNA12	Lucif.-siRNA
BCL3	0.3	0.3	0.5	0.0	1.7	0.9	1.5	0.0	1.2	1.3	1.9	-0.2
CEBPD	-0.3	0.1	-0.2	0.1	-1.0	-0.7	-1.2	0.1	-0.5	-0.5	-0.7	-0.1
CREBBP	0.1	-0.1	0.2	-0.2	0.4	0.2	0.4	0.0	0.7	1.2	0.7	0.3
ETS2	0.4	0.1	0.1	-0.2	1.1	0.7	0.8	-0.1	0.9	1.0	0.8	-0.1
FOS	-0.9	0.0	-1.5	0.1	-0.3	0.0	-0.6	-0.1	-0.1	0.2	0.2	0.1
HDAC5	0.6	0.4	0.5	0.2	1.1	0.4	1.4	-0.1	1.3	1.2	1.0	0.0
HNRNPD	0.0	-0.2	0.2	0.0	1.0	0.5	0.7	0.1	0.1	0.2	0.4	-0.3
MED1	0.1	0.1	-0.1	0.1	0.0	0.3	-0.4	0.2	-1.2	-0.4	-1.5	-0.2
MYC	-1.4	-0.6	-1.8	-0.1	-1.1	-0.7	-2.2	0.0	-0.3	-0.4	-0.7	0.0
NCOA3	0.0	0.0	0.0	0.1	0.6	0.5	0.7	0.0	0.6	1.7	1.2	0.1
NFE2L2	1.1	1.3	1.8	0.5	0.0	-0.6	0.0	0.3	-1.3	-0.6	-1.2	-0.6
PHB	-0.7	-0.4	-0.6	-0.3	-2.0	-0.4	-1.8	-0.3	-0.7	-1.0	-1.5	0.0
POU2F2	0.5	0.4	0.4	0.1	0.3	0.1	0.4	-0.2	0.6	1.2	1.3	0.0
PRDM1	1.0	0.7	1.4	0.1	1.5	1.4	1.5	-0.1	0.5	0.9	1.2	0.0
STAT2	0.3	0.1	0.5	0.0	1.0	0.6	1.1	0.1	1.1	1.3	1.4	0.2
TCF3	-0.2	-0.3	-0.1	-0.2	-0.7	-0.2	-0.8	-0.1	-1.5	-0.6	-1.5	-0.3
TFDP1	0.3	0.4	0.4	0.4	-0.1	-0.2	-0.3	0.2	-1.1	-1.2	-1.5	-0.2
WT1	-1.1	-0.7	-0.7	0.0	-0.4	-0.5	-1.1	0.0	-0.5	-0.6	-1.0	0.1

Angegeben ist der *Change factor*: 1 entspricht einer Verdopplung des Signals, -1 entspricht einer Halbierung des Signals (Lucif.-siRNA = Luciferase-siRNA hier zum Vergleich angegeben)

Da Transkriptionsfaktoren in erster Linie aktiviert oder reprimiert werden und dafür nicht zwangsläufig in ihrer Expression verändert sein müssen, erschien es sinnvoll, durch Vergleich mit publizierten Zusammenhängen aus einer größeren Anzahl von Transkriptionsänderungen (mittels IPA-Software) zu versuchen, auf die potentielle Aktivität von Transkriptionsfaktoren und übergeordneten Modulatoren rückzuschließen. Die nachfolgenden Aussagen über die Aktivierung bzw. Hemmung basieren auf Genexpressionsänderungen, die mindestens zweifach über oder unter dem Vergleichswert liegen.

Für die Analysezeitpunkte „vier Stunden“ bzw. „acht Stunden nach Transfektion“ konnte für keinen Transkriptionsfaktor etc. ein signifikanter „z-Score“ von > 2 erreicht werden. Dies ist vermutlich auf eine zu geringe Anzahl an Transkriptionsänderungen zurückzuführen. Zwar wurden die Expressionsänderungen einzelnen Transkriptionsfaktoren zugeordnet, jedoch wurde das (in der IPA-Software festgelegte) Signifikanzniveau nicht erreicht.

Aufgrund der Transkriptionsänderungen nach 16-stündiger Behandlung wurde die Aktivierung von RB1, TP53, CDKN2A und HNF4A bzw. die Inhibition von E2F1, E2F2, EGR2, MYC, TBX2 und TP63 abgeleitet (siehe Tabelle 9.3-15). Die Expressionssignale der Transkriptionsfaktoren EGR2, E2F1, E2F2, HNF4A, TBX2 und TP63 lagen unter dem Schwellenwert, sodass für sie die Veränderung der Expression nicht mit der Veränderung der Aktivierung verglichen werden konnte. Für die aktivierten Gene CDKN2A, RB1 und TP53 wurde keine signifikante Änderung der Expression detektiert. Daher konnte für diese Faktoren nur die Extrapolation zur veränderten Aktivität ausgewertet werden.

Allerdings erscheinen diese Vorhersagen aufgrund des beobachteten und für FLT3-Inhibitoren beschriebenen Zellzyklusarrests (Spiekermann et al., 2003) durchaus plausibel: CDKN2A und p53 sind gut charakterisierte Inhibitoren des Zellzyklus, RB kann in seiner phosphorylierten Form an E2F-DP binden und dadurch dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor für die im Zellzyklus wichtigen Cycline und die Phosphatase CDC25A hemmen (Jiang et al., 2000).

Die abgeleitete Inhibition von MYC nach 16 Stunden korrespondiert mit der beobachteten Repression bei vier und acht Stunden, welche aufgrund einer Rückkopplung mit der abgeleiteten Inhibition von E2F1 in Zusammenhang stehen könnte (O'Donnell et al., 2005).

Somit konnten aus den Genlisten Änderungen der Aktivität von Transkriptionsfaktoren extrapoliert werden, die plausibel erscheinen und mit den Beobachtungen zur Expression der Transkriptionsfaktoren in Einklang stehen.

3.1.3 Charakterisierung der niedermolekularen Kinaseinhibitoren

Die laut AMBIT-Analyse FLT3-spezifischsten (sowie zwei komplementäre) Substanzen wurden mittels biochemischen und zellulären Tests hinsichtlich verschiedener Aspekte der Inhibition wie Affinität, Spezifität und Zellgängigkeit charakterisiert.

3.1.3.1 Hemmung der rekombinanten FLT3-Kinase (biochemischer Test)

Ob ein niedermolekulares ATP-Analogon eine bestimmte Kinase zu hemmen vermag, lässt sich mittels eines biochemischen Tests ermitteln. Da es sich um ein definiertes *in-vitro*-System handelt, werden Faktoren wie Durchgängigkeit durch die Zellmembran, enzymatischer Um- oder Abbau ausgeschlossen.

Die rekombinante FLT3-Kinase phosphoryliert ein Rhodaminderivat-(JA133)-gekoppeltes Peptidsubstrat, welches danach durch einen Europium-markierten, phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper erkannt und gebunden wird. Durch die räumliche Nähe des Europiums zum Rhodaminderivat findet eine Energieübertragung (FRET) statt, sodass bei 665 nm ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Die zu testenden Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen mit dem rekombinanten FLT3 für zehn Minuten vorinkubiert, damit eine eventuelle Bindung an die ATP-Bindungstasche erfolgen kann. Anschließend wurde das Substrat dazu gegeben, die Fluoreszenzentwicklung gemessen und die Ableitung des Signalanstiegs berechnet. Aus dieser wurde die Hemmung für die eingesetzte Konzentration ermittelt und der IC50-Wert berechnet (siehe Tabelle 3.1-6 und Abbildung 3.1-7).

Tabelle 3.1-6: Hemmung der FLT3-Phosphorylierung *in vitro*

Inhibitorname	Biochemischer IC50 in nM
Sorafenib	390
CHIR-265	* > 10000
VX-680	150
RKI-1	* > 10000
RKI-2	* > 10000
RKI-3	1100
CFI-2	29
CFI-3	68

(* = extrapoliert)

Die Standardabweichung dieses Tests beträgt ca. 30 % und erlaubt daher nur eine grobe Einordnung in welcher Größenordnung ein Inhibitor die Kinase FLT3 hemmt. Für die Inhibitoren RKI-1, RKI-2 und CHIR-265 wurde im verwendeten Messbereich nur eine geringe Hemmung beobachtet. Der Inhibitor RKI-3 scheint im Bereich um 1 µM zu hemmen. Die vier übrigen Substanzen (Sorafenib, VX-680

sowie die Calbiochem FLT3-Inhibitoren CFI-2 und CFI-3) erscheinen deutlich potenter, da ihre IC50-Werte im sub-mikromolaren Bereich liegen.

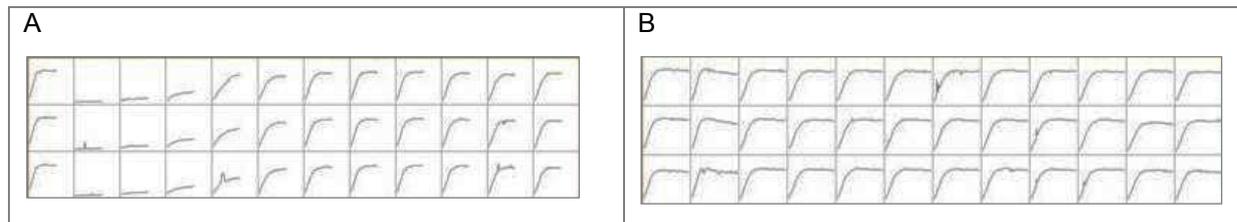


Abbildung 3.1-7: Fluoreszenzkurven der TRF-Messung

A) Sorafenib B) CHIR-265 Die einzelnen Messkurven repräsentieren jeweils auf der x-Achse die Zeit und auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität. 1. Spalte: Positivkontrolle=kein Inhibitor, 2. – 12. Spalte von links nach rechts: ausgehend von 1 µM mit dem Faktor 1: $\sqrt{10}$ verdünnte Inhibitorenkonzentrationsreihe.

Bei der Interpretation dieser Werte ist zu bedenken, dass es sich um ein artifizielles System handelt, welches die Reaktivität der Substanzen nur relativ zueinander bewerten kann, da in Zellen hinsichtlich ATP-Konzentration, pH-Wert, Metall-Ionen- und Puffer-Konzentrationen etc. jeweils andere Verhältnisse vorliegen können.

3.1.3.2 Hemmung der FLT3-Aktivierung

Die folgenden Tests stellen eine Zwischenstufe zwischen dem biochemischen Test und dem Proliferationstest dar. Der eine hat den Nachteil, dass die Bedingungen sehr künstlich sind. Bei dem anderen bleibt offen, ob wirklich die Hemmung des intendierten Zielmoleküls letztendlich die verminderte Proliferation bewirkt. Daher wurden nun die Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren auf die Inhibition der Liganden-vermittelten FLT3-Aktivierung (bei RS4;11) bzw. die Hemmung der konstitutiven Aktivierung (MV4;11) untersucht.

Da die Menge an phospho-FLT3 bei RS4;11 sehr gering ist, wurde ein ELISA verwendet, für welchen um den Faktor vier weniger Lysat benötigt wird und der darüber hinaus keine separate Immunpräzipitation erfordert.

RS4;11-Zellen wurden über Nacht mit 0,5 % FKS gezogen um endogene Phosphasen zu reprimieren, dann für zwei Stunden mit dem jeweiligen Inhibitor (in zehn Konzentrationsstufen) inkubiert und danach mit dem FLT3-Liganden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels ELISA der Gehalt an phospho-FLT3 bestimmt und auf die Menge Gesamt-FLT3 normiert (siehe Tabelle 3.1-7).

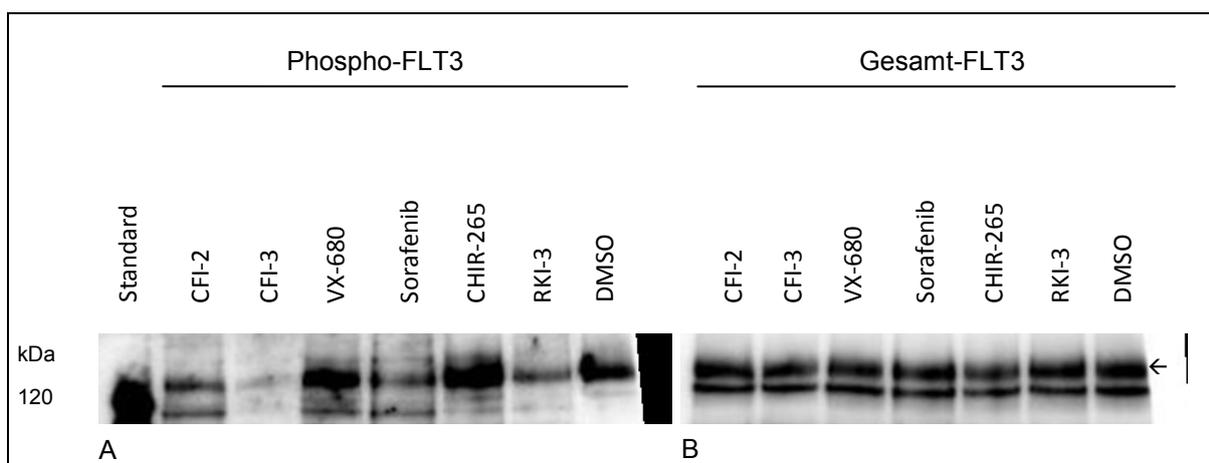
Tabelle 3.1-7: Hemmung der FLT3-Phosphorylierung bei der Zelllinie RS4;11

RS4;11-Zellen wurden mit zehn Konzentrationsstufen zwischen 10 μM und 0,32 nM des jeweiligen Inhibitors vorbehandelt, dann mit dem FLT3-Liganden (100 ng/ml) stimuliert und nach zwölf Minuten lysiert. Die Konzentrationen an phospho-FLT3 wurden auf die jeweiligen Konzentrationen an Gesamt-FLT3 normiert (beide per ELISA bestimmt).

Inhibitorname	pFLT3-IC50
Sorafenib (RO4475417)	32 nM
CHIR-265 (RO5169485)	> 10000 nM
VX-680 (RO4927461)	697 nM
RKI-1	> 10000 nM
RKI-2	2400 nM
RKI-3	848 nM
CFI-2	232 nM
CFI-3	160 nM

Diese ELISA-Daten zeigen, dass Sorafenib, VX-680, und RKI-3, sowie CFI-2 und CFI-3 prinzipiell die Phosphorylierung von FLT3 hemmen können. Dies stimmt mit den Vorhersagen der AMBIT-Analyse bzw. den Angaben des Herstellers überein. Für CHIR-265 und RKI-1 hatten die AMBIT-Messungen vorhergesagt, dass diese Substanzen FLT3 nicht hemmen können, auch dies bestätigt dieser ELISA. Die in der AMBIT-Analyse vorhergesagte starke FLT3-Hemmung für RKI-2 konnte in diesem ELISA nicht bestätigt werden, da der hier gemessene IC50 im Vergleich zu den anderen Inhibitoren recht hoch ist.

Nach der Testung auf Inhibition von Wildtyp-FLT3-Aktivierung wurde auf Inhibition von konstitutiv aktivem FLT3-ITD getestet, da es prinzipiell möglich ist, dass diese Mutation die Bindungsfähigkeit der Inhibitoren beeinflusst. Um eine äquivalente Dosis der verschiedenen Kinase-Inhibitoren auf den Zellen einzusetzen, wurde die zellulären IC50 (siehe 3.1.3.3.) verwendet.

**Abbildung 3.1-8: Detektion von phosphoryliertem FLT3 per Western Blot**

Nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen FLT3 (sc480) von MV4;11-Zelllysaten wurde mit einem phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper (4G10) phospho-FLT3 (A) und wiederum mit sc480 das Gesamt-FLT3 (B) detektiert. Pro Spur wurde das Äquivalent von 2,5 Mio. Zellen aufgetragen. Der Pfeil markiert die Bande der aktiven Form von FLT3.

Wie in Abbildung 3.1-8 A zu sehen, ist die Intensität der FLT3-Bande in den Spuren von VX-680 und CHIR-265 ungefähr dieselbe wie in der Spur des Kontrollansatzes mit DMSO. Diese Substanzen inhibieren also ITD-FLT3 bei der eingesetzten Konzentration nicht. Dagegen ist die FLT3-Bande in den Spuren CFI-2, CFI-3 sowie Sorafenib und RKI-3 deutlich schwächer. Dies deutet darauf hin, dass diese Inhibitoren neben der Wildtyp-Form auch die ITD-mutierte Form von FLT3 inhibieren.

3.1.3.3 Ermittlung der zellulären IC₅₀ (Proliferationstest)

In mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden die Zellen für fünf Tage mit den verschiedenen Inhibitoren in Wachstumsmedium mit 2,5 % FKS behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, per Lumineszenz wurde die Konzentration an ATP bestimmt und in relative Proliferationswerte umgerechnet (CellTiterGlo®-Test, siehe Tabelle 3.1-8).

Tabelle 3.1-8: IC₅₀-Werte der getesteten Inhibitoren

Angegeben sind die Inhibitorkonzentrationen (Mittelwerte \pm Standardabweichungen), bei denen die Proliferation nach fünf Tagen zu 50 % gehemmt wird, sowie der Quotient der IC₅₀-Werte.

Inhibitorname	Bei MV4;11	Bei RS4;11	Quotient IC ₅₀ RS4;11/IC ₅₀ MV4;11
Sorafenib	2,4 nM \pm 0,5 nM	6,4 μ M \pm 2,2 μ M	2666
CHIR-265	1,53 μ M \pm 0,67 μ M	0,55 μ M \pm 0,12 μ M	0,4
VX-680	51 nM \pm 9 nM	17 nM \pm 3 nM	0,3
RKI-1	0,16 μ M \pm 0,06 μ M	0,36 μ M \pm 0,12 μ M	2,3
RKI-2	2,6 μ M \pm 1,2 μ M	24,8 μ M \pm 18,7 μ M	9,5
RKI-3	0,84 μ M \pm 0,25 μ M	5,25 μ M \pm 0,88 μ M	6,3
CFI-2	0,24 μ M \pm 0,07 μ M	1,35 μ M \pm 0,52 μ M	5,6
CFI-3	36 nM \pm 11 nM	3,77 μ M \pm 0,72 μ M	105

Vorausgesetzt, dass ein Inhibitor Wildtyp-FLT3 und FLT3-ITD in gleichem Ausmaß inhibiert (da bei der ITD die ATP-Bindungstasche der Kinasedomäne nicht mutiert ist), würde ein *sehr FLT3-selektiver* Inhibitor nur MV4;11 hemmen und RS4;11 kaum beeinträchtigen, da ohne Stimulation durch den FLT3-Liganden FLT3 in der Zelllinie RS4;11 nicht aktiv ist. Dementsprechend müsste der IC₅₀ für RS4;11 deutlich größer sein als für MV4;11. Aus dem Vergleich der IC₅₀-Werte für diese beiden Zelllinien lässt sich eine erste Abschätzung der FLT3-Selektivität ableiten.

Bei diesen Vergleichen konnten zwar andere Ursachen für die Wachstumshemmung der MV4;11-Zellen, wie die Hemmung FLT3-nachgeschalteter Kinasen oder FLT3-unabhängige, zelllinienspezifische Mechanismen nicht ganz ausgeschlossen werden. Zumindest für Sorafenib, welches die Zelllinie MV4;11 (mit der konstitutiven FLT3-Aktivierung) mit einer über 2000-fach geringeren IC₅₀ hemmt als die FLT3-Wildtyp-Zelllinie, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die wachstumshemmende Wirkung auf eine spezifische FLT3-Hemmung zurückzuführen ist. Dies wird einerseits durch die Daten der vorangegangenen Tests (siehe 3.1.3.1 und 3.1.3.2) untermauert und wurde auch von Auclair und Kollegen gezeigt (Auclair et al., 2007).

Die IC50-Werte des Inhibitors CFI-3 liegen zwar nur um den Faktor 100 auseinander, aber auch hier erscheint aufgrund der obengenannten Tests und der Erstbeschreibung durch Furet und Kollegen eine echte FLT3-Spezifität zu bestehen (Furet et al., 2006).

Für die übrigen getesteten Inhibitoren hingegen scheint eine FLT3-Spezifität eher unwahrscheinlich (RKI-1, RKI-2, RKI-3, CFI-2) oder ausgeschlossen (CHIR-265, VX-680).

3.1.3.4 Genexpressionsanalyse bei MV4;11 nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren

Die Veränderungen der Genexpression durch die Applikation der niedermolekularen Inhibitoren wurden analog zu den initialen siRNA-Experimenten nach 24-stündiger Behandlung analysiert (siehe Tabelle 3.1-9). Durch Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren wurden durchweg deutlich mehr Gene reprimiert als induziert. Die Anzahl der beeinflussten Gene ist bei vier der sechs Inhibitoren ähnlich, bei CHIR-265 und VX-680 etwas geringer.

Tabelle 3.1-9: Anzahl deregulierter Gene in MV4;11 durch Behandlung mit niedermolekularen Inhibitoren nach 24 Stunden im Vergleich zum FLT3-siRNA-Muster (62↑/112↓)

Behandlung	Inhibitor-behandlung (↑/↓)	Intersektion mit FLT3-siRNA-Muster (↑/↓)	Prozent des Inhibitor-Musters (gerundet) (↑/↓)	Prozent des siRNA-Musters (gerundet) (↑/↓)	Rang der Ähnlichkeit
Sorafenib	258 / 598	34 / 88	13 % / 15 %	55 % / 79 %	2
CHIR-265	68 / 224	13 / 53	20 % / 24 %	21 % / 47 %	6
VX-680	115 / 350	20 / 73	17 % / 21 %	32 % / 65 %	5
RKI-2	246 / 894	29 / 90	10 % / 10 %	47 % / 80 %	1
CFI-2	278 / 809	33 / 77	12 % / 10 %	53 % / 69 %	3
CFI-3	345 / 521	34 / 69	10 % / 13 %	55 % / 62 %	4

(Medium mit 10 % FKS)

Die prozentuale Auswertung der Intersektionen deutet daraufhin, dass 76 bis 90 % der Inhibitor-bedingten Transkriptionsänderungen **nicht** auf eine FLT3-Inhibition zurückzuführen sind. Allerdings kommt es bei der Interpretation auf die Bezugsgrößen an: Bezogen auf die jeweilige Anzahl der Inhibitor-bedingten Genexpressionsänderungen zeigte der Inhibitor CHIR-265 die größte Überschneidung mit dem FLT3-siRNA-Muster und RKI-2 die kleinste. Mit dem FLT3-siRNA-Muster als (einheitlicher) Bezugsgröße relativierte sich dies: Hier überlappte das Muster von CHIR-265 mit dem siRNA-Muster am wenigsten und bei Sorafenib am meisten.

Des Weiteren überschneiden sich (aufgrund des geringeren Umfangs des siRNA-Musters) die Muster der Inhibitoren zu deutlich niedrigeren Prozentsätzen (10-24 %) mit dem siRNA-Muster als umgekehrt

(21-80 %). Bis zu vier Fünftel des siRNA-Musters wurden demnach in den Inhibitor-Mustern wiedergefunden.

Zur funktionellen Einordnung der beeinflussten Gene wurden die assoziierten molekularen bzw. zellulären Funktionen mittels IPA analysiert. Die jeweils fünf signifikantesten Funktionen sind in Tabelle 9.2-5 zusammen mit den p-Werten der zugrunde liegenden Gensets wiedergegeben.

Die Analyse zeigte eine große Übereinstimmung zwischen den Auswirkungen der Inhibitorbehandlung mit der FLT3-siRNA-Behandlung: die (von IPA aus Veröffentlichungen abgeleiteten) Funktionen „Zellzyklus“ und „DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur“ wurden von allen Inhibitoren und den FLT3-siRNAs beeinflusst. Die Funktionen „Zelltod und -überleben“, „Zellwachstum und -proliferation“ wurden durch fünf der sechs getesteten Inhibitoren und durch die FLT3-siRNAs moduliert.

Zur Funktion „Zellzyklus“ zählen Expressionsveränderungen bei Genen, deren Proteine für den korrekten Ablauf des Zellzyklus (u. a. AURKA↓, AURKB↓, PLK4↓, die Cycline CCNB1↓, CCNE2↓, CCNG2↑, POLA1↓, POLD1↓) und die *Check-point*-Kontrolle (u. a. BRCA1↓, CDKN1A↓, CHEK1↓) verantwortlich sind.

Bei der Funktion „DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur“ ist die Expression von Genen für die Chromosomen- und Chromatidensegregation (u. a. CENPE↓, CENPF↓, CENPH↓, DSN1↓, HJURP↓, KIF2C↓, MAD2L1↓, NCAPD3↓, NCAPG↓, NCAPG2↓, NCAPH↓, NDC80↓, SMC1A↓, SMC2↓, SPC25↓, TOP2A↓), die DNA-Synthese und -Recycling (u.a. ADA↑, PCNA↓, RFC3↓, TYMS↓) und Reparatur von DNA-Schäden (u. a. DCLRE1B↓, DNA2↓, EXO1↓, FEN1↓, NEIL3↓, POLQ↓, RAD51↓, RAD54B↓, RAD54L↓, RRM1↓, UNG↓) verändert.

Hinter der Funktion „Zelltod und -überleben“ verbirgt sich die veränderte Transkription typischer Apoptose- und Antiapoptose-Gene wie BAX↓, BCL3↑, BCL6↑, BIRC5↓, BMF↓, SIVA↓, SOCS1↓. Die Funktion „Zellwachstum und -proliferation“ beinhaltet Gene, die im Zusammenhang mit dem Zellzyklus für fast alle Zellen stehen (s.o.), aber auch solche, die wie CD37↑ und CD84↑ zelltypspezifisch sind.

Die genannten Funktionen stehen in Übereinstimmung mit den im Kapitel 3.1.3.3 und den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen zur FLT3-Inhibition. Auf die Bedeutung der einzelnen Gene, die durch alle Inhibitor-Behandlungen und FLT3-siRNA-Transfektionen gemeinsam beeinflusst wurden, wurde bereits im Kapitel 3.1.2.5 (siRNA-Muster nach 24 Stunden) näher eingegangen. Sie bieten (daher) keinen Ansatz zur differenzierenden Charakterisierung der Inhibitoren.

Außer den übereinstimmenden zellulären Funktionen gibt es aber auch solche, bei denen sich die Inhibitoren anscheinend voneinander unterscheiden: Bei Sorafenib- und CHIR-265-Behandlung war besonders die Transkription von Genen der Funktion „Zellaufbau und -organisation“ verändert (allerdings auch bei der Behandlung mit den FLT3-siRNAs). Dabei handelt es sich vor allem um Gene, die die Organisation des Zytoskeletts, die Trennung, Orientierung und Anordnung der Chromosomen, Formation der mitotischen Spindel und des Nukleus umfassen. Dies ist von der Interpretation her aber schwer vom Zellzyklus zu trennen, sodass sich auch hieraus keine Anhaltspunkte für eine exklusive Aktivität dieser Inhibitoren ergaben.

Die Transkriptionsänderungen aufgrund der Behandlung mit VX-680 deuten im Vergleich mit den anderen Inhibitoren auf signifikante Veränderungen im Umfeld der Biochemie niedermolekularer Stoffe, beim Lipid- Metabolismus sowie beim Vitamin- und Mineralien-Metabolismus hin. In allen drei Funktionen sind zwar auch einige Gene für ubiquitär exprimierte Enzyme, Transporter und Rezeptoren enthalten (u. a. ACAT2↓, AKR1C1/AKR1C2↓, EBP↓, F2R↑, IDI1↓, INSIG1↓, MMP2↑, NSDHL↓, PDSS1↓, PPARA↑, SC5DL↓, SCARB1↓, STARD4↓). Aber die Enzyme für die Synthese von Aminosäuren (u. a. ASNS↓, CKB↑) und die Aufnahme von Glucose (u. a. PFKFB4↓, PLAUR↓, PTPRE↓, SLC2A3↓) sind für Veränderungen der Funktion „Biochemie niedermolekularer Stoffe“ kennzeichnend. Hinter der Bezeichnung „Lipid- Metabolismus“ verbergen sich u. a. Gene für die Synthese und Verstoffwechselung von Fetten und Cholesterol (ACACA↓, CYP51A1↓, DHCR24↓, DHCR7↓, FAR1↓, FDPS↓, HMGCR↓, LPIN1↓, LSS↓, SCD↓). Die Funktion „Vitamin- und Mineralien-Metabolismus“ basiert u. a. auf der veränderten Transkription der Gene HSPA8↓, MTHFD1↓, MTHFD1L↓, PPARD↓, RDH10↓.

Durch die Behandlung mit dem Inhibitor CFI-3 scheint in besonderem Maße die Funktion „Genexpression“ beeinflusst zu sein. Hierbei ist vor allem die Transkription von Genen, die die Bindung an Promotoren bewirken (u. a. ETS2↑, ID2↑, IFI16↑, MYC↓, SMAD3↑, SSBP2↑) und zur Transkription der DNA beitragen (u. a. ARNT↑, CTNNBIP1↑, JUND↓, MYBL2↓, NFATC2↑, NOLC1↓, PA2G4↓, POLR2H↓, POLR2L↓, RUNX2↑, STAT2↑, TAF4B↓, TCF4↑, ZHX2↑) verändert. Besonders ARNT, NFATC2, TAF4B und ZHX2 waren durch CFI-3 besonders stark und exklusiv dereguliert.

Die Transkriptionsmuster der Kinase-Inhibitoren CFI-2 und RKI-2 heben sich mit der Funktion „post-transkriptionelle RNA-Modifikation“, d.h. durch die Modulation von Genen für Polyadenylierung (PNPT1↓) und Splicen (SRPK1↓) von mRNA sowie der Modifikation von rRNA und tRNA (AARS↓, DDX56↓, IMP4↓, PES1↓, RCL1↓, UTP20↓, TSEN2↓, WDR12↓) von denen der anderen Inhibitoren ab.

Die bisherigen Auswertungen lieferten leider keine Hinweise auf inhibitorspezifische Interaktionen. Um eventuell doch auf solche, möglichen Wechselwirkungen rückschließen zu können, wurden im folgenden von den Inhibitor-Genlisten diejenigen Gene abgezogen, die durch die FLT3-siRNAs nach 24 Stunden beeinflusst worden waren (vgl. 3.1.2.4).

Hierfür wurde aber nicht das durch Intersektion gebildete FLT3-siRNA-Muster von den Inhibitor-Genlisten subtrahiert, da in diesem Muster sich nur solche Gene befinden, die bei jedem entsprechenden Versuch beeinflusst wurden.

In einer weiteren Analyse wurde anstatt der Schnittmenge der Transkriptionsänderungen durch unmodifizierte und OTP-FLT3-siRNAs (62↑ / 112↓) die Vereinigungsmenge (197↑ / 487↓) subtrahiert (siehe Tabelle 3.1-10). Dies erschien sinnvoll, um auch solche Gene einzuschließen, die reproduzierbar jeweils in einer der beiden Untergruppen der FLT3-siRNAs, aber nicht allen Ansätzen beeinflusst wurden. Dementsprechend wurden Gene, um die die Vereinigungsmenge größer als die Schnittmenge ist (135↑ / 375↓) nicht analysiert, da sie weder als *FLT3-Inhibitions-bedingt* noch als *FLT3-Inhibitions-unabhängig* bezeichnet werden können.

Tabelle 3.1-10 Anzahl der potentiell *FLT3*-Inhibitions-unabhängig beeinflussten Gene

Behandlung	Transkriptionänderungen nach Subtraktion der <i>FLT3</i> -siRNA-Vereinigungsliste (↑/↓)
Sorafenib	183 / 288
CHIR-265	45 / 70
VX-680	73 / 156
RKI-2	177 / 559
CFI-2	162 / 526
CFI-3	259 / 302

Die Auswertung „nach Subtraktion“ wies für die Muster der Inhibitoren nur bei der Funktion „Zelltod und -überleben“ und nur teilweise bei „Zellwachstum und -proliferation“ Übereinstimmungen mit dem *FLT3*-siRNA-Muster auf. Bei den verkürzten Inhibitor-Listen waren nun stattdessen Gene der Funktionen „Biochemie niedermolekularer Substanzen“ und (außer bei RKI-2) „Lipid-Metabolismus“ sowie „Vitamin-und Mineralien-Metabolismus“ überrepräsentiert.

Für die Inhibitoren VX-680 und CHIR-265 traten nach der Subtraktion des *FLT3*-siRNA-Musters Gene der Funktion „Zellentwicklung“ hervor. Dies umfasst vor allem Gene, die bei der Differenzierung von Zellen eine Rolle spielen, wie *CD300A*↓, *CXCR4*↑, *EGR1*↓, *NOG*↑, *NOTCH2*↑, *SOCS1*↓, *TRIB3*↓.

Für den Inhibitor CFI-2 blieb auch nach der Subtraktion des *FLT3*-siRNA-Musters die Funktion „posttranskriptionelle Modifikation von RNA“ charakteristisch. Für RKI-2 war diese Funktion zusammen mit der Funktion „Nukleinsäure-Metabolismus“ mit Genen für die Biosynthese und Modifikation der Nukleotide und ihrer Vorstufen (u. a. *ADA*↑, *AK2*↓, *APRT*↓, *CTPS*↓, *HPRT*↓, *NDUFS6*↓, *PNP*↓, *PRPS1*↓) unter den fünf signifikantesten Funktionen kennzeichnend (siehe Tabelle 3.1-11).

Tabelle 3.1-11: Zelluläre Funktionen der Genexpressionsveränderungen

Für jeden Inhibitor wurden die „Top 5“ der zellulären Funktionen angegeben (generiert mit IPA). Die zugrundeliegende Anzahl der Übereinstimmungen mit der jeweils gesamten Liste ist grau hinterlegt. In Klammern ist zum Vergleich die Anzahl der Transkriptionsänderungen nach Subtraktion des FLT3-siRNA-Musters angegeben. p-Werte der einzelnen Subsets < 0,01; siehe Tabelle 9.2-5)

Funktion	Sorafenib (856)	VX-680 (465)	CFI-3 (866)	CFI-2 (1087)	CHIR-265 (229)	RKI-2 (1140)	FLT3- siRNAs- Muster (174)	FLT3- siRNA- Union (684)
Biochemie nieder- molekularer Substanzen	(106)	99 (65)	(108)	(137)	(43)	(112)		
DNA-Replikation, -Rekomb. u. - Reparatur	207	91	116	152	101	189	47	170
Genexpression			170					
Lipid- Metabolismus	(74)	67 (53)	(73)	(83)	(31)			
RNA post- transkript. Modifikation				50 (38)		55 (40)		
Nukleinsäure- Metabolismus						(45)		
Vitamin- und Mineralien- Metabolismus	(35)	36 (36)	(30)	(38)	(16)			
Zellorganisation und -aufbau (Assembly)	302				56		22	93
Zellentwicklung		(66)			(38)			
Zelltod und -überleben	302 (164)	(81)	273 (185)	318 (210)	125 (51)	332 (211)	63	202
Zellwachstum und Proliferation	302 (149)		271 (171)	324	131	346 (211)	68	220
Zellzyklus	230	109	146	177	105	214	45	189

Die um das FLT3-siRNA-Muster reduzierten Transkriptionsprofile der Inhibitoren wurden analog zum Vorgehen beim FLT3-siRNA-Muster (3.1.2.5) hinsichtlich der potentiell zugrundeliegenden Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren analysiert (Tab. 9.3-2). Diejenigen Transkriptionsfaktoren, die bereits aufgrund der FLT3-siRNA-Versuche als potentiell beteiligt bezeichnet wurden (vgl. Kapitel 3.1.2.5), müssen als direkt oder indirekt FLT3-Inhibitions-abhängig angesehen werden. Auf diese wird daher bei der Analyse hinsichtlich möglicher *Off-target*-Effekte der Inhibitoren nicht weiter eingegangen. Des Weiteren wurden jene Transkriptionsfaktoren von der weiteren Analyse ausgenommen deren zugeordneten Listen eine statistische Verzerrung der reprimierten und induzierten Gene im Vergleich zum zu analysierenden Datensatz (*Bias*) aufwiesen.

Diese Analyse zeigte, dass ein Rückschluss auf mögliche *upstream*-Regulatoren zwar prinzipiell möglich ist, allerdings die Aussagekraft bisher noch begrenzt ist. Aufgrund der starken Vernetzung (Signalnetzwerke statt linearer Signalwege (*Pathways*)) erscheint es derzeit unmöglich, beobachtete Transkriptionsänderungen auf die Hemmung einzelner Kinasen zurückzuführen. Als Vergleichsgrundlage würde man die Transkriptionsmuster der spezifischen Hemmung aller in der Zelle exprimierten Kinasen im zeitlichen Verlauf benötigen. Wie hier am Beispiel von FLT3 beobachtet, ist die Erstellung eines solchen Musters mit vielen Unsicherheiten behaftet, da Kinaseinhibitoren mehr oder weniger umfangreiche *off-target*-Effekte (siehe Tabellen 9.3-3 bis 9.3-8) hervorrufen können und direkte Folgen kaum von indirekten unterschieden werden können.

Analog zu der oben genannten Analyse, mittels IPA aus den Transkriptionsänderungen auf die potentielle Beteiligung von (*upstream agierenden*) Transkriptionsfaktoren zu schließen, wurde versucht auf beteiligte Kinasen und Phosphatasen rückzuschließen (siehe Tabellen 9.3-9 bis 9.3-14).

Dabei wurde nur für eine Phosphatase eine Veränderung abgeleitet: Die Transkriptionsmuster Sorafenib, CFI-3, CFI-2 und RKI-2 ähneln denen einer PTEN-Aktivierung, dies wäre gleichzusetzen mit einer PI3K-Hemmung, da PTEN der Gegenspieler der PI3-Kinase ist. Dies deutet auf eine Hemmung des PI3K-Signalweges hin. Bei den Behandlungen mit Sorafenib bzw. CFI-2- wird dies durch die postulierte PI3K-Inhibition, bei CFI-3 durch die postulierte AKT1-Inhibition unterstützt. Da vom PI3K-Signalweg bekannt ist, dass er *downstream* von FLT3 eine Rolle spielt, kann daraus eine direkte Hemmung der PI3-Kinase durch die Inhibitoren weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Ähnlich verhält es sich mit der abgeleiteten Inhibition von CDK2 (*Cyclin dependent kinase 2*) durch CFI-2 und CFI-3. Sie deutet auf die Aktivierung des Kontrollpunkts für DNA-Schäden (DNA damage checkpoints) und einen daraus resultierenden, allerdings bei allen Inhibitoren beobachteten, Zellzyklusstopp hin.

Überraschenderweise zeigte die IPA-Extrapolation auf *upstream*-agierende Kinasen, dass die Expressionsprofile der hier getesteten Inhibitoren u.a. denen einer Hemmung der ERBB2-Kinase ähneln (siehe Tabellen 9.3-9 bis 9.3-14). MV4;11 ist nämlich (wie oben beschrieben) eine Leukämiezelllinie. Ihr Affymetrix-Expressionsignal für brustkrebstypischen Rezeptor ERBB2 liegt bei ca. 20 und somit deutlich unter der als verlässlich eingestuften Quantifizierungsgrenze von 100. Bei Brustkrebszelllinien wie SKBR3 oder KPL4 beträgt dieses Signal hingegen 4000 bis 6000.

Somit scheint es ausgeschlossen, dass die Expressionsprofile tatsächlich auf eine ERBB2-Hemmung zurückzuführen sind. Da aber sowohl der Signalweg von FLT3-ITD wie auch von ERBB2 über die Ras/MEK/ERK-Kaskade und den PI3K-Weg gehen (Fink & Chipuk, 2013), könnte die Hemmung beider Rezeptortyrosinkinasen ähnliche Transkriptionsmuster hervorrufen. Des Weiteren führen sowohl eine FLT3- wie auch eine ERBB2-Hemmung letztendlich meist zum Zelltod (z. B. ALDOC↓, CCND3↓, EGR1↓, PGK1↓ u.v.a.m.).

Das Gleiche gilt für die anderen abgeleiteten Kinaseinhibitionen. Die meisten stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Zelltod, bis auf EIF2AK3. Diese Kinase phosphoryliert und inaktiviert

normalerweise EIF2, wodurch die Initiation der Translation und somit die gesamte Proteinbiosynthese reduziert werden (Pruitt et al., 2012). Daher deutet diese postulierte Inhibition nach CFI-2-Behandlung eher auf eine verstärkte Proteinbiosynthese hin.

Die Interpretation der abgeleiteten Inhibition der Zellstress-aktivierten JUN-Kinasen (MAPK8, MAPK9, MAPK10, MAP2K4 und MAP2K7) und p38-Kinasen (MAPK11, MAPK12, MAPK13 und MAPK14) gestaltet sich ebenfalls schwierig, da sie wichtige Signalüberträger sowohl bei der Zellproliferation (u. a. FLT3 vermittelt!) als auch bei der Apoptose sind, sodass sich auch deren abgeleitete Inhibition nicht eindeutig als direkte Interaktion mit Sorafenib interpretieren lässt.

Gleiches gilt für die Kinasen MAPK1 (ERK2) und MAPK3 (ERK1), welche in verschiedenen Kinasekaskaden als Signalüberträger agieren, in denen sie von diversen *upstream* Kinasen aktiviert werden, sodass auch ihre abgeleitete Inhibition keine genaueren Rückschlüsse zulässt.

Die Kinase MTOR agiert *downstream* der MAPK-, AKT- bzw. WNT-Signalwege, mediiert zelluläre Antworten auf Wachstumsfaktoren (z. B. auch FLT3-Ligand) sowie Stress (DNA-Schädigung und Nahrungsentzug) und kontrolliert die Proteinsynthese. Die hier abgeleitete Inhibition von MTOR könnte daher zwar eine direkte Folge der FLT3-Inhibition aber auch eine indirekte Folge des dadurch ausgelösten Zellstress sein.

Die Kinase PIM1 spielt, wie weiter oben schon erwähnt, im AML-Signaling eine wichtige Rolle für die Steuerung des Zellzyklus, bei der Transkription und bei der Apoptose. Die abgeleitete Inhibition von PIM1 bei CFI-2, CFI-3 und RKI-2 steht im Einklang mit der beobachteten schwachen Repression bei den Nicht-FLT3-Inhibitoren und der starken Repression dieser Kinase bei den vermuteten FLT3-Inhibitoren sowie den FLT3-siRNAs nach 24 Stunden. Dies deutet eher auf eine Folge der FLT3-Inhibition als eine direkte Hemmung von PIM1 hin.

Die Proteinkinasen C (PKCs, u.a. Proteinkinase C epsilon: PRKCE) können durch Kalzium und den *second messenger* DAG aktiviert werden, können ihrerseits viele zelluläre Zielproteine phosphorylieren und spielen daher in vielen zellulären Signalwegen eine Rolle (Pruitt et al., 2012).

Die zytosolische, membranassoziierte Tyrosinkinase SRC wird u. a. als Komponente des FLT3-ITD-Signalweges beschrieben (Leischner et al., 2012), sodass die hier abgeleitete Inhibition als Folge der Sorafenib vermittelten FLT3-Hemmung interpretiert werden kann. Es wäre aber auch möglich, dass Sorafenib SRC direkt hemmt, wie Zhao und Kollegen beschrieben haben (Zhao et al., 2011).

Die Serin-/Threonin-Kinase TGFBR2 (Transforming growth factor beta receptor 2) aktiviert nach TGF-bindungsinduzierter Dimerisierung über verschiedene Signalwege die Transkription proliferationsassoziiierter Gene. Die hier postulierte Inhibition entspricht der Beobachtung eines Proliferationsstopps. Die Expression von TGFBR2 wird zwar weder durch die Inhibitoren noch die FLT3-siRNAs in ihrer Expression signifikant moduliert, jedoch erscheint es möglich, dass die Aktivität von TGFBR2 direkt durch Sorafenib inhibiert wird, wie dies bereits bei Zhang und Kollegen beschrieben wurde (Zhang et al., 2013).

Tabelle 3.1-12: Extrapolierte Aktivitätsänderungen von Kinasen und einer Phosphatase bei der Zelllinie MV4;11 nach 24-stündiger Behandlung mit Kinaseinhibitoren

Kinase/ Phosphatase	Sorafenib	VX-680	CFI-3	CFI-2	CHIR-265	RKI-2
AKT1	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
CDK2	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
EIF2AK3	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.
ERBB2	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert
ERK1/2	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
Jnk (versch.)	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
MAPK1	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.
MAPK3	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
Mek(versch.)	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	Inhibiert
MTOR	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
P38 MAPK	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
PI3K (complex)	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.
PIM1	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert*	n.s.v.	Inhibiert*
Pkc(versch.)	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
PRKCE	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	Inhibiert*
PTEN	Aktiviert	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert	n.s.v.	Aktiviert
SRC	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
TGFBR2	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.

*Bias; versch. = verschiedene; n.s.v. = nicht signifikant verändert, p-Werte siehe Tabellen 9.2-14 ff

Fazit der 24-stündigen Behandlungen mit Kinaseinhibitoren

Die Transkriptionsprofile für 24-stündige Behandlung mit Kinaseinhibitoren unterscheiden sich zwar quantitativ und auf der Ebene der einzelnen betroffenen Gene recht stark (siehe Abbildung 9.2-2). Trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen stimmen die Profile jedoch funktionell nicht nur untereinander sondern auch mit denen der FLT3-siRNAs weitgehend überein. Sie alle deuten auf einen Zellzyklusarrest und Zellsterben hin. Die Inhibitor-vermittelte Apoptose ist anscheinend so weit fortgeschritten, dass im jeweiligen Transkriptionsmuster allgemeine, meist pro-apoptische Veränderungen dominieren und eventuelle substanzspezifische off-target-Muster der initialen Blockade nicht ableitbar sind.

Daher wurden für Sorafenib und CFI-3 Genexpressionsprofile für kürzere Behandlungszeiten (vier, acht und 16 Stunden) erstellt. Die Behandlung erfolgte dabei entweder in Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) oder mit 0,5 % FKS (siehe Tabelle 3.1-13). Durch die Reduktion des Serumgehalts sollte eine potentielle Stimulation durch im FKS enthaltene Wachstumsfaktoren vermindert werden.

3.1.3.5 Vergleich der frühen Transkriptionsänderungen nach Behandlung mit Inhibitoren bzw. FLT3-siRNAs

Die einzelnen Gene des FLT3-siRNA-Musters wurden bereits im Abschnitt 3.1.2.4 beschrieben, daher wird im Folgenden nur auf die jeweilige Schnittmenge eingegangen. Weshalb diejenigen Gene, die nicht in diesen Schnittmengen enthaltenen sind, nicht als potentiell inhibitorspezifischen Änderungen interpretiert wurden, wird im Diskussionsteil erörtert.

Tabelle 3.1-13 Anzahl an differentiell regulierten Genen in MV4;11 nach vier-, acht- und 16-stündiger Behandlung mit Sorafenib bzw. CFI-3

Behandlung	Vier Stunden (↑/↓)	Schnittmenge (↑/↓)	Acht Stunden (↑/↓)	Schnittmenge (↑/↓)	16 Stunden (↑/↓)	Schnittmenge (↑/↓)
Sorafenib mit 10 %	43 / 108	30 / 70	68 / 90	52 / 50	43 / 164	21 / 98
Sorafenib mit 0,5 %	89 / 187		262 / 257		110 / 257	
CFI-3 mit 10 % FKS	82 / 247	53 / 129	210 / 553	75 / 311	326 / 652	61 / 184
CFI-3 mit 0,5 % FKS	129 / 198		132 / 432		126 / 268	
DMSO mit 10 % FKS	4 / 1	0 / 0	0 / 4	0 / 0	4 / 0	0 / 0
DMSO mit 0,5 % FKS	1 / 0		1 / 0		1 / 10	

In den Behandlungen mit Sorafenib wurden unter reduziertem Serumgehalt mehr Gene beeinflusst als unter 10 % Serum (siehe Tabelle 3.1-13). Dementsprechend erscheint es plausibel, dass auch die Überschneidungen zwischen der Behandlung unter reduziertem Serumgehalt mit den siRNA-Behandlungen größer sind als unter 10% Serumgehalt. Bei den Behandlungen mit CFI-3 war es genau umgekehrt. Um die Effekte des Serumgehaltes auszuschließen, wurden im Weiteren nur die Intersektionen der Behandlungen mit den FLT3-siRNAs, der Behandlung bei 10% Serum und der Behandlung bei 0,5% Serum analysiert. Die darin enthaltenen Gene wurden demzufolge konsistent in verschiedenen Ansätzen beeinflusst und können als FLT3-abhängig angesehen werden.

Wie bereits bei der Auswertung der Transkriptionsänderungen durch die Behandlung mit der FLT3-siRNAs festgestellt, zeigte auch der Vergleich der Transkriptionsänderungen durch die Behandlung mit den Inhibitoren dass die Gemeinsamkeiten mit den Änderungen durch die FLT3-siRNAs 10 und 12 oft größer sind als mit jenen durch die FLT3-siRNA 11. Daher wurde im Folgenden jeweils sowohl die Schnittmenge mit allen drei FLT3-siRNAs als auch mit mindestens zwei FLT3-siRNAs analysiert (siehe Tabelle 3.1-14). Im nachfolgenden Text sind diejenigen Gene, die hierbei durch alle drei FLT3-siRNAs beeinflusst wurden, mit einem Stern (*) markiert.

Tabelle 3.1-14 Quantitativer Vergleich der beeinflussten Gene nach vier-, acht- und 16-stündiger Behandlung mit FLT3-siRNAs bzw. mit niedermolekularen Inhibitoren

Vergleich	Vier Stunden (↑/↓)	Schnittmenge (↑/↓)	Acht Stunden (↑/↓)	Schnittmenge (↑/↓)	16 Stunden (↑/↓)	Schnittmenge (↑/↓)
Sorafenib (10 % FKS) ∩ 3 FLT3-siRNAs	0 / 1	0 / 1	4 / 1	4 / 1	13 / 27	9 / 22
Sorafenib (0,5 % FKS) ∩ 3 FLT3-siRNAs	0 / 1		9 / 4		18 / 39	
CFI-3 (10 % FKS) ∩ 3 FLT3-siRNAs	0 / 1	0 / 1	9 / 5	6 / 4	39 / 63	16 / 32
CFI-3 (0,5 % FKS) ∩ 3 FLT3-siRNAs	2 / 1		7 / 5		21 / 34	
Sorafenib (10 % FKS) ∩ mind. 2 FLT3-	7 / 7	6 / 5	13 / 18	13 / 16	20 / 45	13 / 35
Sorafenib (0,5 % FKS) ∩ mind. 2 FLT3-	7 / 12		31 / 43		28 / 72	
CFI-3 (10 % FKS) ∩ mind. 2 FLT3-siRNAs	7 / 12	6 / 9	27 / 60	13 / 45	63 / 131	22 / 59
CFI-3 (0,5 % FKS) ∩ mind. 2 FLT3-siRNAs	10 / 12		17 / 52		29 / 67	

Für Sorafenib wurde sowohl mit 0,5 % als auch mit 10 % FKS nach vier Stunden übereinstimmend mit (mindestens) zwei FLT3-siRNAs eine Induktion von CCNG2↑, KLHL24↑, METTL7A↑, TSC22D1↑, YPEL2↑ und YPEL3↑ und eine Repression von CCND3↓, INHBA↓, PLD6↓, SLC7A5↓ und TNF↓*, beobachtet.¹ Darüber hinaus konnte in den Versuchen mit Sorafenib nur in Anwesenheit von 0,5 % FKS die übereinstimmende Repression von DUSP6↓, F3↓, MYC↓, PIM1↓ und PLAUR↓ festgestellt werden. Von diesen haben, wie bereits weiter oben erwähnt, die Cycline CCND3 und CCNG2, sowie Activin A (INHBA), MYC und TNF einen unmittelbaren Bezug zum G1/S-Checkpoint. Diese Transkriptionsänderungen deuten auf eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren SP1 (p-Wert=9*10⁻⁷), TP53 (p-Wert=1,4*10⁻⁶) und MYC (p-Wert=1*10⁻⁶) hin. Vor diesem Hintergrund legt die tatsächlich gemessene Repression von MYC eine Rückkopplungsschleife nahe.

Die Induktion des Transkriptionsfaktors TSC22D1 scheint für die FLT3-Hemmung spezifischer, da dieser Leucin-Zipper nicht ganz so häufig in Erscheinung tritt. Er gilt als potentieller Tumor- bzw. Leukämie-Suppressor, der das Zellwachstum verlangsamen und die Differenzierung beschleunigen kann (Lu et al., 2007; Yu et al., 2009).

Die Yippee-ähnlichen Proteine YPEL2 und YPEL3 spielen bei der Zellteilung eine Rolle und sind während der Interphase an Zentrosom und Nucleolus bzw. während der Mitose an der Spindel zu finden (Hosono et al., 2004). YPEL3 wird durch p53 induziert, gilt ebenfalls als Tumorsuppressor und induziert zelluläre Seneszenz (Berberich et al., 2011).

¹ Stern (*) markiert Überschneidungen mit allen drei FLT3-siRNAs.

Nach acht Stunden nach Behandlungsbeginn wurde wieder die Induktion von CCNG2 \uparrow^* , KLHL24 \uparrow^* , METTL7A \uparrow und YPEL3 \uparrow bzw. Repression von INHBA \downarrow und SLC7A5 \downarrow durch zwei FLT3-siRNAs und Sorafenib (bei 0,5 % und 10 % FKS) beobachtet. Hingegen waren zu diesem Zeitpunkt erstmalig übereinstimmend AHNAK \uparrow , BLNK \uparrow , CREBRF \uparrow^* (auch c5orf41; LRF), HIST1H2AC \uparrow , HIST1H2AG \uparrow , IL10RA \uparrow , NAPS \uparrow , CREBRF \uparrow^* (auch c5orf41; LRF) und TP53INP1 \uparrow induziert bzw. DLX1 \downarrow^* , ANKLE1 \downarrow , CBR1 \downarrow , CCDC86 \downarrow , FKBP4 \downarrow , MCM10 \downarrow , PHB \downarrow , PUS \downarrow , RNASEH1 \downarrow , RRS1 \downarrow , SLC43A3 \downarrow , SLCO4A1 \downarrow und TSR1 \downarrow reprimiert.

Weitere acht Stunden später wurden erneut CREBRF \uparrow^* (auch c5orf41; LRF), HIST1H2AC \uparrow , HIST1H2AG \uparrow und MCM10 \downarrow beobachtet. Zusammen mit CDC45 \downarrow , CDC6 \downarrow , DNA2 \downarrow , FEN1 \downarrow , GINS1 \downarrow , GINS2 \downarrow , HELLS \downarrow , MCM4 \downarrow , MCM8 \downarrow , POLE2 \downarrow , RAD51 \downarrow , TIPIN \downarrow und UNG \downarrow sind bei 16 Stunden also besonders Moleküle der DNA-Replikation und –Reparatur übereinstimmend reprimiert. Darüber hinaus waren die Transkriptionsfaktoren E2F8 \downarrow , TFDP1 \downarrow , der Zellzyklusregulator CCNE2 \downarrow und die Mikrotubuli-assoziierte Serin/Threonin-Kinase MASTL \downarrow reprimiert. Neben den oben genannten Histonen wurde dann auch HIST1H2AG \uparrow induziert. Während bei vier Stunden der Transkriptionsfaktor TSC22D1 \uparrow induziert wurde, war nach 16 Stunden TSC22D3 \uparrow aus der gleichen Protein-Familie hochreguliert. TSC22D3 (GILZ) gilt als negativer Regulator des Ras/Raf-Signalweges ähnlich TSC22D1, aber mit anderem Mechanismus (Nakamura et al., 2012).

Die CFI-3-Behandlungen (sowohl mit 0,5 % als auch mit 10 % FKS) bewirkten nach vier Stunden übereinstimmend mit den FLT3-siRNA-Behandlungen die Induktion von CCNG2 \uparrow , KLHL24 \uparrow , METTL7A \uparrow , TSC22D1 \uparrow , YPEL2 \uparrow und YPEL3 \uparrow bzw. die Repression von ANKKLE2 \downarrow , CCND3 \downarrow , DUSP6 \downarrow , INHBA \downarrow , MYC \downarrow , PLAUR \downarrow , PLD6 \downarrow , SLC7A5 \downarrow und TNF \downarrow^* . (Die meisten dieser Gene stimmten auch im Vergleich von Sorafenib- mit den siRNA-Behandlungen überein.) Von diesen waren CCNG2 \uparrow^* , KLHL24 \uparrow^* , TSC22D1 \uparrow bzw. ANKKLE2 \downarrow , CCND3 \downarrow , DUSP6 \downarrow , INHBA \downarrow , MYC \downarrow , PLAUR \downarrow , PLD6 \downarrow , SLC7A5 \downarrow , TNF \downarrow^* auch noch nach acht Stunden dereguliert. Des Weiteren waren nach acht Stunden AXL \uparrow^* , CREBRF \uparrow^* , SEL1L3 \uparrow^* und ZC3H6 \uparrow^* bzw. DLX1 \downarrow^* , DUSP6 \downarrow^* und PYCRL \downarrow^* durch CFI-3-Behandlung unter beiden Serumkonzentrationen und von allen FLT3-siRNAs in ihrer Expression verändert. Darüber hinaus waren 48 Gene zwar von CFI-3 unter beiden Serumkonzentrationen aber nur durch zwei von drei FLT3-siRNAs beeinflusst. Darunter befinden sich (weitere) Gene für Proteine des Nukleinsäuremetabolismus: CTPS \downarrow , TSEN2 \downarrow , RNASEH1 \downarrow und RRP9 \downarrow , der Transkription: AHCTF1 \downarrow , BCL3 \uparrow , PHB \downarrow , POLR1C \downarrow , POLR3E \downarrow , PUS1 \downarrow und der Translation: PIGW \downarrow , RRS1 \downarrow .

Von den 81 nach acht Stunden deregulierten Genen sind neun ebenfalls nach 16 Stunden beeinflusst: BCL3 \uparrow , HIST1H2AC \uparrow , KLHL24 \uparrow und SEL1L3 (KIAA0746) \uparrow bzw. DLX1 \downarrow , DUSP6 \downarrow , INHBA \downarrow , MCM10 \downarrow und TSR1 \downarrow .

Diejenigen Gene, die in der Zelllinie MV4;11 sowohl bei mindestens zwei FLT3-siRNAs als auch nach Behandlung mit Sorafenib und CFI-3 unter zwei Serumkonzentrationen in ihrer Expression verändert wurden, sind als potentielle FLT3-Inhibitionsmuster anzusehen (vgl. Tabelle 3.1-15).

Tabelle 3.1-15: Zusammenfassung des Expressionsmusters der FLT3-Inhibition durch FLT3-siRNAs und FLT3-spezifische Inhibitoren

Vier Stunden	Acht Stunden	16 Stunden
CCNG2↑	CCNG2↑	DEPDC6↑
KLHL24↑	CREBRF↑	HIST1H2AC↑
METTL7A↑	HIST1H2AC	HIST1H2AG↑
TSC22D1↑	IL10RA↑	HIST1H2BD↑
YPEL2↑	KIAA0746↑	IGF1↑
YPEL3↑	KLHL24↑	KIAA0746↑
TNF↓	NAPSB↑	P2RX1↑
CCND3↓	ANKLE1↓	TSC22D3↑
INHBA↓	C8orf33↓	ATAD2↓
PLD6↓	CCDC86↓	C4orf46↓
SLC7A5↓	DLX1↓	CCNE2↓
	FKBP4↓	CDC45L↓
	INHBA↓	CDC6↓
	MCM10↓	CHAF1A↓
	NDUFAF4	DEPDC1↓
	PUS1↓	DHFR↓
	RNASEH1↓	DNA2↓
	RP1-21O18↓	DSCC1↓
	RRS1↓	DTL↓
	SLC7A5↓	E2F8↓
	SLCO4A1↓	FEN1↓
	TSR1↓	GAL↓
		GINS1↓
		GINS2↓
		HSPH1↓
		IGFBP2↓
		LAPTM4B↓
		MCM10↓
		MCM4↓
		POLE2↓
		RAD51↓
		SPC25↓
		STON1v
		TFDP1↓
		TIPIN↓
		UBE2T↓
		UNG↓
		WDHD1↓

3.1.3.6 Extrapolation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch die Behandlung mit Kinaseinhibitoren

Analog zur Auswertung der siRNA-vermittelten Transkriptionsänderungen wurde auch aus den inhibitorvermittelten Transkriptionsmustern mittels der IPA-Datenbank auf die *upstream* betroffenen Transkriptionsfaktoren rückgeschlossen. Hierbei weisen manche eine statistische Verzerrung auf, d.h. die prozentualen Anteile der hoch-bzw. herunterregulierten Gene im zu analysierenden Datensatz und für den einzelnen Transkriptionsfaktor sind nicht gleich ($|\mu| < 0,25$; WhitePaper IPA Upstream Regulator), dies wurde in den entsprechenden Tabellen mit *(Bias) gekennzeichnet.

Zunächst wurde aus den Transkriptionsprofilen der 24-stündigen Behandlung mit den Inhibitoren auf die beteiligten Transkriptionsfaktoren extrapoliert Tabelle (9.2-7). Anschließend wurde von den Transkriptionsprofilen der 24-stündigen Behandlung mit den Inhibitoren das FLT3-siRNA-Muster subtrahiert, um aus dem verbleibenden Rest auf die beteiligten Transkriptionsfaktoren von potentiell FLT3-unabhängigen, „*off-target*“ Signalwegen rückzuschließen (siehe Tabellen 9.2-8ff). Nach der Subtraktion aller Transkriptionsfaktoren, die auch durch andere Inhibitoren oder die FLT3-siRNAs beeinflusst waren, bleiben für die Behandlung mit Sorafenib IRF4, TFAM, ATF4, MTPN, EGR1, ARNT und NFkB1, mit VX-680 nur CREM, mit CFI-3 NFATC2, SNAI1, GATA1, IRF3, ARNT2, SIM1, STAT5B und TRIM24, mit CFI-2 DACH1, CREB1, HSF2 und NKX2-3, mit CHIR-265 nur CEBPA sowie mit RKI-2 nur PITX. Diese können als FLT3-inhibitionsunabhängige, substanzspezifische Transkriptionsfaktoren bzw. als Marker angesehen werden.

Darüber hinaus wurden für Behandlung von MV4;11-Zellen mit Sorafenib und CFI-3 auch auf die beteiligten Transkriptionsfaktoren nach vier-, acht- und 16-stündiger Behandlung extrapoliert.

Aus dem Transkriptionsprofil der Behandlung mit Sorafenib wurden je nach Serumgehalt des Mediums unterschiedliche Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren ermittelt (siehe Tabelle 9.2-21). So waren bei den frühen Zeitpunkten bei geringem Serumgehalt deutlich mehr Transkriptionsfaktoren involviert als bei dem höheren Serumgehalt. Die beiden Bedingungen stimmten in zwei bzw. drei Transkriptionsfaktoren überein: nach vier Stunden sind jeweils die Transkriptionsfaktoren EGR1 und EZH2 inhibiert; Nach acht Stunden sind MYC und SREBF1 inhibiert und p53 ist aktiviert. Bei 16 Stunden hingegen war die Anzahl in beiden Bedingungen mit 18 bzw. 19 ungefähr gleich, wovon sie in zwölf übereinstimmen: hierbei sind mit CDKN2A, HNF4A, KDM5B, NUPR1, RB1, RBL1, TOB1 und TP53 mehr Transkriptionsfaktoren aktiviert als mit E2F, FOXO1, MYC und TBX2 inhibiert.

Auch die Extrapolation der Transkriptionsänderungen nach Behandlung von MV4;11-Zellen mit CFI-3 zeigte je nach Serumgehalt unterschiedliche Aktivitätsänderungen der Transkriptionsfaktoren (siehe Tabelle 9.2-22). Die Profile der vierstündigen Behandlungen stimmten bei ungefähr gleicher Anzahl von beeinflussten Transkriptionsfaktoren (11 bzw. 10) nur bei vier Transkriptionsfaktoren überein: Sie deuten auf eine Inhibition der EZH2, HOXB4, MYC und SREBF1 hin. Nach acht Stunden waren diese vier Transkriptionsfaktoren immer noch inhibiert. Neu hinzu kam die Inhibition von AR, EF2 und SREBF2 bzw. die Aktivierung von CDKN2A, KDM5B, RB1, TP53 und SMARCB1. Nach 16-stündiger Behandlung sind dann weiterhin CDKN2A, KDM5B, RB1 und TP53 aktiviert bzw. E2F und MYC inhibiert zu sein. Zu diesem Zeitpunkt erstmalig sind dann FOXM1, FOXO1, SP1, TBX2 sowie TFDP1 inhibiert bzw. HNF4A, NUPR1, RBL1, SNAI1 und TOB1 aktiviert.

Diese Muster sollten dann ebenfalls den FLT3-siRNA-Mustern gegenübergestellt werden, um FLT3-Inhibitionsspezifische bzw. –unabhängige Muster zu generieren. Da bei der Extrapolation der Profile für die vier- bzw. achtstündige Behandlung mit den siRNAs jedoch keine signifikanten Aktivitätsänderungen für Transkriptionsfaktoren ermittelt werden konnten, wurde nur mit dem Muster für die 16-stündige Behandlung verglichen (siehe Tabelle 3.1-16).

Tabelle 3.1-16: Vergleich der abgeleiteten Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach 16-stündiger Behandlung

Regulator	FLT3-siRNA10	FLT3-siRNA11	FLT3-siRNA12	Sorafenib	CFI-3
ATF4	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
CDKN2A	Aktiviert	Aktiviert	Aktiviert	Aktiviert	Aktiviert
CTNNB1	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
E2F (als	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
E2F1	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert
E2F2	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
EGR2	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
EP300	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
FOXM1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.		Inhibiert*
FOXO1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert
FOXO3	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.
HDAC	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
HNF4A	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert
JUNB	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.
KDM5B	Aktiviert*	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert
MAX	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
MDM2	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
MYC	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert
MYOD1	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert		
NUPR1	Aktiviert	Aktiviert	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert
RB1	Aktiviert *	Aktiviert	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert
RBL1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert*
SNAI1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
SOX2	Inhibiert	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
SP1	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	Inhibiert
SREBF1	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
SREBF2	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
TBX2	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert
TFDP1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert
TOB1	Aktiviert	Aktiviert	Aktiviert	Aktiviert	Aktiviert
TP53	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert
TP63	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.

n.s.v. = nicht signifikant verändert; (FLT3-siRNA-11 und -12 alle ohne Bias)

Für die entsprechenden z-Scores und p-Werte siehe Tabellen 9.3-16, 9.3-17 und 9.3-18.

Diejenigen Transkriptionsfaktoren, die sowohl von den FLT3-siRNAs als auch den Inhibitoren beeinflusst wurden, sind als spezifische Folgen der 16-stündigen FLT3-Inhibition anzusehen: CDKN2A, E2F, HNF4A, MYC, RB1, TBX2 und TP53.

Transkriptionsfaktoren, die bei beiden Inhibitoren aber nicht bei den siRNAs beeinflusst waren, spiegeln entweder generelle Wechselwirkungen mit niedermolekularen Kinaseinhibitoren oder eine unterschiedliche Kinetik der Hemmung wider: FOXO1, KDM5B, NUPR1, RBL1 und TOB1.

Nur jene Transkriptionsfaktoren, die exklusiv bei einer der Behandlungen mit den zwei Inhibitoren verändert wären, könnten FLT3-inhibitionsunabhängige, substanzspezifische Effekte darstellen. Diese wurden jedoch nicht gefunden, da keiner der Transkriptionsfaktoren eine derartige Exklusivität aufwies.

3.2 Aktivieren Antikörper gegen CD20 die B-Zell-Rezeptor-Kaskade?

3.2.1 Transkriptionsänderungen bei verschiedenen Zelllinien nach Behandlungen mit anti-B-Zell-Rezeptor-Antikörpern

Die Expression von IgM (Immunglobulin M) ist ein typisches Merkmal humaner B-Zellen und die meisten B-Zell-Lymphomzelllinien enthalten IgM als Immunglobulinanteil des B-Zell-Rezeptors (B-cell receptor; BCR) (Saito et al., 2008). Daher ist es allgemein üblich für die *in-vitro*-Aktivierung des BCR Antikörper gegen IgM zu verwenden (Battle et al., 2009; Glynn et al., 2000; Shaffer et al., 2001). Einige Zelllinien wie SU-DHL-4 (Walshe et al., 2008) und DOHH (Chaouchi et al., 1995) exprimieren aber IgG statt IgM. Daher wurden alle in dieser Studie verwendeten Zelllinien (Z-138, OCI-LY18, REC-1 und SU-DHL-4) sowohl mit Antikörpern gegen IgG als auch mit Antikörpern gegen IgM behandelt, um beide Möglichkeiten der BCR-Stimulation abzudecken. Als Auslöser des CD20-abhängigen Signalweges wurden die anti-CD20-Antikörper Rituximab und LT20 appliziert.

Um zu kontrollieren, ob von Fc γ -Rezeptoren ausgehende Signale mit der BCR-Signalkaskade interferieren (Kurosaki, 2002), wurden neben vollständigen Antikörpern auch F(ab')₂-Fragmente der anti-IgM-Antikörper verwendet. Darüber hinaus stellt der Antikörper LT20 für diesen Zweck eine interne Kontrolle dar, da er über einen murinen Fc-Teil verfügt.

Von allen vier getesteten Zelllinien reagierte REC-1 am stärksten auf die Behandlung mit anti-IgG bzw. anti-IgM-Antikörpern hinsichtlich der Anzahl deregulierter Gene, während OCI-LY18 und Z-138 weniger Expressionsänderungen aufwiesen. Die Zelllinie SU-DHL-4 zeigte eine starke Antwort auf die Behandlung mit Antikörpern gegen IgG. Infolge der Behandlung mit Antikörpern gegen IgM waren hier jedoch fast keine signifikanten Änderungen zu beobachten (siehe Tabelle 3.2-1). FACS-Analysen ergaben, dass diese Zellen größtenteils IgG und kaum IgM auf der Zelloberfläche exprimieren. Dies stimmt mit Literaturbeschreibungen überein (Walshe et al., 2008).

Diese Experimente zeigen, dass sowohl Antikörper gegen IgG als auch solche gegen IgM in der Lage sind in den verwendeten Zelllinien spezifische Transkriptionsänderungen hervorzurufen.

Tabelle 3.2-1: Anzahl an deregulierten Genen nach Behandlung mit Antikörpern gegen CD20 und Antikörpern gegen den B-Zell-Rezeptor

Behandlung / Zelllinie	Rituximab	LT20	Anti-IgM-F(ab') ₂	Anti-IgM	Anti-IgG	IgG-Kontr.
OCI-LY18	1	6	434	383	141	0
Z-138	10	15	437	283	506	1
REC-1	108 245 (F(ab') ₂)	445	1412	1190	1028	70
SU-DHL-4	509	637	40	4	680	0

Standardfilterkriterien siehe 2.10.1

Wie erwartet überschneiden sich bei der Zelllinie OCI-LY18 die Transkriptionsänderungen nach Behandlung mit Antikörpern gegen IgM mit den Änderungen nach Behandlung mit dem zugehörigen F(ab')₂-Fragment und nach anti-IgG-Behandlung (Tabelle 3.2-2). Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Zelllinie Z-138 erzielt. Während aber die Zelllinie Z-138 auf die Behandlungen mit anti-IgM- bzw. anti-IgG-Antikörpern hinsichtlich der Anzahl deregulierter Gene in vergleichbarem Ausmaß ansprach (0,9 bzw. 0,6 zu 1), reagierte die Zelllinie OCI-LY18 deutlich stärker auf die Antikörper gegen IgM als auf die gegen IgG (3,1 bzw. 2,7 zu 1). Vermutlich ist dadurch auch die Schnittmenge zwischen beiden Behandlungen bei Z-138 deutlich größer. Bei der Zelllinie REC-1 ist die Schnittmenge beider Behandlungen aufgrund der an sich schon ausgeprägteren und anzahlmäßig ungefähr gleich starken Transkriptionsantwort wesentlich größer als in den beiden vorgenannten Zelllinien.

Die für diese drei Zelllinien beobachtete starke Intersektion der Genexpressionsänderungen zwischen anti-IgM und dem dazugehörigen F(ab')₂-Fragment verdeutlicht die hohe technische und biologische Reproduzierbarkeit der „anti-IgM-Antwort“. Ein Grund dafür, dass bei diesen drei Zelllinien die Antwort auf die Behandlung mit dem vollständigen Antikörper schwächer war als mit dem F(ab')₂-Fragment, könnte die Bindung des Fc-Teils an den inhibitorischen Fc γ -Rezeptor Zwei (FCGR2) sein.

Die Zelllinie SU-DHL-4, die vermutlich dem Stadium einer Gedächtniszelle entspricht, reagierte ausschließlich auf die Behandlung mit Antikörpern gegen IgG.

Tabelle 3.2-2 Schnittmengen deregulierter Gene nach verschiedenen Behandlungen mit Antikörpern

Antikörperbehandlung / Zelllinie	Rituximab \cap LT20	Anti-IgM \cap Anti-IgM- F(ab') ₂	Anti-IgM/ F(ab') ₂ \cap anti-IgG	Anti-BCR \cap anti-CD20
OCI-LY18	n.v.	312	102	n.v.
Z-138	n.v.	246	181	n.v.
REC-1	98*	977	768	89
SU-DHL-4	436	n.v.	n.v.	342**

n.v. = nicht verfügbar

* Überschneidung der durch Rituximab, Rituximab-F(ab')₂ und LT20 deregulierten Gene

** Nur anti-IgG-Antikörper als anti-BCR-Behandlung

Das hier beobachtete, jeweilige Ausmaß der anti-IgG-Antwort korrelierte in den drei Zelllinien mit der unterschiedlichen Anzahl von IgG-Molekülen auf deren Zelloberflächen. Des Weiteren wurde hier beobachtet, dass bei denjenigen Zelllinien, die einem unreifen B-Zell-Stadium entsprechen und dementsprechend neben IgG auch IgM im BCR enthalten, sich die Transkriptionsmuster der zwei Behandlungen nur teilweise überschneiden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass zwar unabhängig vom Isotyp alle antigenbindenden, membranständigen Immunglobuline mit den Korezeptoren CD79 α/β assoziieren aber IgM-haltige BCR (im Gegensatz zu IgG-haltigen) vom Korezeptor zusätzlich von CD22 moduliert werden (Horikawa et al., 2007; Wakabayashi et al., 2002). Die Expression von CD22 und anderen potentiellen Korezeptoren wurde bei den verwendeten Zelllinien per Durchflusszytometrie bestimmt und mittels mRNA-Expressionsanalyse bestätigt um sie

den B-Zellentwicklungsstadien zuordnen zu können (siehe Tabellen 3.2-3 und 3.2-4). Der für den BCR des IgM-Typs potentielle Korezeptor CD22 wird von drei dieser vier Zelllinien exprimiert, aber nicht von Z-138. Der Marker CD27 kennzeichnet einen fortgeschrittenen Differenzierungsstatus und fehlt ebenfalls bei Z-138. Bei SU-DHL-4 hingegen ist CD27 vergleichsweise stark ausgeprägt, was den angenommenen Status einer Gedächtniszelle unterstreicht. Für Z-138 deutet das Expressionsmuster von CD10, CD27 und CD138 auf einen plasmoplastoiden Phänotyp hin.

Tabelle 3.2-3: Oberflächenexpression einiger B-Zell-Antigene laut Durchflusszytometrie

Antigen	OCI-LY18	Z-138	REC1	SU-DHL-4
CD19	++++	+	+++	+++++
CD20	+	++	+++	++++
CD21	+	+	++	+
CD22	+	-	+	+
CD27	++	+	+	+++++
CD34	+	+	+++	++
CD38	+++	++++	++	+++++
CD138	++	++++	+	+
IgD	-	+	++	-
IgM	++	++	+++	-
CD79A	+	++	++	+
CD79B	+	+	+	+

Tabelle 3.2-4: mRNA-Expression einiger B-Zell-Antigene laut Affymetrix-Expressionsanalyse

Genname	OCI-LY18	Z-138	REC-1	SU-DHL-4
CD10	268	*	79	973
CD19	752	273	972	333
CD20	3472	3458	3988	4324
CD21	*	*	814	*
CD22	758	*	311	1200
CD24	1709	559	2007	123
CD27	559	*	*	1603
CD34	*	*	*	*
CD38	164	521	156	397
CD138	*	119	*	*
IgD	188	286	*	*
IgM	6825	5685	3652	*
CD79A	1046	745	2653	1114
CD79B	2322	425	1289	653

Angegeben ist jeweils der normierte Signalmittelwert. * unter Nachweisgrenze / Hintergrund

Die Behandlung dieser Zelllinien mit Antikörpern gegen IgM führte demnach zu einem BCR-Signal, das charakteristische Transkriptionsantworten hervorruft. Ähnliche Transkriptionssignaturen wurden von Antikörpern gegen IgG ausgelöst.

Daher kann angenommen werden, dass anti-IgG-Antikörper als alternativer Auslöser der BCR-Signalkaskade verwendet werden können, wenn Zellen kein IgM exprimieren, wie dies bei SU-DHL-4 der Fall ist.

3.2.2 Transkriptionsänderungen nach Behandlung mit Antikörpern gegen CD20

Bei den Zelllinien Z-138 und OCI-LY18 wurden auf Transkriptionsebene keine oder nur sehr wenige Änderungen festgestellt, obwohl sie das Antigen CD20 auf der Zelloberfläche exprimieren (Tabellen 3.2-1 und 3.2-3). Dies deutet darauf hin, dass eine CD20-Oberflächenexpression allein nicht ausreicht, auf eine Behandlung mit Antikörpern mit Transkriptionsänderungen zu reagieren.

Bei SU-DHL-4 und REC-1 hingegen löste eine anti-CD20-Behandlung umfangreiche Änderungen auf Transkriptionsebene aus. Bei REC-1 wurden weniger Änderungen nach Behandlung mit Rituximab oder dem Rituximab-F(ab')₂-Fragment als nach Behandlung mit LT20 detektiert. Rituximab und das dazugehörige F(ab')₂-Fragment überschneiden sich jedoch weitgehend und stellten eine sehr große Teilmenge der LT20-Änderungen. Darüber hinaus stimmten bei SU-DHL-4 die Transkriptionsänderungen nach Behandlung mit Rituximab und LT20 zum allergrößten Teil überein, sodass nur wenige, für die jeweilige Behandlung charakteristisch deregulierte Gene verblieben (siehe Tabelle 3.2-2). Diese Übereinstimmung beider Typ I anti-CD20-Antikörper deutete stark darauf hin, dass die beobachteten Effekte spezifisch waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auf Transkriptionsebene in den zwei responsiven der vier getesteten Zelllinien spezifische Änderungen durch anti-CD20-Behandlung induziert wurden. Die Muster waren zudem vom Isotyp des Antikörpers unabhängig.

3.2.3 Vergleich der Expressionsänderungen nach anti-CD20-Behandlung und nach anti-BCR-Behandlung

Wie oben gezeigt waren die verschiedenen Behandlungen pro Antigen in sich konsistent, daher konnten sie benutzt werden, um die Behandlungen miteinander zu vergleichen.

Bei der Zelllinie SU-DHL-4 überschneidet sich das Transkriptionsmuster der anti-CD20- mit der anti-BCR-Behandlung in 342 Genen. Das bedeutet, dass 48 % der anti-CD20-Antwort mit der anti-BCR-Antwort übereinstimmen (siehe Abbildung 3.2-1 A und B). Der entsprechende Vergleich für REC-1 ergab eine Abdeckung von 415 aus 452 deregulierten Genen bzw. 92 % des anti-CD20-Musters durch das anti-BCR-Transkriptionsmuster (siehe Abbildung 3.2-1 C und D).

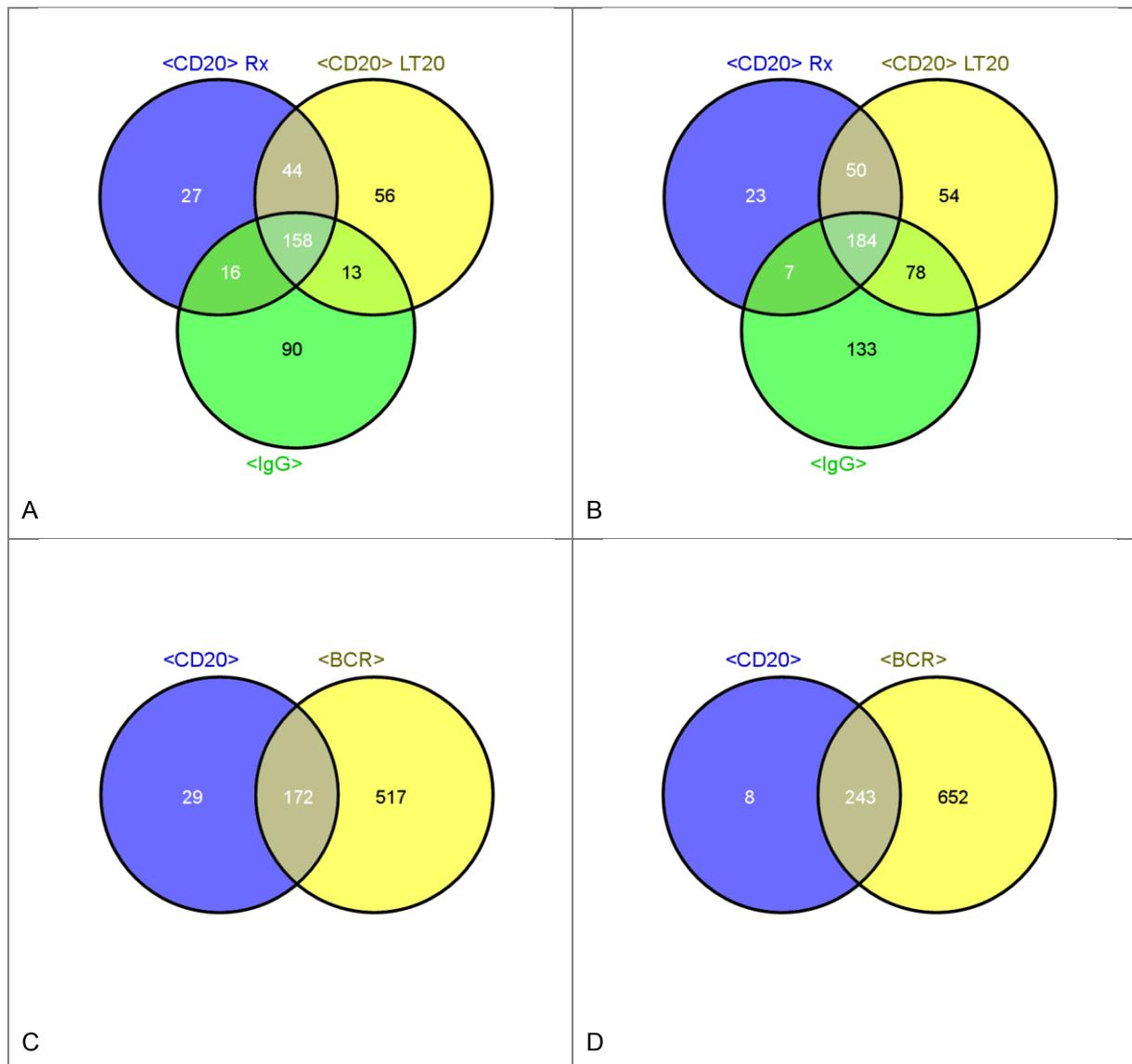


Abbildung 3.2-1: Vergleich der deregulierten Gene nach Behandlung mit verschiedenen Antikörper-

Venn-Diagramme für die bei SU-DHL-4 hoch- (A) bzw. herunterregulierten Gene (B) 4h nach der Behandlung mit Antikörpern gegen CD20 (Rituximab, LT20) bzw. IgG. Venn-Diagramme für die bei REC-1 hoch- (C) bzw. herunterregulierten Gene (D) 4h nach der Behandlung mit Antikörpern gegen CD20 (Rituximab, Rituximab-F(ab')₂ LT20) bzw. gegen BCR (IgG bzw. IgM)

Neben dieser Betrachtung der Übereinstimmungen je Zelllinie, wurden auch die Änderungen zwischen den Zelllinien verglichen: die Überschneidungen der Änderungen sind verhältnismäßig gering. Nur 65 (22↑ / 43↓) in beiden Zelllinien deregulierte Gene stehen 306 (127↑/179↓) bzw. 310 (136↑/174↓) zelllinien-spezifisch deregulierten Genen gegenüber (Abbildung 3.2-2). Dies deutet darauf hin, dass die durch die anti-CD20- bzw. anti-BCR-Antikörper induzierten Änderungen auf Transkriptionsebene teilweise überlappen und dass das jeweilige Transkriptionsmuster sehr zelllinien-abhängig ist.

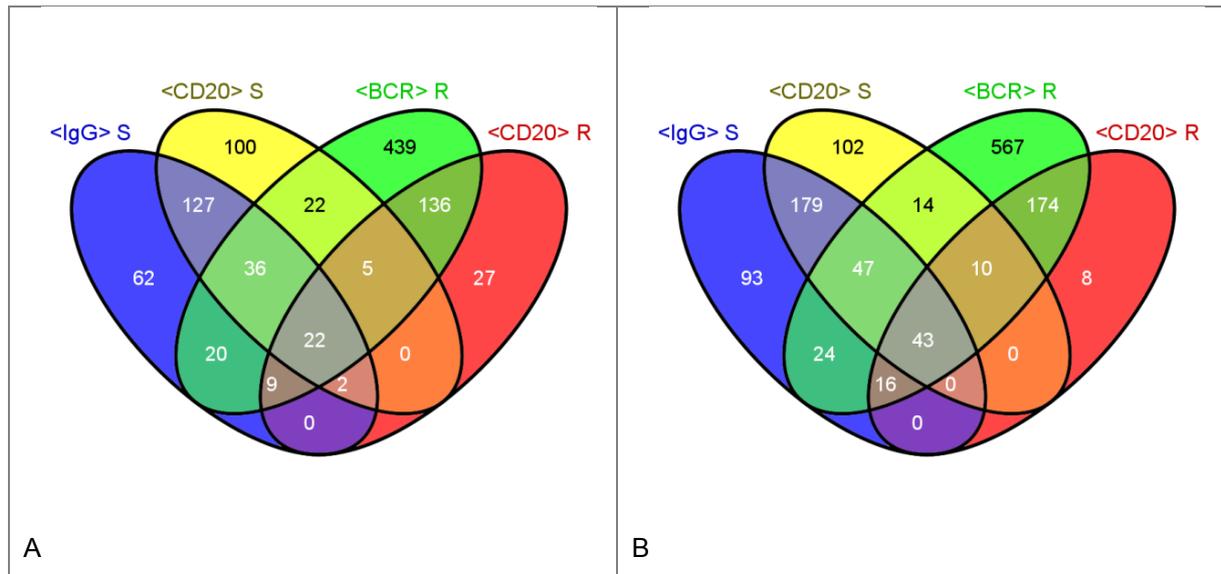


Abbildung 3.2-2: Vergleich der deregulierten Gene nach Behandlung mit verschiedenen Antikörpern bei zwei anti-CD20 responsiven Zelllinien

Venn-Diagramme für die bei SU-DHL-4 und REC-1 induzierten (A) bzw. reprimierten Gene (B) nach vierstündiger Behandlung mit Antikörpern gegen CD20 bzw. gegen den BCR. Behandlungen gegen die gleiche Struktur wurden in einer Liste (<CD20> bzw. <BCR>) zusammengefasst. R=REC-1, S=SU-DHL-4

3.2.4 Vergleich der Aktivierungsmuster in verschiedenen Zelllinien

Angesichts der weitreichenden Übereinstimmungen von BCR und CD20-Mustern pro Zelllinie und der überraschend geringen Ähnlichkeiten zwischen den Zelllinien wurden die BCR-Aktivierungsmuster der einzelnen Zelllinien genauer miteinander verglichen: Hier zeigte sich, dass die zelllinien-spezifischen Änderungen deutlich größer waren als die Gemeinsamkeiten. In den getesteten vier Zelllinien waren nur 42 Gene (25↑/17↓) gleichartig beeinflusst (siehe Abbildung 3.2-3).

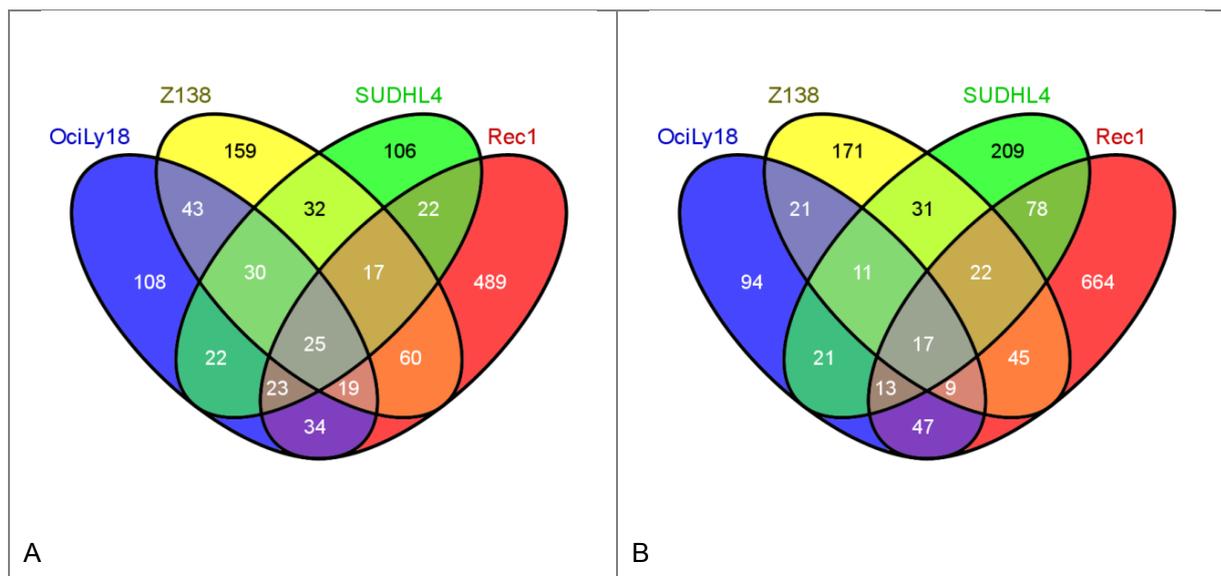


Abbildung 3.2-3: Vergleich der BCR-Aktivierung in den vier getesteten Zelllinien

Venn-Diagramme der induzierten (A) und reprimierten (B) regulierten Gene. Verglichen wurden Listen, in denen Behandlungen gegen IgM und gegen IgG- zusammengefasst wurden.

Die Gene dieser Schnittmenge wurden auf ihren funktionellen Kontext hin analysiert. Dazu wurden *Gene Ontology*-Annotationen, Panther, Biocarta und KEGG-Signalweg-Übersichten ausgewertet (Tabelle 3.2-5). Die analoge Analyse für die Überschneidung zwischen REC-1 und SU-DHL-4 hinsichtlich der anti-CD20-Antwort ergab, dass die deregulierten Gene bei Zelltod, Zellstress, dem BCR-Signalweg, der Immunantwort und der Entwicklung hämatopoetischer Zellen eine Rolle spielen (siehe Tabelle 3.2-6).

Tabelle 3.2-5: Funktionelle Zusammenfassung der bei REC-1, SU-DHL-4, OCI-LY18 und Z-138 durch BCR-Aktivierung deregulierten Gene

Gene	Signalweg, Funktionelles Cluster
DAPP1, ETS1, GEM, KLF6, PIK3R3, RFXAP, VPREB3,	BCR Signalkaskade /B-Zell-Aktivierung, Immunantwort
ETS1, IER2, MAFF, SSBP3, ZFP36L, ZFP362	Transkription
RNF144B, SGK1, SQSTM1, SRGN, PPP1R15A	Apoptose, zelluläre Stressantwort, zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine
DDIT3, MAPK3, SGK1, TESK1	MAPK Signalweg/ p38 Kinase Signalweg
MGAT4B, NEU1 (=Sialidase1)	N-Glycan-Biosynthese, Glycanabbau / Spingolipidmetabolismus/Lysosom
SAC3DC1, OIP5, PIM1	Zellzyklus, JAK/STAT Signalweg / Akute myeloische Leukämie
APBB1IP, MICAL1	Zytoskelett
VASP	Fc gamma Rezeptor vermittelte Phagozytose
NFKBID	NFkB Signalweg
RFXAP	Antigen Prozessierung und Präsentation
GLRX	Zelluläre Homöostase
RGS1	GPCR Signalweg
SLC2A3	Glucoseaufnahme
NEIL3	Base excision repair
EIF2C2	mRNA-Prozessierung, Dicer Signalweg,

Tabelle 3.2-6: Funktionelle Zusammenfassung der bei REC-1 und SU-DHL-4 durch Behandlung mit anti-CD20-Antikörpern deregulierten Gene

Gene	Signalweg, Funktionelles Cluster
ADRB2, BCL2L11, BCL2A1, CDKN2C, ETS1, RNF144B, SRGN, TXNIP, TNFAIP3	Apoptose, Zelltod
CD79B, ETS1, FCGR2B, DAPP1, BLK, VPREB3	BCR/ Immunantwort
DUSP5, RPS6KA5, PTPN18, TRIB1, TXNIP	MAPK Signalweg, p38 Signalweg
ETS1, IRF2BP2, SSBP3, (TRIM22), ZFP36L1	Transkriptionsregulation, Regulation der RNA-Stabilität
ATP2A3, KCNM4	Calcium-Signalweg
FCGR2B, NCF1, VASP	Fc-gamma Rezeptor vermittelte Phagozytose
CDKN2C, TXNIP	Zellzyklus, Zellteilung
HMMR, ITGB7	ECM Rezeptor Interaktion, Zelladhäsion
RAB11FIP4	Endozytose
INSIG1, TXNIP, TRIB1	Zelluläre Stressantwort
NLRC3, NDFIP2, TNFAIP3	NFκB-Signalweg
ALOX5, PTGER4	Arachidonsäuremetabolismus
RABGAP1L	GPCR-Signalweg
DDB2, CDKN2C	P53-Signalweg
NAPSB, SERPINA9	Proteolyse
APBB1IP, SNX8, DAAM1	Zytoskelett
EXOSC4	RNA-Degradation
UPP1	Pyrimidinmetabolismus
TNFAIP3	Signalweg NOD-ähnlicher Rezeptoren
TRVD2, TRA	T-Zellaktivierung

Trotz aller Unterschiede in den analysierten Transkriptionsmustern nach anti-CD20- bzw. anti-BCR-Behandlung waren fünf Gene konsistent induziert und sieben Gene (sowie der Offene Leserahmen C5orf13) reprimiert (siehe Tabelle 3.2-7). Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, Adaptorproteine für Signalkaskaden, eine Ubiquitinligase und eine Stresskinase. Diese Proteine sind u. a. in den NFκB (Nuclear factor kappa B)-Signalweg, in die zelluläre Stressantwort und in die Apoptose involviert. Bemerkenswert ist die Repression von DAPP1, ETS1 und VPREB3 sowie die Induktion von VASP, SGK1 und BIC, weil jene Gene direkt mit dem BCR-Signalweg assoziiert sind (siehe Tabelle 3.2-7 und Abbildung 3.2-4).

Tabelle 3.2-7: Gene, die bei allen vier getesteten Zelllinien nach BCR-Aktivierung und bei SU-DHL-4 und REC-1 durch die Behandlung mit Antikörpern gegen CD20 dereguliert wurden

Gensymbol	Funktion / Beschreibung
BIC↑	- kodiert für miRNA-155 - wird nach BCR-Aktivierung von PKC und NFκB reguliert (Kluiver et al., 2005)
SGK1↑	- Serin/Threoninkinase, die für die zelluläre Stressantwort wichtig ist - reguliert von GSK3 und bindet IKK (NFκB-Weg)
SRGN↑	- ist assoziiert mit dem Granzym/Perforinkomplex, vermutlich an der Apoptose beteiligt - reguliert die Sekretion von TNFα
VASP↑	- ein Adaptorprotein, das an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt ist und die Interaktion von Integrinen und der ECM beeinflusst - wird von PKA und PKG reguliert
ZFP36L1↑	- ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der durch zellulären Stress aktiviert wird - ein „early response“ Gene
APBB1IP↓	- spielt eine Rolle in der Ras-Signalkaskade beim Umbau des Aktinzytoskeletts - interagiert mit VASP - auch bei der Aktivierung des TCR beteiligt
DAPP1↓	- ein Adaptorprotein, das JNK-, RAC1- und MAPK-Signalkaskaden reguliert
ETS1↓	- ein Transkriptionsfaktor, der bei der Entwicklung von Stammzellen, der zellulären Seneszenz und dem Zelltod eine Rolle spielt - mit BCR-Stimulation assoziiert (Su et al., 1997) - reguliert CDKN1A (p21), MDM2 (p53-Antagonist) und MMPs
GLRX↓	- eine Thioltransferase, wichtig im NFκB-Signalweg
RNF144B↓	- ein Ringfingerprotein/ E3 Ubiquitinligase - wird reguliert von p53 und verhindert spontane Apoptose (Benard et al., 2010) (BRDC2= RNF144B) - ubiquitiniert CDKN1A
SSBP3↓	- ein Einzelstrangbindeprotein, - Transkriptionsregulator
VPREB3↓	- ist assoziiert mit der Synthese der μ-Kette des prä-B-Zell-Rezeptors, vermutlich an deren Transport beteiligt

Diese Resultate deuten stark darauf hin, dass die von den Antikörpern gegen CD20 bzw. den BCR angestoßenen Signalkaskaden ähnliche Gruppen von Transkriptionsfaktoren aktivieren und *upstream* davon auch ein paar Komponenten gemeinsam nutzen.

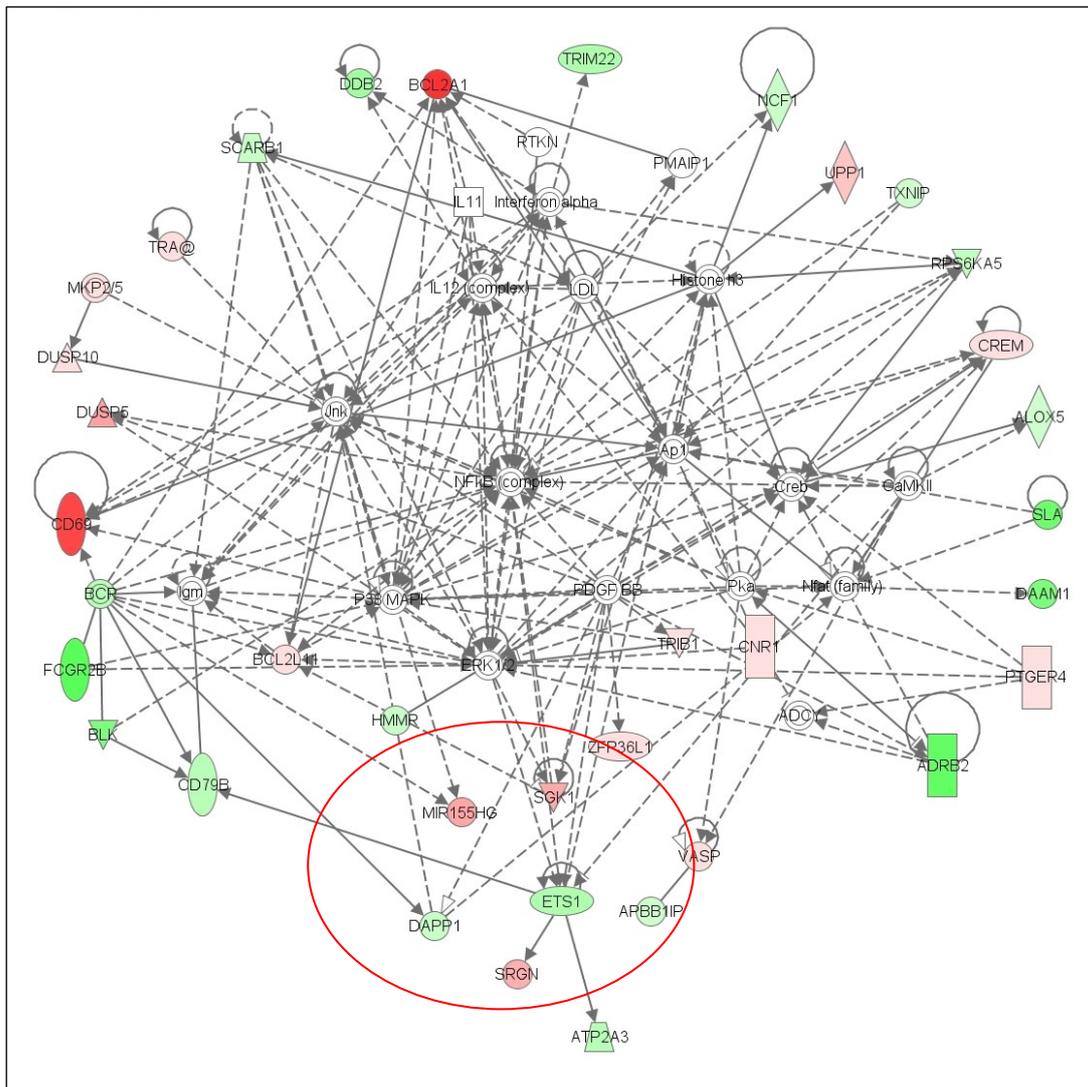


Abbildung 3.2-4: Interaktionen der durch anti-CD20-Antikörper deregulierten Gene bei den Zelllinien SU-DHL-4 und REC-1

Diese mittels der Software „Ingenuity Pathway Analysis“ generierte Interaktionsübersicht zeigt, dass auch Komponenten des BCR und des nachgeschalteten Signalwegs dereguliert sind. Der rote Kreis markiert Gene, die bei allen vier getesteten Zelllinien auch durch Antikörper gegen den BCR dereguliert wurden.

3.2.5 Einfluss der SYK-Inhibition und der siRNA-vermittelten SYK-Repression auf die Behandlung mit Antikörpern gegen CD20 bzw. den BCR

In der BCR-Signalkaskade spielt die Kinase SYK eine zentrale Rolle, da sie den Korezeptoren CD79 α/β nachgeschaltet ist, aber noch vor den weiterführenden Kaskaden wie NF κ B aktiviert wird. Transkription und Sekretion der Zytokine CCL3 und CCL4 werden durch BCR-Aktivierung und bei der Antwort auf Rituximab (Cittera et al., 2007) induziert und lassen sich leicht nachweisen. Die Aktivität von SYK wurde in dieser Arbeit auf zwei Arten gehemmt: Inhibition der Kinase durch niedermolekulare Substanzen und RNA-Interferenz.

Nach Vorinkubation von SU-DHL-4 mit bekannten SYK-Inhibitoren (Baudot, 2009) wurden die Antikörper gegen CD20 bzw. IgG appliziert und anschließend die CCL3-Konzentration des Zellüberstands bestimmt. In beiden Fällen war eine deutliche Reduktion zu beobachten (siehe Abbildung 3.2-5).

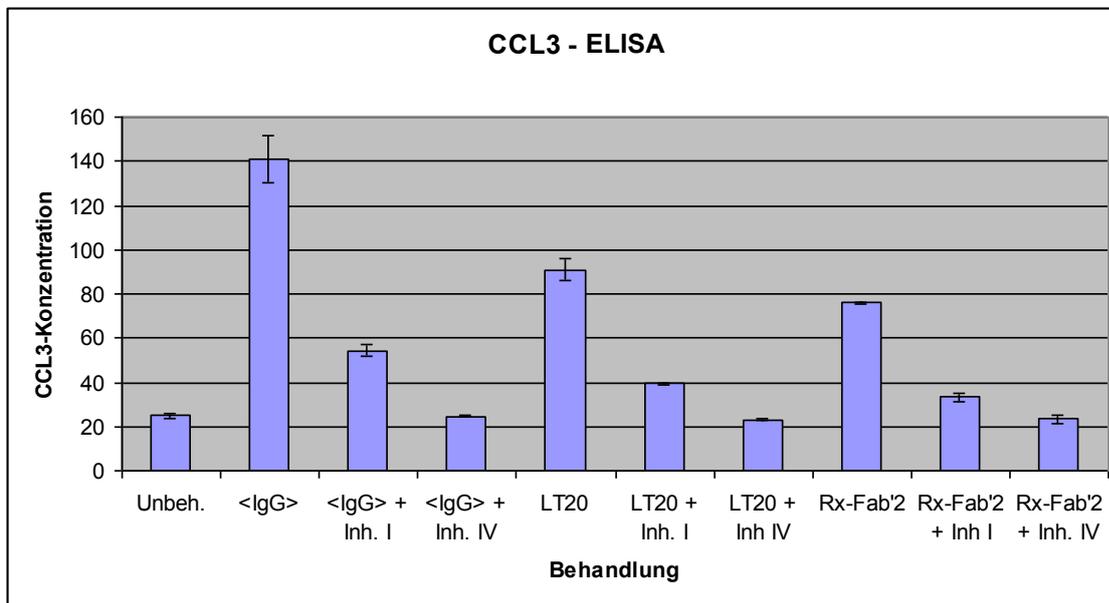


Abbildung 3.2-5: Inhibition der CCL3-Induktion durch SYK-Inhibitoren bei SU-DHL-4

CCL3-Induktion durch Behandlung mit Antikörpern gegen IgG (<IgG>) bzw. CD20 (<LT20>, Rx-F(ab')2) und Hemmung dieser Induktion durch die SYK-Inhibitoren I und IV (Calbiochem) bei 1 µM bzw. 0,32 µM.

Durch Transfektion von SYK-siRNAs wurde eine 60 %-ige Verringerung des SYK-Proteins erreicht, die mittels durchflusszytometrischer Messung bestätigt wurde. Dies führte zu einer Reduktion der CCL3- bzw. CCL4-Induktion von 37 % bzw. 38 % für die Behandlung mit anti-IgG-Antikörpern und 25 % bzw. 28 % für Rituximab (Abbildung 3.2-6 A bzw. B).

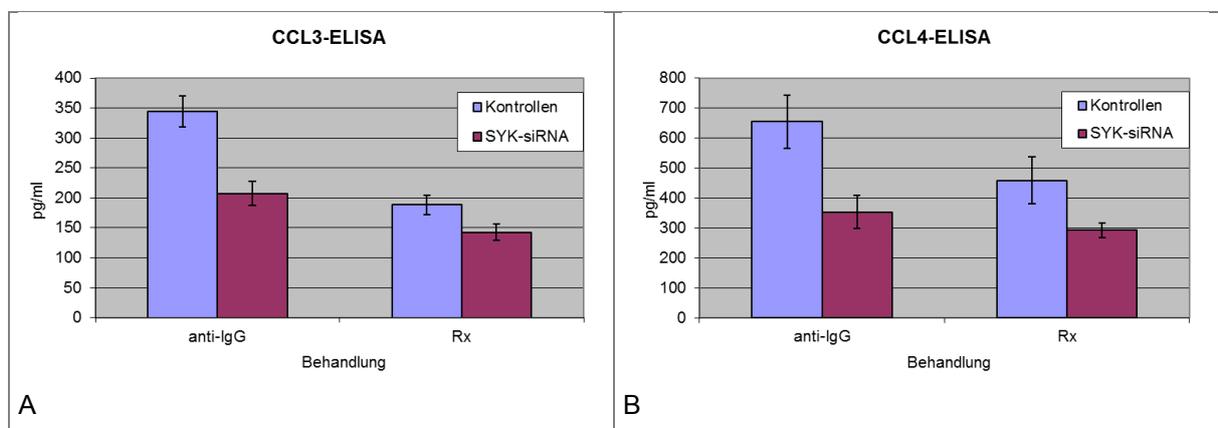


Abbildung 3.2-6: Inhibition der antikörperinduzierten CCL3/CCL4-Sekretion durch SYK-siRNAs

ELISAs zur Messung der Sekretion der Cytokine CCL3 und CCL4 bei SU-DHL-4 und SYK-siRNA transfizierten SU-DHL-4 nach Behandlung mit Antikörpern gegen IgG (BCR) bzw. gegen CD20 (Rituximab;Rx) jeweils 10µ/ml A) CCL3 B) CCL4

Da sowohl die Inhibition der Kinaseaktivität mit zwei verschiedenen Inhibitoren als auch die Verringerung der Menge an SYK-Protein durch siRNAs zu einer verminderten Induktion der CCL3-Sekretion führten, ist es sehr wahrscheinlich, dass die in der BCR-Signaltransduktionskaskade zentrale Kinase SYK auch in der durch anti-CD20-Antikörper vermittelten Signaltransduktion eine wesentliche Rolle spielt.

4 Diskussion

Die Entwicklung neuer Medikamente ist heutzutage vorwiegend hypothesenbasiert, d. h. die Substanzen sollen auf eine ganz bestimmte erwartete Art und Weise wirken. Dennoch entfalten sie neben dieser angestrebten Wirkung häufig unerwartete „Nebenwirkungen“. Teilweise sind natürlich auch die molekularen Zusammenhänge der Wirkung noch nicht völlig verstanden. Es war das Ziel dieser Arbeit, zu analysieren inwieweit Therapeutika mittels Expressionsprofilierung dahingehend charakterisiert werden können und wie der Vergleich von Expressionsprofilen dazu beitragen kann, molekulare Wirkungsweisen aufzuklären. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt:

Im inhibitorischen Ansatz wurden für verschiedene **niedermolekulare Kinaseinhibitoren**, die selektiv FLT3 hemmen bzw. explizit nicht hemmen sollten, Expressionsprofile erstellt. Diese Profile wurden auf ihre Übereinstimmung mit der Literatur zur FLT3-Hemmung und soweit verfügbar zu substanzspezifischen Wirkungen überprüft. Des Weiteren wurden sie untereinander und schließlich mit Expressionsprofilen nach Behandlung mit **siRNAs gegen FLT3** als - theoretisch - spezifischsten Modulatoren verglichen.

Im aktivierenden Ansatz wurden Expressionsprofile verschiedener **anti-CD20-Antikörper** mit denen von anti-BCR-Antikörpern verglichen. Aus den umfassenden Übereinstimmungen konnte ein gemeinsamer Signalweg *downstream* der membranständigen Proteine abgeleitet werden. Mittels siRNA- und Inhibitor-vermittelter Hemmung der Kinase SYK konnte gezeigt werden, dass diese Kinase neben der bekannten Rolle im BCR-Signalweg (Kurosaki, 2002) auch für den (antikörperinduzierten) CD20-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt (Franke et al., 2011).

4.1 FLT3-Inhibition

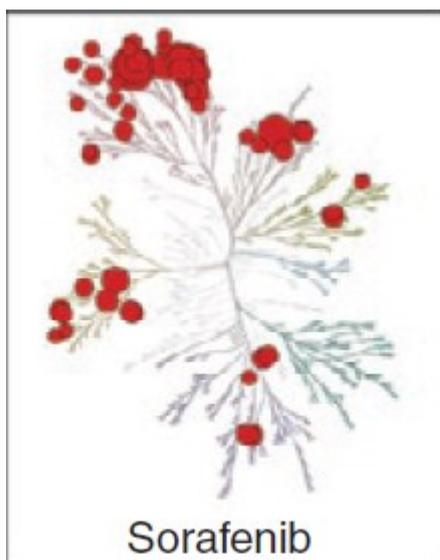


Abbildung 4.1-1: Symbolisierte Inhibitionen durch Sorafenib über einem Dendrogramm der humanen Kinasen (Karaman et al., 2008)

Da alle humanen Kinasen aufgrund der evolutionären Verwandtschaft eine ähnliche Struktur ihrer aktiven Zentren aufweisen, sind Kinaseinhibitoren meist unselektiv und inhibieren mehrere Kinasen, jedoch mit teilweise recht unterschiedlichen Affinitäten (Karaman et al., 2008) (vgl. Abb. 4.1-1,). Die entscheidende Frage hinsichtlich Wirksamkeit, Resistenzen und systemischen Nebenwirkungen ist letztendlich, welche Kinasen in einer Zelle effektiv gehemmt werden. Hierfür ist primär entscheidend, welche Kinasen in der jeweiligen Zelle exprimiert werden und ob bzw. wann sie aktiv sind. Zum anderen hängt es von der Affinität des Inhibitors für jede einzelne dieser Kinasen ab, da hieraus die Spezifität für die Kinase mit der höchsten Affinität resultiert. Um ein robustes Testsystem zu finden, wurden verschiedene Zelllinien hinsichtlich der Expression onkogener Kinasen untersucht. Die hier getesteten Tumor-

und Leukämiezelllinien exprimierten die Kinase FLT3 in unterschiedlichem Ausmaß (vgl. Tab. 3.1-1) und mit unterschiedlicher Aktivierung. MV4;11 wurde aufgrund der konstitutiven FLT3-ITD-Aktivierung ausgewählt, RS4;11 aufgrund des nicht konstitutiv aktiven, aber aktivierbaren FLT3-Wildtyp-Status.

Die niedermolekularen Inhibitoren wurden aufgrund ihrer beschriebenen (oder aufgrund von Display-Technologien „vermuteten“) Hemmung von FLT3 ausgewählt und in verschiedenen Testsystemen hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht. Hierbei wurde dem potentiellen FLT3-Inhibitor Sorafenib (Auclair et al., 2007) der RAF-Kinaseinhibitor CHIR-265 gegenübergestellt, der laut Literatur bzw. AMBIT-Messungen zwar ein ähnliches Kinaseinhibitionsprofil aufweist – aber FLT3 nicht hemmen sollte. Da CHIR-265 jedoch Kinasen des FLT3-ITD-Signalweges hemmen könnte, wurde der Aurorakinase-Inhibitor VX-680 als weitere Negativkontrolle aufgenommen. Dieser Rahmen diene als Referenz für die Bewertung der kommerziell erhältlichen Inhibitoren CFI-2 und CFI-3 sowie der drei Roche-Kinase-Inhibitoren RKI-1, RKI-2 und RKI-3.

4.1.1 Charakterisierung der verwendeten Inhibitoren

Für **Sorafenib** bestätigen die Ergebnisse der Charakterisierung mit den niedrigen K_d- und IC₅₀-Werte sowie dem mehr als 2600-fache Unterschied der IC₅₀-Werte für die Behandlung von MV4;11 und RS4;11 (siehe Tabelle 4.1-1), dass der Wirkmechanismus in MV4;11 sehr wahrscheinlich auf der Hemmung von FLT3-ITD beruht.

Der Vergleich der Expressionsprofile nach vier-, acht- und 16-stündiger Behandlungsdauer mit Sorafenib gegen die FLT3-siRNAs zeigte, dass typische FLT3-Response-Gene wie TSC22D1 und DUSP6 konsistent reprimiert waren. Darüber hinaus zeichnete sich bereits nach 4-stündiger Behandlung ein Zellzyklusarrest ab, da die für den Zellzyklus wichtigen Cycline CCND3, CCNE1, CCNE1 und CCNG2 dereguliert waren. Dies setzte sich fort in der Repression von Genen für diverse Enzyme für die Biosynthese von Nukleotiden und Aminosäuren.

Die eingeleitete Apoptose zeigte sich u.a. an der konsistenten Induktion des pro-apoptotisch wirkenden BNIP3L (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein3-like). Die Expressionsprofilierung zeigte bereits nach 4-stündiger Behandlung mit Sorafenib (siehe Kapitel 3.1.3.5 und Tabelle 3.1-13), dass überwiegend zellzyklus- und zelltod-assoziierte Gene beeinflusst waren. Dementsprechend zeigte auch die Extrapolation auf *upstream* agierende Regulatoren zunächst eine Inhibition von MYC und EGR1, und für acht- und 16-stündige Behandlung zusätzlich die Aktivierung von p53, RB und CDKN2A und die Inhibition der Transkriptionsfaktoren der E2F-Gruppe. Dies erscheint plausibel, da sämtliche externe Proliferationsstimuli auf RB kanalisiert werden und RB als Regulator des Zellzyklus effektiv die Proliferation blockieren kann, indem es an die E2Fs bindet, und somit deren transkriptionsaktivierende Wirkung blockiert (Dick & Rubin, 2013). Da dies bei den Behandlungen mit den FLT3-siRNAs (und den anderen Inhibitoren) ebenfalls der Fall war, konnten keine substanzspezifischen Wirkungen abgeleitet werden. Jedoch weist zumindest das Expressionsprofil der 24-stündigen Behandlung mit Sorafenib relativ zu den anderen Inhibitoren die größte Übereinstimmung mit dem Profil der FLT3-siRNA-Behandlung auf (Tabelle 3.1-11).

Somit bleibt die Frage offen, welcher Teil des Expressionsprofils als direkte Wirkung der Hemmung von FLT3 durch Sorafenib zu betrachten ist bzw. ob sich Transkriptionsänderungen angesichts der massiven Zelltodinduktion in FLT3-inhibitions-spezifische und –unspezifische unterteilen ließen.

Sorafenib wurde ursprünglich für die BRAF-Inhibition entwickelt (Lowinger et al., 2002). Zwar zeigen Zhang und Kollegen, dass Sorafenib die Phosphorylierung der RAF-Substrate MEK1/2 und ERK inhibiert, wodurch proapoptotische Faktoren wie BIM (als Haupteffektor), BAD, BAX und BAK induziert werden und die antiapoptotischen Faktoren MCL1 und XIAP reprimiert werden, allerdings bewirkte Sorafenib in der intendierten Indikation Melanom keine Verbesserung (Zhang et al., 2008a).

Mittlerweile wurde Sorafenib für die Behandlung von Nieren- und Leberkrebs zugelassen, wobei die Wirksamkeit aber anscheinend mehr auf einer anti-angiogenen Wirkung (vermittelt durch die Hemmung von KDR und FLT4) als einer RAF-Inhibition beruht.

Daneben erwies sich Sorafenib in der Therapie von AML mit FLT3-Beteiligung als vielversprechend: So bewirkte eine Sorafenib-Therapie nach einer Stammzelltransplantation eine deutliche Reduktion der peripheren Blasten bei 80% der Patienten und führte bei fast 20% der Fälle zu einer Teilremission, konnte aber weder als Monotherapie noch in Kombination mit Chemotherapie eine komplette Remission erreichen (Sharma et al., 2011). Jedoch bewirkte (nach Versagen einer ersten Chemotherapie) eine Monotherapie mit Sorafenib vor einer Stammzelltransplantation in 38% der Fälle eine Remission und verlängerte signifikant die Zeit bis zum Therapieversagen um fast 50%. Auch hier traten sekundäre Resistenzen auf - in dieser Studie ca. 43% der Fälle (Metzelder et al., 2012).

Da unter Sorafenib-Monotherapie in Zellen mit FLT3-ITD zusätzliche Mutationen, wie FLT3-D835Y und die Aktivierung von *Escape*-Signalwegen nachgewiesen (Man et al., 2012) wurden, ist zu vermuten, dass auch diese Therapie aufgrund einer Selektion auf aggressivere Klone versagt. Anscheinend ist FLT3-ITD doch keine auslösende Mutation (*driving/founding lesion*), sodass deren alleinige, spezifische Hemmung keinen dauerhaften Heilungserfolg bei der Mehrzahl der Patienten erwarten lässt (Pratz & Luger, 2014).

Eine Möglichkeit diese Art von Resistenzen zu verhindern, könnte, wie in der Einleitung erwähnt, die Kombination mit anderen Therapeutika sein. Für Sorafenib scheinen Synergien mit dem HDM2-Inhibitor Nutlin-3, welcher zur Aktivierung von p53 und damit zur Apoptose führt, zu existieren (Zauli et al., 2012). Allerdings wurden in dieser Studie sehr hohe Dosen Sorafenib verwendet (1, 3 und 10 μ M), sodass als Wirkmechanismus eine alternative bzw. multiple Inhibition von RAF1 oder anderen Kinasen nicht ausgeschlossen werden kann. Um die Wirksamkeit dauerhaft zu verbessern, schlagen Moore und Kollegen eine duale Inhibition von FLT3 und den Aurora-Kinasen vor, um Resistenzen zu umgehen (Moore et al., 2012).

CHIR-265 wurde ebenfalls als BRAF-Inhibitor entwickelt, zeigt jedoch im Gegensatz zu Sorafenib Wirksamkeit bei Melanomen (Su et al., 2012). Für CHIR-265 zeigen die hier erhobenen Daten in den biochemischen Tests übereinstimmend, dass FLT3 nicht gehemmt wird und somit die anti-proliferative Wirkung in MV4;11 sehr wahrscheinlich nicht auf einer Hemmung der Kinase FLT3-ITD beruhen sollte. Unerwarteterweise wies das Expressionsprofil nach 24-stündiger Behandlung mit CHIR-265 in den beeinflussten Funktionen große Übereinstimmungen mit den Profilen der anderen Kinaseinhibitoren auf (siehe Tabelle 3.1.-13). Andererseits war die prozentuale Übereinstimmung mit dem Profil der FLT3-siRNAs am geringsten (Tabelle 3.1-11). Dies zeigt, dass von den getesteten Inhibitoren, CHIR-265 am wenigsten wahrscheinlich durch eine FLT3-Hemmung wirkt.

Offen bleibt, ob die funktionellen Übereinstimmungen auf eine fortgeschrittene Apoptoseinduktion hindeuten oder darauf dass CHIR-265 in MV4;11 die RAF/ERK-Signalkaskade hemmt. Schließlich wurde CHIR-265 als selektiver BRAF-Inhibitor beschrieben (Garcia-Echeverria, 2009; Karaman et al., 2008) und könnte somit das Signaling *downstream* von FLT3-ITD hemmen. Unter diesen Voraussetzungen wären jedenfalls ähnliche Transkriptionsmuster infolge einer FLT3-ITD-Hemmung (z. B. durch Sorafenib oder durch FLT3-siRNAs) und einer RAF-Hemmung (durch CHIR-265) denkbar. Jedoch sind die Signalwege ausgehend von FLT3-ITD, wie in der Einleitung beschrieben, noch unvollständig verstanden.

Von der Substanz **VX-680 (auch MK-0457)** ist bekannt, dass sie als Inhibitor der Aurora-Kinasen (besonders AURKA) direkt in die Zellteilung eingreift: In verschiedenen Krebszellarten verhindert sie u. a. die Phosphorylierung des Serin 10 im Histon H3, zerstört den mitotischen Spindelapparat, induziert somit Polyploidie und letztendlich Apoptose (Pan et al, 2008; Xu et al, 2011). Allerdings scheint VX-680 nicht Aurora-selektiv zu sein (Tyler et al, 2007). So wird derzeit diskutiert, ob die gute Wirksamkeit gegen Darmkrebs oder Philadelphia-Chromosom-positive ALL primär auf der Hemmung einer der Aurora-Kinasen oder der Kinase BCR-ABL beruht (Fei et al., 2010; Kitzen et al., 2010). Darüber hinaus gibt es einzelne Beobachtungen, dass VX-680 FLT3 bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen hemmen kann (Cheetham et al., 2007).

Die Display-Charakterisierung (AMBIT) deutete darauf hin, dass VX-680 ähnlich wie für AURKA und PLK4 auch für FLT3 einen sehr niedrigen Pseudo-Kd-Wert um 1 nM aufweist. Darüber hinaus zeigten die Versuche für VX-680 eine *geringe Selektivität*: VX-680 bindet mit 34 Kinasen vergleichsweise viele Kinasen mit einem Pseudo-Kd-Wert unter 1 µM. In den biochemischen Tests der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine *hohe Affinität* für FLT3 bestätigt werden. Jedoch legen das Verhältnis der Proliferations-IC50-Werte (RS4;11 zu MV4;11) unter eins und die ungehemmte FLT3-ITD-Phosphorylierung nahe, dass die Wirkung in MV4;11 wahrscheinlich nicht auf einer FLT3-ITD-Hemmung basiert. Ob die Wirkung letztendlich auf einer Hemmung der Aurora-Kinasen oder anderer Kinasen beruht, wurde nicht untersucht, da dies nicht Gegenstand der Fragestellung war.

Das Expressionsprofil nach 24-stündiger Behandlung unterschied sich von den Profilen der anderen Inhibitoren nur insofern, als dass vor Subtraktion des FLT3-siRNA-Musters neben einigen Genen für ubiquitäre Enzyme besonders solche für Enzyme für die Synthese von Aminosäuren und die Aufnahme von Glucose inhibiert wurden (Funktion „Biochemie niedermolekularer Substanzen“). Allerdings war diese Funktion nach der Subtraktion des FLT3-siRNA-Musters auch bei den anderen Inhibitoren dereguliert und wurde daher nicht weiter verfolgt.

Die verfügbaren Daten für die Kinaseinhibitoren **CFI-2** (Mahboobi et al., 2006) und **CFI-3** (Furet et al., 2006) zeigten eine starke bzw. sehr starke Spezifität dieser Substanzen für die Hemmung von Wildtyp-FLT3. Dies konnte weitgehend bestätigt werden. Zwar liegt der in der Originalpublikation von Mahboobi und Kollegen angegebene IC50-Wert von 40 nM für die zelluläre Hemmung von FLT3 deutlich unter dem hier gemessenen von 230 nM, aber dies könnte an den unterschiedlichen Zellsystemen (32D-Zellen dort, RS4;11-Zellen hier) und dadurch bedingt, an verschiedenen FLT3-Spiegeln liegen.

Im *in-vitro*-Phosphorylierungstest weisen sie im Vergleich zu den anderen getesteten Inhibitoren die niedrigsten IC50-Werte und somit die höchste Affinität auf (siehe Tabelle 4.1.-1). Die IC50-Werte für die zelluläre FLT3-Phosphorylierung liegen nur um das Zwei- bis Achtfache über den erstgenannten, und zeigen somit dass die Inhibitoren gut die Zellmembran passieren können. Die Quotienten der IC50-Werte für die Hemmung der Proliferation von RS4;11 bzw. MV4;11 betragen bei CFI-2 ca. 6 aber bei CFI-3 ca. 100. Dies deutet bei CFI-2 auf eine geringe Beteiligung bzw. bei CFI-3 auf eine starke Beteiligung der FLT3-ITD-Hemmung hin. Unterstützt wird dies durch das Ausmaß der Hemmung der FLT-ITD-Phosphorylierung bei Behandlung mit der jeweiligen IC50-Konzentration, welche bei CFI-2 deutlich schwächer ist als bei CFI-3. Somit gibt es auf biochemischer und zellulärer Ebene für CFI-3 viele Hinweise, dass er in MV4;11 über die Hemmung von FLT3-ITD wirkt. Für CFI-2 ist das weniger wahrscheinlich.

Auf funktioneller Ebene waren die Expressionsprofile einer 24-stündigen Behandlung mit CFI-2 bzw. CFI-3 den Profilen der anderen Substanzen und der FLT3-siRNAs sehr ähnlich, unterschieden sich jedoch für CFI-2 durch die Repression von Genen für die posttranskriptionelle Modifikation von RNA bzw. für CFI-3 durch die Repression von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen. Im Umfeld von Cytotoxizität und Apoptose-Induktion erscheint dies zwar durchaus plausibel aber nicht als Marker geeignet. Da für CFI-3 die FLT3-Hemmung als Wirkmechanismus angenommen wurde, aber nach 24-stündiger Behandlung keine substanzspezifischen Markergene oder Signalwege identifiziert werden konnten, wurden für diese Substanz auch kürzere Behandlungszeiten untersucht.

Vergleichbar den frühen Transkriptionsänderungen bei den Behandlungen mit den FLT3-siRNAs oder Sorafenib dominierte auch hier die Inhibition des Zellzyklus bereits nach vier- und achtstündiger Behandlung das Profil. Der Vergleich mit den Profilen der entsprechenden FLT3-siRNAs zeigte zusätzlich, dass nicht nur die Anzahl sondern auch der Prozentsatz an Übereinstimmungen mit der Zeit zunehmen (siehe 3.1-17). Dies verdeutlicht, dass eventuell noch kürzere Behandlungszeiten nötig wären, um Unterschiede herauszuarbeiten.

Für die Analyse der *upstream* Regulatoren wurde auch hier nur mit der Schnittmenge der Profile aus beiden Serumkonzentrationen weitergearbeitet, da deren Einfluss unter funktionellen Aspekten zwar gering war, sich jedoch auf die Menge der beeinflussten Gene auswirkte (Tabelle 3.1-16). Wenig überraschend ist auch hier bereits nach 4-stündiger Behandlung der Transkriptionsfaktor MYC reprimiert und inhibiert, außerdem sind SREBF1 und EZH2 inhibiert. Ab einer 8-stündigen Behandlungsdauer sind zusätzlich (wieder) p53, RB und CDKN2A aktiviert.

Im Gegensatz zu den oben genannten Substanzen, existieren für die Substanzen **RKI-1**, **RKI-2** und **RKI-3** keine veröffentlichten Daten, da es sich bei ihnen um Roche-eigene Inhibitoren handelt.

Die AMBIT-Messungen legten für RKI-1 eine hohe Selektivität für 14 Kinasen mit einer Affinität unter 1 µM nahe (u.a. für AURKA und PLK4, jedoch nicht für FLT3). Aufgrund dieses Displaytests und der hier vorgenommenen biochemischen und zellulären Tests erscheint eine FLT3-Hemmung als Wirkprinzip in MV4;11 unwahrscheinlich.

Der Inhibitor RKI-3 hemmt die zelluläre und die *in-vitro*-Phosphorylierung von Wildtyp-FLT3 im mikromolaren Bereich. Dies deutet auf eine geringere Affinität als bei den anderen Inhibitoren hin. Jedoch scheint die Spezifität für FLT3 höher zu sein als für andere Kinasen. Zusammen mit dem

sechsfach höheren Proliferations-IC50-Wert von RS4;11 gegenüber MV4;11 und Hemmung der FLT3-ITD-Phosphorylierung spricht einiges für eine Beteiligung der FLT3-ITD-Hemmung an der antiproliferativen Wirkung. Wie groß dieser Anteil ist, bleibt allerdings unklar. Beide Substanzen wurden aufgrund der hohen IC50-Werte nicht weiter untersucht.

Die Affinitätsbestimmung mittels Phagen-Display-Technologie ergab für die Substanz **RKI-2** eine hohe Selektivität, da insgesamt nur sieben Kinasen mit einer Affinität unter 1 µM gebunden wurden (FLT3, FLT4, FRK, KDR, KIT, LYN und PDGFRB). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da RKI-2 die FLT3-Phosphorylierung im Vergleich zu den anderen Inhibitoren *in vitro* bis 10 µM fast gar nicht und auch zellulär erst im mikromolaren Bereich hemmte. Der Quotient der Proliferations-IC50-Werte von fast zehn deutet zwar auf eine FLT3-Inhibition hin, jedoch hemmte RKI-2 die FLT3-ITD-Phosphorylierung nur schwach (siehe Tabelle 4.1-1). Somit ist es auch für RKI-2 unwahrscheinlich, dass in MV4;11 die FLT3-ITD-Hemmung den zellulären Wirkmechanismus darstellt. Trotzdem beeinflusste RKI-2 nach 24-stündiger Behandlung bis auf die Funktion „posttranskriptionelle Modifikation“ die gleichen Funktionen wie die anderen Inhibitoren und die FLT3-siRNAs.

Tabelle 4.1-1: Zusammenfassung der Inhibitorencharakterisierung

Name	Gehemmte Kinasen	FLT3-Spezifität ^o	AMBIT-Kd** für FLT3 (in nM)	Biochem. IC50 für pFLT3 (in nM)	Zellulärer IC50 für pFLT3 (in nM)	Quotient der IC50 für RS4;11 / MV4;11	Phospho-FLT3-ITD Inhibition
Sorafenib	BRAF, FLT3*	o	13/79***	390	32	2666	+
CHIR-265	BRAF*	n.v.	1400	>10000	> 10000	0,4	-
VX-680	AURKA/B/C, FLT3*	o	6,5/45***	150	697	0,3	-
RKI-1	AURKA/B/C*	n.v.	n.v.	>10000	> 10000	2,3	n.v.
RKI-2	FLT3, FLT4, FRK, KDR, KIT, LYN, PDGFRB	o	250	>10000	2400	9,5	n.v.
RKI-3	AURKA, FLT3, KDR, KIT, PDGFRB	+	39	1100	848	6,3	+
CFI-2	FLT3, KIT*	+	n.v.	29	232	5,6	+
CFI-3	FLT3, KIT*	++	n.v.	68	160	105	++

Angegeben sind die in der Literatur verfügbaren (Spalten 2 und 3) und aus AMBIT-Messungen errechneten pseudo-Kd-Werte (Spalte 4) sowie die im Ergebnis teil beschriebenen Werte (Spalten 5-8).

* und viele andere.

**Publikation der Firma AMBIT (Karaman et al., 2008) Supplement table 2 und Messungen für Roche,

*** Kd für Wildtyp-FLT3 bzw. FLT3-ITD;

n.v. = nicht verfügbar

^o Kd- bzw. IC50-Werte für andere Kinasen / Kd- bzw. IC50-Wert für FLT3 < 3 (o), >= 3 und < 5(+) oder >= 5 (++)

Zusammengefasst wurde hier deutlich, dass in den Expressionsprofilen für Sorafenib und CFI-3 bereits nach vierstündiger Behandlung die Änderungen aus dem Umfeld der Zellzykluskontrolle und der Apoptose dominieren, sodass keine Aussage über eventuelle Inhibitionen andere Kinasen als möglich ist. Alle Profile der 24-stündigen Behandlungsdauer wiesen große Übereinstimmungen hinsichtlich der hauptsächlich beeinflussten Funktionen auf. Daher sind sie anscheinend zur Aufklärung der jeweiligen, spezifischen Wirkungsmechanismen ungeeignet. Immerhin stehen die prozentualen Übereinstimmungen der Expressionsprofile der Behandlungen mit den Inhibitoren und mit den FLT3-siRNAs tendenziell im Einklang mit den Ergebnissen der biochemischen und zellulären Tests.

Obgleich also die Inhibitoren nicht allein mittels Expressionsprofilierung hinsichtlich einer FLT3-Inhibition charakterisiert werden konnten, so war es doch möglich, sie aufgrund der biochemischen Tests in Kombination mit der Expressionsprofilierung und im Vergleich zu einer FLT3-siRNA bedingten Modulation relativ zueinander zu charakterisieren.

4.1.2 RNAi als spezifische Modulation

Als großer Vorteil der RNA-Interferenz mittels siRNAs gilt deren zielgerichtete Hemmung einer bestimmten mRNA, wenn beide vollständig sequenzkomplementär sind. Unter bestimmten Umständen kann es jedoch vorkommen, dass durch partielle Übereinstimmungen mit der Sequenz (des Anti-Sinn-Strangs oder des Sinnstrangs) auch andere mRNAs oder miRNAs beeinträchtigt werden (*off-target*-Effekte) (Scacheri et al., 2004).

Um die Aussagekraft der Versuche zu gewährleisten, wurde daher zunächst die Spezifität der hier verwendeten FLT3-siRNAs überprüft (s.u.). Außerdem wurden jeweils drei unterschiedliche Sequenzen einzeln appliziert und für die alle Auswertungen die Schnittmengen von mindestens zwei unterschiedlichen FLT3-siRNAs verwendet. Dies beruht auf der Tatsache, dass mögliche *off-target*-Effekte auf die Nukleotide zwei bis sieben der einzelnen siRNA zurückzuführen sind und bei unterschiedlichen Sequenzen an dieser Stelle verschieden sind (Anderson et al., 2008). Des Weiteren sollten durch den Transfektionsprozess keine unspezifischen Effekte auftreten, d.h. die Transfektionsmethode muss einerseits effizient sein, andererseits darf sie weder zytotoxisch sein noch eine Abwehrreaktion (s. u.) auslösen. Dies wurde mittels diverser Kontrollen (Vehikel-Kontrollen, Luciferase-siRNA und RISC-free) überprüft und ausgeschlossen.

Als erstes wurde an der Zelllinie RS4;11 gezeigt, dass die Expression der Rezeptortyrosinkinase FLT3 mittels siRNAs ganz spezifisch inhibiert werden kann (siehe Kapitel 3.1.2.1) und dass die verwendeten FLT3-siRNAs im Rahmen der hier angelegten Standardfilterkriterien keine *off-target*-Effekte erzeugen: In RS4;11-Zellen, die nicht konstitutiv aktives Wildtyp-FLT3 exprimieren, sind nach der Transfektion der einzelnen FLT3-siRNAs außer dem FLT3-*knock down* kaum Veränderungen des Transkriptoms zu detektieren (siehe Abbildung 4.1-2).

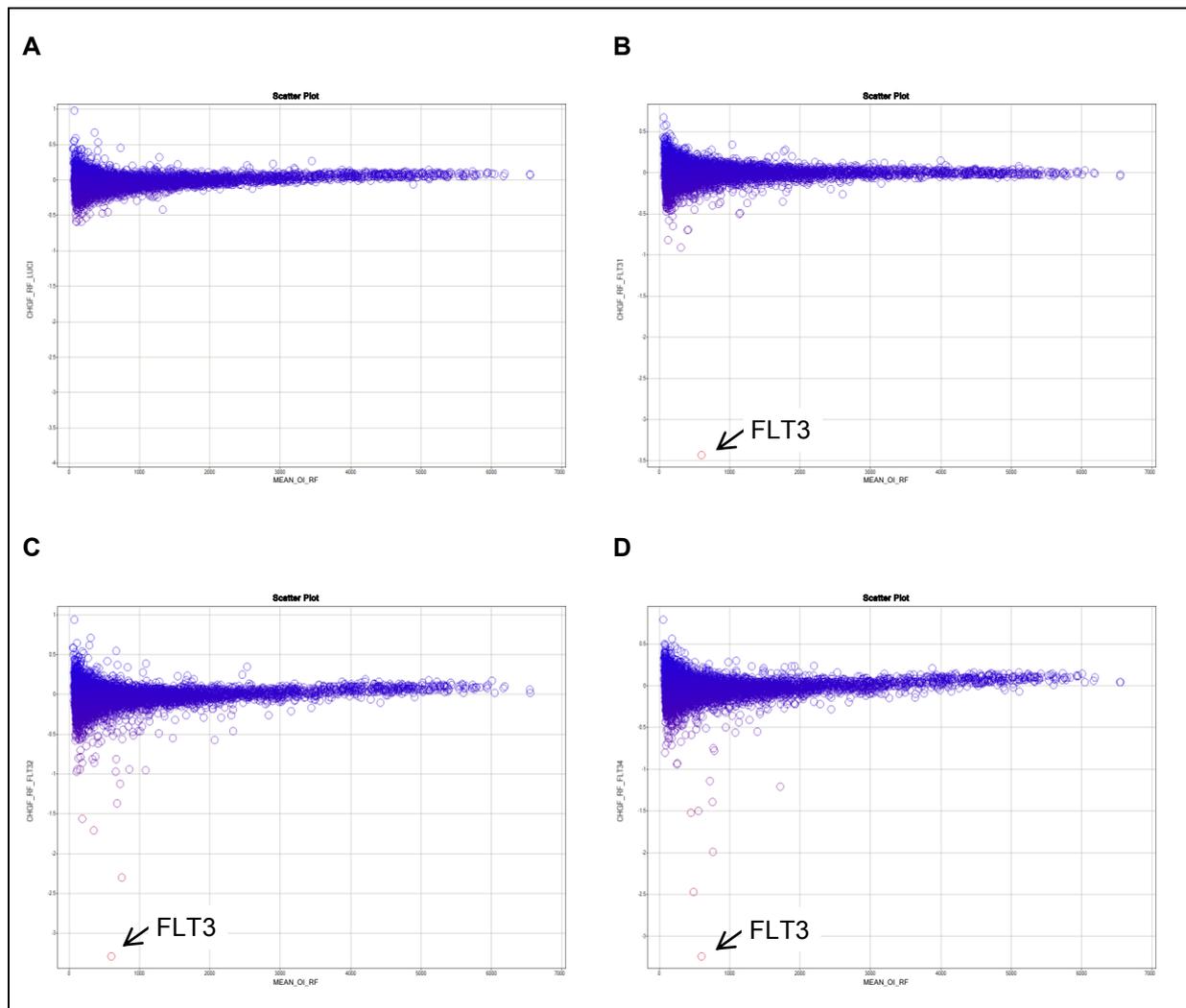


Abbildung 4.1-2: Veränderung der Expression (Change factor) bei RS4;11 durch Behandlung mit FLT3-siRNAs

Aufgetragen ist der Signalmittelwert für die Behandlung mit der siRNA „RISC free“ (Referenz) gegen den Veränderung für die Behandlungen mit: Luciferase-siRNA(A), FLT3-siRNA 1 (B), FLT3-siRNA 2 (C) und FLT3-siRNA 4 (D). Eingeschlossen wurden alle Affymetrix-IDs, die in dieser Studie mindestens ein Mal ein Signal > 100 aufwiesen.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass im Vergleich zu RS4;11 in MV4;11 andere Gene exprimiert werden, welche *off-targets* darstellen und für das Transkriptom relevant sind, wurden modifizierter siRNAs verwendet. Deren 2'-O-methyl-Modifikationen sollen sicherstellen, dass keine anderen als die gewünschten mRNAs beeinträchtigt werden, indem nur der Anti-Sinn-Strang in den RISC integriert und somit ausschließlich die auf der gesamten Länge komplementäre mRNA degradiert/geschnitten wird (Jackson et al., 2006). Die in dieser Arbeit verwendeten modifizierten siRNAs (*on target plus*®) unterscheiden sich in ihren Eigenschaften jedoch anscheinend nicht wesentlich von den unmodifizierten. So sind bei MV4;11 die Transkriptionsänderungen infolge der Transfektion der beiden siRNA-Arten in Umfang (siehe Tabelle 3.1-3) und Inhalt (vgl. Tabelle 9.2-3) sehr ähnlich. Da aufgrund der Versuche in RS4;11 anzunehmen ist, dass bereits die unmodifizierten FLT3-siRNAs keine *off-target*-Effekte erzeugen (siehe Tab. 9.2-1), sollte dies für die modifizierten erst recht zutreffen.

In der Zelllinie MV4;11, die konstitutiv aktives FLT3-ITD exprimiert, bewirkten die FLT3-siRNAs nach vier-, acht-, 16- und 24-stündiger Behandlung jeweils zunehmende Genexpressionsänderungen (vgl. Tabelle 3.1-4 und 3.1-3). Diese weisen u.a. auf die Beeinträchtigung der Replikation und proapoptische Aktivitäten hin und stehen in Einklang mit Veränderungen in der Zellzyklusverteilung der Population (siehe Abbildung 3.1-5) und der Zellviabilität (siehe Abbildung 3.1-4).

Bei den Behandlungen mit den FLT3-siRNAs fiel die Induktion von DDX17 auf, da dieses prinzipiell durch ss- und dsRNA aktiviert werden kann. Allerdings war DDX17 nur nach vier Stunden durch die FLT3-siRNAs, jedoch nicht in den Kontrollen signifikant erhöht. Somit ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine FLT3-inhibitionsabhängige Induktion handelt. Andererseits verdeutlicht dies eine weitere Art der möglichen *off-target*-Effekte: die sogenannte Interferonantwort. Sie bezeichnet die Induktion von Interferon-induzierten bzw. -stimulierbaren Genen (ISGs).

Zu Beginn der Verwendung von RNAi für Forschungszwecke war man davon ausgegangen, dass shRNAs und synthetische siRNAs zu kurz sind, um eine Interferonantwort zu generieren, wie dies von längeren dsRNAs bekannt war (Sledz & Williams, 2004). Allerdings wurde recht schnell von shRNAs gezeigt, dass auch sie eine Interferonantwort hervorrufen und ISGs wie OAS1 50-fach induzieren (Bridge et al., 2003). Auch synthetische siRNAs können diese Antwort stimulieren, und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Judge et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher 23 ISGs (CCL2, FGF2, FGF13, GBP1, IFI35, IFI44, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT5, IFITM1, IFR6, IFR7, IFR9, ISG15, ISG20, OAS1, OAS2, OAS3, PMP22, SP110 und STAT1) auf ihre Expression überprüft, von denen nur acht mit einem Signal über dem Hintergrund detektiert wurden (siehe Tabelle 9.2-23). Diese wiederum wurden im Vergleich zum oben genannten Faktor 50 jedoch nur schwach durch die FLT3-siRNAs beeinflusst: Bei der Expression der Gene IFI35, STAT1, ISG15 und IFITM1 gab es überhaupt keine signifikante Veränderung. Bei IFI6, IRF7 und IRF9 waren die Induktionen nie stärker als dreifach. Bei PMP22 gab es Herabregulationen, diese waren nie stärker als vierfach.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Expressionsprofile der Behandlungen mit den FLT3-siRNAs keine ausgeprägte Interferonantwort enthalten.

4.1.3 Hierarchische Clusterbildung zur Ermittlung der relativen Ähnlichkeit

Mittels einer Clusteranalyse aller deregulierten *Probe sets* (4011) wurde ermittelt, wie ähnlich die Transkriptomprofile bzw. Transkriptionsänderungen der 24-Stunden-Studie relativ zu einander sind. Sowohl auf Basis der eigentlichen Expressionssignale (siehe Abbildung 4.1-3) als auch auf Basis des *Change factor* (siehe Abbildung 4.1-4) zeigen die *Cluster*, dass die Profile einer jeweiligen Behandlungsart untereinander ähnlicher sind als zwischen beiden Behandlungsarten. Demzufolge hat die Art der Behandlung stärkere Effekte auf die Transkriptionsmuster als der Wirkmechanismus (FLT3-Modulation vs. AURKA-Hemmung). Dies liegt jedoch nicht an der Behandlungsmethode der Transfektion an sich, da die Referenzansätze zusammen mit den Kontrollansätzen clustern und sie gemeinsam mit dem ACD-siRNA-Ansatz von den Inhibitoren und FLT3-siRNAs separiert werden können. Eine Erklärung dafür könnten verschiedene Arten der Apoptoseinduktion sein, d.h. dass die Inhibitoren und FLT3-siRNAs einen G1-Arrest hervorrufen, die ACD-siRNA jedoch einen G2-Arrest bewirkt. Von Aurora-Kinase-Inhibitoren ist bekannt, dass Zellen aufgrund von Endoreduplikationen in einem Pseudo-G1-Status arretiert werden (Keen & Taylor, 2004).

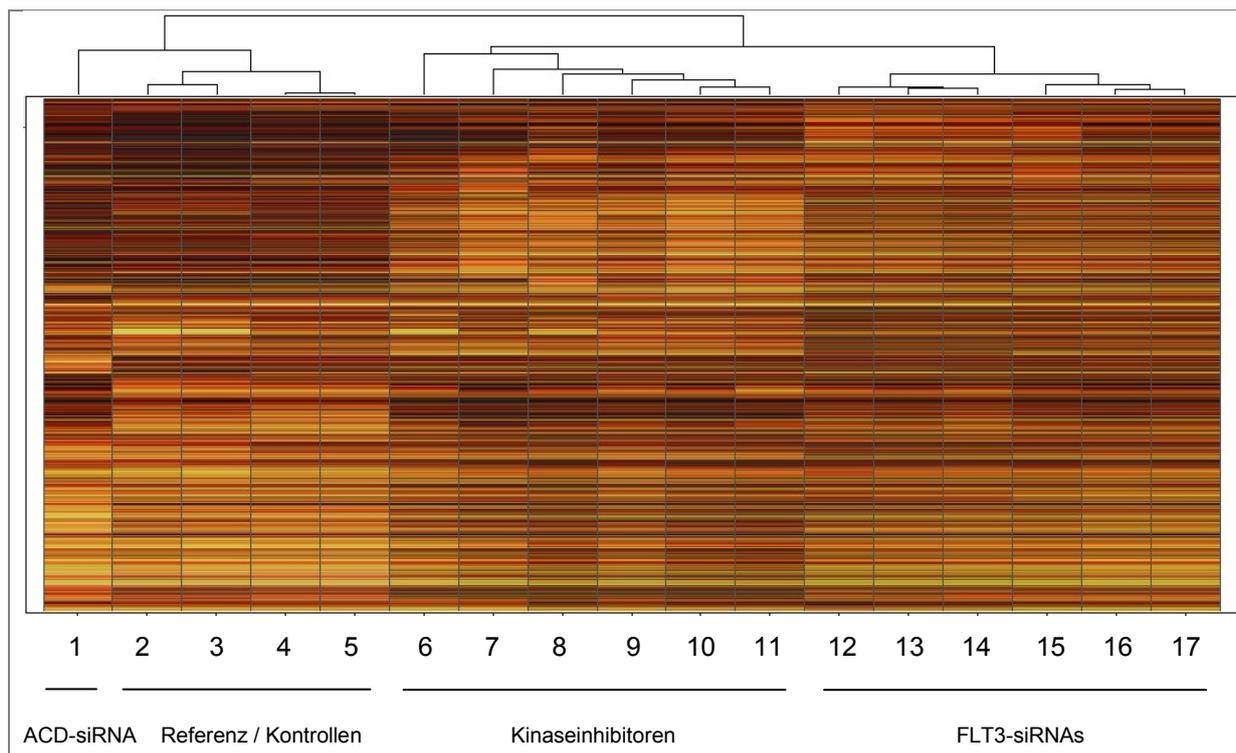


Abbildung 4.1-3: Clusteranalyse 1 zur relativen Ähnlichkeit der Transkriptionsprofile

Heatmap der Expressionswerte (schwarz= erstes Quartil, rot= Median; gelb = drittes Quartil) 1 AllStarCellDeath@-siRNA; 2 Vehikel=DMSO-Kontrolle; 3 Unbehandelt; 4 RISC free; 5 Luc-siRNA; 6 CHIR-265; 7 Sorafenib; 8 RKI-2; 9 VX-680; 10 CFI-3; 11 CFI-2; 12 FLT3-siRNA 4; 13 FLT3-siRNA 2; 14 FLT3-siRNA 1; 15 FLT3-siRNA 12; 16 FLT3-siRNA 11; 17 FLT3-siRNA 10

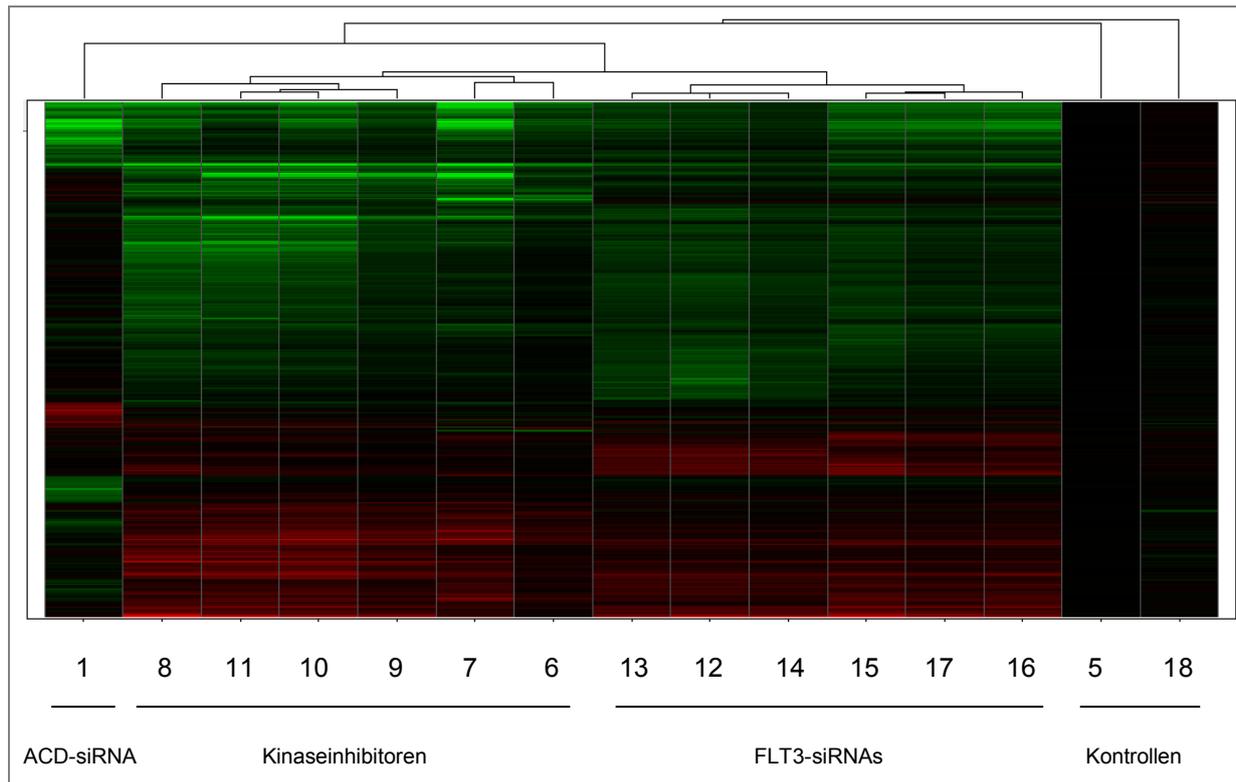


Abbildung 4.1-4: Clusteranalyse 2 zur relativen Ähnlichkeit der Transkriptionsprofile

Heatmap für die Veränderung relativ zur jeweiligen Referenz (Vehikel-Kontrolle bzw. Transfektion mit der siRNA „RISC free“) grün = reprimierte *Probe sets* ; rot = induzierte *Probe sets*.

1 AllStarCellDeath®-siRNA; 2 Vehikel=DMSO-Kontrolle; 3 Unbehandelt; 4 RISC free; 5 Luc-siRNA; 6 CHIR-265; 7 Sorafenib; 8 RKI-2; 9 VX-680; 10 CFI-3; 11 CFI-2; 12 FLT3-siRNA 4; 13 FLT3-siRNA 2; 14 FLT3-siRNA 1; 15 FLT3-siRNA 12; 16 FLT3-siRNA 11; 17 FLT3-siRNA 10; 18 Vehikel-Kontrolle zu Unbehandelt:

Die Inhibitoren ließen sich auf diese Weise nicht hinsichtlich einer FLT3-Selektivität gruppieren. Hierfür müssten vermutlich noch wesentlich mehr Transkriptionsprofile von Inhibitoren mit besser aufgeklärten, unterschiedlichen Wirkmechanismen analysiert werden.

Ein Grund für die Auftrennung der Profile nach siRNAs und Inhibitoren hätte sein können, dass das Ausmaß der Hemmung und die Kinetik der beiden Modulationsarten zu unterschiedlich sind: Die FLT3-siRNAs müssen zuerst die FLT3-mRNA degradieren und unterbinden somit die konstitutive FLT3-Signalebung erst allmählich durch den regulären Abbau (*turn over*) der vorhandenen FLT3-ITD-Proteine, während die Inhibitoren sofort nach Eintritt in die Zelle die Kinaseaktivität hemmen können.

So zeigt eine Clusteranalyse für vier-, acht-, 16- und 24-stündige Behandlungen von Sorafenib, CFI-3 und siRNAs, dass die Transkriptionsprofile nach kurzer Behandlungsdauer mit FLT3-siRNAs (vier und acht Stunden) den Profilen der Kontrollen ähnlicher sind als die Profile der Behandlung mit FLT3-Inhibitoren zu diesen Zeitpunkten (siehe Abbildung 4.1-4). Demgegenüber bilden die Profile für vier- und achtstündige Behandlung mit CFI-3 zusammen eine Untergruppe mit den Profilen für vier-, acht- und 16-stündige Behandlung mit Sorafenib. Bei einer kurzen Behandlungsdauer scheint also eine unterschiedliche Kinetik der Hemmung für das *Clustering* eine Rolle zu spielen.

Die Profile nach 16- bzw. 24-stündiger Behandlung mit FLT3-siRNAs bilden dagegen zusammen mit den Profilen für CFI-3 (Behandlungsdauer 16 u 24 Stunden) sowie Sorafenib (24 Stunden) ein *Cluster*

abseits der Kontrollen. (Das Profil für FLT3-siRNA 10 nach 16 Stunden Behandlungsdauer setzt sich zwar von denen für die anderen FLT3-siRNAs etwas ab. Vermutlich handelt es sich hierbei jedoch um einen Artefakt, da die Profile der FLT3-siRNA 10 zu den anderen Behandlungszeiten mit den anderen FLT3-siRNAs clustern.)

Dies zeigt, dass bei längerer Behandlungsdauer die Art der Behandlung einen größeren Einfluss auf das Transkriptom hat als der Wirkmechanismus, d.h. dass die „Nebenwirkungen“ der Applikation von siRNAs und Inhibitoren prägender als die FLT3-Hemmung sind.

Eventuell ist dieser Befund z. T. dem hier gewählten Zeitrahmen geschuldet. Um dies noch genauer zu untersuchen, könnten kürzere Abstände bzw. mehr Behandlungszeiten getestet werden, als es im Umfang dieser Arbeit möglich war. Um den Einfluss des Ausmaßes der Hemmung zu ermitteln, müssten die Inhibitoren zudem in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt werden.

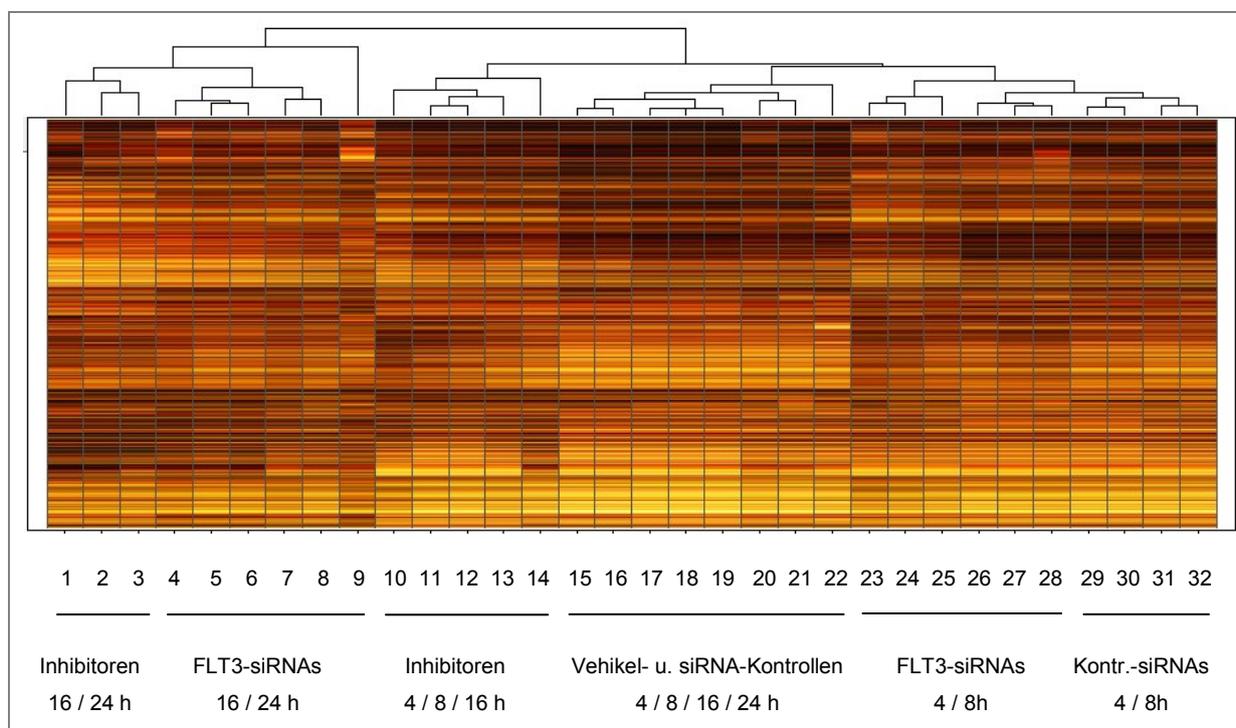


Abbildung 4.1-5: Heatmap der Expressionssignale für 5565 Probesets

(schwarz= erstes Quartil, rot= Median; weiß = viertes Quartil). 1 CFI-3 24 h; 2 Sorafenib 24 h; 3 CFI-3 16 h; 4 FLT3-siRNA 12 24h; 5 FLT3-siRNA 10 24h; 6 FLT3-siRNA 11 24h; 7 FLT3-siRNA 12 16h; 8 FLT3-siRNA 11 16h; 9 FLT3-siRNA 10 16h; 10 CFI-3 8 h; 11 CFI-3 4 h; 12 Sorafenib 4 h; 13 Sorafenib 8 h; 14 Sorafenib 16 h; 15 RF-siRNA 24 h; 16 Luciferase-siRNA 24 h; 17 Vehikel-Kontrolle 8 h; 18 Vehikel-Kontrolle 4 h; 19 Vehikel-Kontrolle 16 h; 20 Luciferase-siRNA 16 h; 21 RF-siRNA 16 h; 22 Vehikel-Kontrolle 24 h; 23 FLT3-siRNA 12 8h; 24 FLT3-siRNA 10 8h; 25 FLT3-siRNA 11 8h; 26 FLT3-siRNA 11 4h; 27 FLT3-siRNA 10 4h; 28 FLT3-siRNA 12 4h; 29 Luciferase-siRNA 4 h; 30 RF-siRNA 4 h; 31 RF-siRNA 8 h; 32 Luciferase-siRNA 8 h

4.1.4 Die Expressionsprofile der Behandlungen mit FLT3-siRNAs sind spezifisch

Interessanterweise sind nach vierstündiger Behandlung mit der FLT3-siRNA 10 und der FLT3-siRNA 12 mit TNF, PMP22, PIM1, MYC, MAT2A, INHBA, DUSP6 und CCND3 solche Gene reprimiert, welche u.a. durch die Stimulation von Eosinophilen mit CSF2 induziert werden (Bates et al., 2004). Da CSF2 wie FLT3 ein Wachstumsfaktor ist, scheint die hier beobachtete Repression eine direkte Wirkung der FLT3-Inhibition darzustellen.

Acht Stunden nach der Transfektion ist die „indikative“ Phosphatase DUSP6 weiterhin durch die FLT3-siRNAs 10 und 12 reprimiert. Die für Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren DLX1 und DLX2 sind reprimiert, die für Apoptose wichtigen Transkriptionsfaktoren PRDM1, PNR3 und CREBRF sind induziert. So wird PRDM1 als Tumorsuppressor angesehen, da seine Inaktivierung zu DLBCL (diffuse large B cell lymphoma) führt (Calado et al., 2010). Die Expressionsänderungen zeigen den Beginn des Zellzyklusarrests bzw. die Beeinträchtigung der Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen: BLNK↑, BMF↑, CCND3↓, INHBA↓, POLR3E↓, PRDX2↓, STK17B↓ und TNFSF10↑ (Donlin et al., 2002; Kozar et al., 2004; Labi et al., 2008; Lee et al., 2003; McGargill et al., 2008; Nojima et al., 2006; Shav-Tal & Zipori, 2002; Zamai et al., 2000).

16 Stunden nach der Transfektion sind hauptsächlich Gene aus dem Umfeld der Zellzykluskontrolle (CCND2↓, CDC25A↓, CDKN1C↑, MDM2↓ u.v.a.m.) beeinflusst, die auf die Aktivierung des G1/S-Kontrollpunktes hindeuten. Andererseits sind mit KIT↑, CSF1R↑ und CSF2RA↑ Rezeptoren für Wachstumsfaktoren induziert.

Die hier beobachtete Induktion von CSF1R (CD115 oder M-CSFR) und CSF2RA (= CD116 oder GM-CSFR) erscheint insofern plausibel, da beide über Aktivierung des Transkriptionsfaktors CEBPA (C/EBP-alpha) induziert werden können (Zhang et al., 1996). Die FLT3-ITD-Signalkaskade inhibiert CEBPA jedoch durch Phosphorylierung des Serin21 (Radomska et al., 2006). Eine Hemmung von FLT3-ITD könnte also zu einer Hemmung der Phosphorylierung und somit zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führen. CEBPA kann wiederum die Expression des CSF3R (CD114 oder G-CSF-Rezeptor) regulieren (Zhang et al., 1996). Allerdings war in den Experimenten der vorliegenden Arbeit CSF3R nicht beeinflusst.

Unter dem Gesichtspunkt der Therapieresistenz ist es interessant, dass die anti-proliferative Wirkung einer FLT3/ITD-Inhibition durch Behandlung mit dem Liganden für CSF3R, CSF3 (G-CSF), aufgehoben werden kann (Zheng et al., 2002). Ein solcher Rettungsversuch (*Rescue*) mit CSF3, oder analog mit CSF1 bzw. CSF2 wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht unternommen. Andererseits könnte die beobachtete Induktion der CSF-Rezeptoren für eine Therapie mit CSFs von Vorteil sein, wenn es gelänge, analog zur ATRA-Therapie bei APL, die Leukämiezellen terminal zu differenzieren, sodass sie schließlich sterben. Hierbei handelt es sich allerdings um einen sehr schmalen Grat, da das Risiko besteht, dass diese Zytokingaben den Krebszellen einen Überlebensvorteil verschaffen. Während CSF1R für die AML-Therapie aufgrund von Mutationen und Überexpression ein vielversprechendes Zielprotein darstellt (Kogan et al., 2012), ist er für die Therapie solider Tumore aufgrund der Expression in tumorassoziierten Makrophagen interessant (MacDonald et al., 2010).

4.1.5 Die FLT3-Inhibition induziert Differenzierung und einen *Kinase Switch*

Die hier beobachtete und für *in vitro*-Experimente bereits beschriebene Induktion der Differenzierung ist auch für den therapeutischen Nutzen relevant: obgleich unter Sorafenib-Behandlung keine oder kaum maligne Blasten im Knochenmark nachweisbar sind und sich scheinbar normale hämatopoetische Verhältnisse mit differenzierten Zellen einstellen, bleibt FLT3-ITD detektierbar (Man et al., 2012). Wie diese Differenzierung genau erfolgt, ob als direkte Folge der CEBPA-Reaktivierung oder indirekte Folge über die Aktivierung von RGS2 konnte bisher nicht geklärt werden (Schwable et al., 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Induktion der mit FLT3 eng verwandten Rezeptortyrosinkinasen AXL, CSF1R und KIT durch die Behandlung der Zellen mit FLT3-siRNAs und den Kinaseinhibitoren (hauptsächlich bei Sorafenib und CFI-3) deutet auf einen „*Kinase switch*“ hin. Dies bezeichnet die Beobachtung, dass bei Krebszellen, die von einem onkogenen Kinasesignalweg abhängig sind, durch dessen Inhibition andere Kinasen induziert werden. Diese neuen Kinasen können dann bei Anwesenheit der entsprechenden Liganden (z.B. autokrine Aktivierung) das ursprüngliche Proliferationssignal ersetzen oder zumindest Überlebenssignale liefern und je nach Ausmaß der vorangegangenen Apoptose-Induktion den Zelltod verhindern (Nguyen et al., 2009). Bei der Behandlung von gastrointestinalen Stromatumorzellen mit Imatinib stellt diese Induktion eines alternativen Wachstumsfaktorrezeptors bzw. eines solchen „Umschaltens“ auf AXL aufgrund der Blockade des KIT-Signalweges als Resistenzmechanismus ein großes Problem dar (Mahadevan et al., 2007). Die Expression der Rezeptortyrosinkinase AXL wird interessanterweise über KIT/KITLG und NFkBIA gesteuert und ihre Aktivierung durch den Liganden GAS6 (*growth arrest specific 6*; AXL-Ligand; AXLLG) kann die Zellproliferation stimulieren (Varnum et al., 1995). Des Weiteren ist beschrieben, dass eine Behandlung von AML-Zellen mit Zytostatika ebenfalls AXL induzieren kann und eine Überexpression in Gegenwart seines Liganden eine Resistenz gegenüber Zytostatika bewirken kann (Hong et al., 2008). Somit könnte auch die hier beobachtete Induktion von AXL infolge der FLT3-Blockade als anti-apoptotischer „Verteidigungsmechanismus“ interpretiert werden.

4.1.6 FLT3- und PIM1-Expression beeinflussen sich gegenseitig

Die hier beobachtete Repression der Kinase PIM1 durch die verschiedenen Behandlungen (siehe Abbildung 4.1-6) steht in Übereinstimmung mit der These, dass PIM1 und FLT3-ITD eine Rückkopplungsschleife bilden (Kim et al., 2005): Einerseits induziert FLT3-ITD die Expression der onkogenen Serin-/ Threoninkinase PIM1 (anscheinend vor allem über den ER-gebundenen STAT5-Weg), andererseits stabilisiert PIM1 die 130-kDa-Form von FLT3-ITD (Li et al., 2007; Natarajan et al., 2013). PIM kann außerdem auch BAD und andere Apoptose-Regulatoren phosphorylieren, wodurch Apoptose verhindert werden kann und PIM1 somit zur onkogenen Transformation der Zelle beitragen könnte (Choudhary & Mann, 2010). Eine PIM1-Inhibition wiederum sensibilisiert Zellen für eine FLT3-ITD-Inhibition z. B. durch Sorafenib (Adam et al., 2006).

Inwieweit die Unterschiede der PIM1-Repression durch die Behandlung mit verschiedenen Kinaseinhibitoren einen Zusammenhang mit der FLT3-Hemmung widerspiegeln, bleibt offen, aber der

hier beobachtete Unterschied zwischen Behandlungen mit siRNAs gegen FLT3 und siRNAs gegen Zellzykluskomponenten (ACD-siRNAs) deutet stark auf eine spezifische Rückkopplung hin.

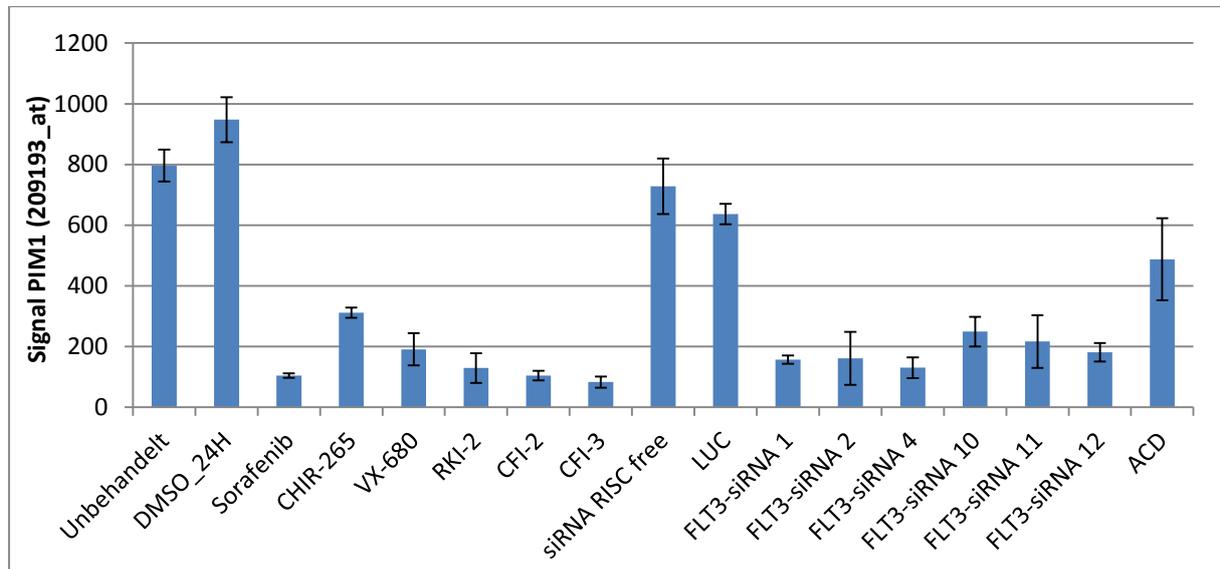


Abbildung 4.1-6: Expression der Serin-/ Threoninkinase PIM1 in MV4;11 nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren und siRNAs

Somit lieferte der Vergleich der Expressionsprofile der Behandlungen mit unterschiedlichen Kinaseinhibitoren und FLT3-siRNAs zwar detaillierte Einblicke in die molekularen Zusammenhänge des Zellzyklusarrests, der Apoptose und einer möglichen Resistenzentwicklung aber keine neuen Erkenntnisse zu den *upstream*-Vorgängen.

Somit stellt sich die Frage, ob das Konzept stimmt, dass man ein spezifisches Expressionsprofil eines Inhibitors erwarten könnte, welches weitgehend mit dem einer siRNA gegen die entsprechende Kinase übereinstimmt, wenn die Wirkung des Kinaseinhibitors bei einer gegebenen Konzentration auf der Inhibition dieser einen essentiellen bzw. der am effektivsten inhibierten Kinase beruht. In der vorliegenden Arbeit war dies bei keinem der getesteten Inhibitoren der Fall und die Menge der verändert exprimierten Gene war bei den Inhibitoren immer größer als bei den FLT3-siRNAs.

4.2 Die Signalwege downstream von CD20 und BCR interferieren

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass anti-CD20-Antikörper und anti-BCR-Antikörper ähnliche Änderungen auf Transkriptionsebene bewirken. In vier NHL-Zelllinien wurden BCR-Aktivierungsmuster induziert, indem Antikörper gegen den Immunglobulinteil (IgM bzw. IgG) des BCR appliziert wurden.

4.2.1 Anti-IgM/IgG-Antikörper aktivieren den BCR-Signalweg

Im menschlichen Körper werden die BCRs auf den B-Zellen zwar durch Antigene und nicht Antikörper miteinander verbunden, aber dieser Unterschied scheint sich nur auf die Dynamik der Internalisierung auszuwirken (Caballero et al., 2006), und sollte kaum Konsequenzen für den Vergleich des Einflusses verschiedener Antikörperbehandlungen auf das Transkriptom haben.

Die Behandlung der NHL-Zellen mit Antikörpern gegen IgM bzw. IgG verursachte Veränderungen der Transkriptionsmuster ähnlich einer BCR-Aktivierung. Unter den deregulierten Genen befinden sich auch wichtige Komponenten der BCR Signaltransduktionskaskade (siehe Tabelle 3.2-5). Von 61 Genen, die für BCR-Aktivierung typisch sind (Shaffer et al., 2001; Shaffer et al., 2006), überschneiden sich 14 Gene für REC-1, 16 Gene für OCI-LY18, 22 für Z-138 und 30 für SU-DHL-4. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Aktivierungsmuster der einzelnen Zelllinien teilweise beträchtlich unterscheiden.

Vermutlich ist dies auf den unterschiedlichen Entwicklungsstatus der Zelllinien zurückzuführen: OCI-LY18 und SU-DHL-4 entstammen DLBCL während Z-138 und REC-1 aus Mantelzell-Lymphomen hervorgegangen sind. Bei normalen B-Zellen kann der Entwicklungsstatus anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker bestimmt werden (Kaminski et al., 2012). Von besonderer Bedeutung ist hierbei CD27, da normale B-Zellen im unstimulierten Zustand dieses Protein nicht auf der Zelloberfläche tragen, aktivierte B-Zellen und Gedächtniszellen jedoch CD27 stark exprimieren (Jung et al., 2000). So entspricht das Muster von SU-DHL-4 (kein IgD, kein IgM und CD27 stark) demjenigen für Gedächtniszellen, die den Klassenwechsel bereits vollzogen haben (Kaminski et al., 2012). Allerdings zeigte sich auch bei der Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, dass - wie bereits beschrieben - die Kombinationen der Oberflächenmarker von Zelllinien vom Expressionschema normaler B-Zellen abweichen können (Dong et al., 2002).

Neben dem Unterschied im Entwicklungsstand der Zelllinien, könnte die unterschiedliche Expression des Fc-gamma-Rezeptor-II-B (FCGR2B) zum unterschiedlichen Verhalten der Zelllinien beitragen. Immerhin ist es möglich, dass die Antikörper nicht nur über ihre CDRs mit den Zielproteinen interagieren, sondern über den generischen (humanen) Fc-Teil mit Fc-Rezeptoren. Einer dieser Rezeptoren, der FCGR2B ist bekannt dafür, über seine Immunorezeptor-Tyrosin-basierten inhibitorischen Motive (ITIM) die Phosphatase SHIP1 zu rekrutieren (Crowley et al., 2009; Isnardi et al., 2006) und mit dem BCR-Signalweg auf inhibitorische Weise zu interferieren (Chu et al., 2008; Isnardi et al., 2006; Niederer et al., 2010; Rankin et al., 2006; Waldschmidt & Tygrett, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden daher neben vollständigen Antikörpern z.T. auch deren F(ab')₂-Fragmente sowie Antikörper mit murinem Fc verwendet um diesen Einfluss auf den BCR-Signalweg zu minimieren.

Der BCR-Signalweg beginnt mit der Aktivierung des membranständigen B-Zell-Rezeptors durch Bindung des passenden Antigens. Daraufhin werden die Immunorezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotive (ITAM) von CD79B phosphoryliert und die zytosolische Kinase SYK kann daran binden. SYK wiederum phosphoryliert und aktiviert weitere Proteine wie das Adaptorprotein BLNK, SLP65 und PI3K, sodass das Signal weitergeleitet wird (Niiro & Clark, 2002). Dementsprechend unterbricht eine Inhibition der Kinase SYK den BCR-Signalweg und wird daher übrigens auch als Möglichkeit für die Therapie von Lymphomen in Betracht gezogen (Young et al., 2009). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren hemmen SYK sehr spezifisch (biochemische SYK-IC50: 14 nM bzw. 10 nM IC50 für Inhibitor I bzw. IV, IC50 für andere Kinasen $>4,7\mu\text{M}$ bei SYK-Inhibitor IV; zelluläre IC50 313 nM bzw. 110 nM (Lai et al., 2003; Yamamoto et al., 2003).

Die Hemmung der SYK-Aktivität mittels dieser Inhibitoren verringerte die anti-BCR/anti-CD20-Antikörper-induzierte CCL3-Sekretion deutlich. Der gleiche Effekt kann durch siRNA-vermittelte Verringerung des SYK-Proteins erreicht werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Kinase SYK außer im BCR-Signalweg analog auch im CD20-Signalweg als Signalmultiplikator fungiert. Dies könnte für die Verwendung von SYK-Inhibitoren in der Anti-CD20-Antikörper-Therapie Konsequenzen haben, da hier Interferenzen wahrscheinlich sind.

4.2.2 Der anti-CD20-Antikörper-induzierte Signalweg umfasst Komponenten des BCR-Signalwegs

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Transkriptionsänderungen verschiedener Lymphomzelllinien infolge einer Behandlung mit Rituximab (und anderen anti-CD20-Antikörpern) deutlich unterschiedlich ausfallen. Dies steht zum im Einklang mit der Beobachtung von Cittera und Kollegen (Cittera et al., 2005). Darüber hinaus waren von den 16 dort beschriebenen, durch eine Behandlung deren DHL4-Zelllinie mit anti-CD20-Antikörpern induzierten Genen, im vorliegenden Datensatz ebenfalls neun (CD83, DUSP2, FOS, ID3, IER2, NR4A1, RGS2, ZFP36 und ZFP36L1) hochreguliert. Interessanterweise wurde in dieser Studie auch die Induktion von BIC, dem *Locus* für die miRNA155 beobachtet. Zwar ist bekannt, dass DLBCL-Tumoren des aktivierten B-Zell-Phänotyps BIC stark exprimieren und eine BCR-Stimulation in eine weitere Induktion bewirkt (Kluiver et al., 2005), allerdings sollten miRNAs normalerweise nicht auf einem HG U133 plus 2.0-Array detektiert werden. Die ungewöhnliche 3'polyadenylierung von BIC (Kluiver et al., 2005; Metzler et al., 2004), könnte allerdings erklären, weshalb es bei einer Probenvorbereitung mit einer oligo-dT-geprimten cDNA-Synthese trotzdem detektiert werden kann.

Die Tatsache, dass nur zwei der vier Zelllinien auf die Behandlung mit anti-CD20-Antikörpern ansprachen, zeigt, dass diese Behandlung keine unspezifischen Effekte wie Zytotoxizität verursachte. Die Frage, weshalb einige NHL-Zelllinien auf die Behandlung mit anti-CD20-Antikörpern reagieren, andere trotz vorhandener CD20-Expression nicht, ist noch immer ungeklärt. Welchen Einfluss hat die Menge an CD20 auf der Zelloberfläche auf dieses Verhalten? Während einige Zelllinien mit hoher CD20-Expression stark auf die Behandlung mit anti-CD20-Antikörpern reagieren, tun dies Zelllinien mit niedriger Expression oft nicht. Allerdings reagieren einige Zelllinien mit niedriger CD20-Expression, wenn die anti-CD20-Antikörper mit sekundären Antikörpern zusätzlich verbunden werden (*hyper*

cross-linking) (Walshe et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass die Menge an verbundenem CD20 entscheidend ist. Dies erklärt aber noch nicht, weshalb unterschiedliche Zelllinien mit vergleichbar hoher CD20-Expression reagieren oder nicht. Denkbar wäre, dass in jenen Zelllinien, die nicht reagieren, die CD20-Moleküle in einer anderen Konformation oder Verteilung vorliegen oder die Signalkaskade *downstream* von CD20 defekt ist.

Kheirallah und Kollegen zeigten kürzlich, dass die Signalwege von CD20 und BCR interagieren und sich gegenseitig hemmen können (Kheirallah et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dies, da beide Signalwege die Expression wichtiger Komponenten der Kaskade reprimieren. Unter der Annahme also, dass beide Membranproteine denselben Signalweg aktivieren und gleiche negative Rückkopplungsschleifen regulieren, indem sie gleiche Transkriptionsveränderungen bewirken oder inhibitorische Phosphatasen aktivieren, würde der Signalweg auch für beide Stimuli gehemmt sein. Des Weiteren lässt sich aus den Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass die Nicht-Responsivität der Zelllinien OCI-LY-18 und Z138 auf anti-CD20-Antikörper nicht durch eine defekte Signalkaskade bedingt ist, da diese Zelllinien auf eine Behandlung mit anti-BCR-Antikörpern sehr gut reagieren.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Rituximab die Organisation von *Lipid rafts* stört und somit direkt den BCR-Signalweg beeinträchtigt (Kheirallah et al., 2010).

Zusammengefasst zeigt diese Studie also, dass zwischen den Behandlungen mit anti-CD20 und anti-BCR-Antikörpern umfangreiche Ähnlichkeiten in den Transkriptionsänderungen (bis zu 80% gleich) und in der Signaltransduktion existieren. Zusammen mit bereits bekannten Beobachtungen deutet dies auf einen - zumindest in Teilen - gemeinsamen Signalweg und somit auf einen möglichen Wirkmechanismus hin, wie anti-CD20-Antikörper vom Typ I eher indirekt Apoptose induzieren. Die verbesserte Aktivierung der ADCC und die direkte Induktion von Zelltod führen zur besseren Wirksamkeit der Typ II anti-CD20-Antikörper (Niederfellner et al., 2011). Dies ist besonders von klinischer Relevanz wie die Überlegenheit des Typ II anti-CD20-Antikörpers Obinutuzumab (GazyvaTM, GA101) gegenüber Rituximab bei der Behandlung von CLL zeigt (Goede et al., 2014).

4.3 Vergleich von Expressionsmustern

Der Vergleich von Expressionsmustern unterliegt vielen Einschränkungen, z.B. den Zelllinien, der Kinetik der Wirkung, der unterschiedlichen Anzahl an Expressionsänderungen oder der Stärke der jeweiligen Änderung, welche die Vergleichbarkeit zweier Behandlungen beeinflussen. So ist bei der anti-CD20 deutlich geworden, dass die Unterschiede der Transkriptionsmuster auch zwischen ähnlichen Zelllinien unter vergleichbaren Bedingungen z.T. sehr groß sind. Bei der FLT3-Modulation zeigte sich deutlich, dass es von entscheidender Bedeutung ist, das richtige Zeitfenster für die Inhibition zu treffen. Der zuerst gewählte Behandlungszeitraum von 24 Stunden war anscheinend zu lang, da die Expressionsmuster dann hauptsächlich von apoptotischen Signalen dominiert wurden. Aber auch schon bei der kürzesten Behandlungsdauer (4 Stunden) stand die Inhibition des Zellzyklus im Vordergrund. Trotzdem korrelierte die jeweilige Größe der Schnittmenge der Expressionsmuster von Inhibitoren und siRNAs gut mit den biochemischen Daten.

Die im Ergebnisteil beschriebenen Analysen der Transkriptionsmuster basieren auf der Filterung mit Standardfilterkriterien und Schnittmengenbildung. Dabei kann es vorkommen, dass eine Expressionsänderung, welche alle Kriterien in einem Versuchsansatz erfüllt, in einem anderen Ansatz eines der Kriterien knapp verfehlt. Folglich ist diese Genregulation dann nicht in der Schnittmenge und bei der anschließenden funktionellen Charakterisierung enthalten, obwohl sie eventuell relevant gewesen wäre. Dies lässt sich mit einer *Gene-Set-Enrichment-Analyse* (GSEA, Broad Institute) umgehen.

Für eine funktionelle Einordnung der FLT3-siRNA-Behandlung wurden hierbei nicht mehr die Schnittmengen sondern die Vereinigungsmengen der Transkriptionsänderungen analysiert. Dadurch konnte eine größere Zahl an Genen in die Analyse einfließen und es war trotzdem sichergestellt, dass jeweils in mindestens einem Versuchsansatz alle Standardfilterkriterien erreicht wurden. In den 1681 Transkriptionsänderungen nach 24-stündiger Behandlung mit den FLT3-siRNA waren acht von 186 KEGG-Pathways signifikant mit einer $FDR < 25\%$ überrepräsentiert. Der Algorithmus identifizierte die Signalwege Zellzyklus, DNA-Replikation, Pyrimidin-Stoffwechsel, Purinstoffwechsel, Spliceosom, Lysosom, Systemischer Lupus und Cytokin-Cytokinrezeptor-Interaktion. Alle Signalwege dieser Analyse außer „Systemischer Lupus“ bestätigen die Ergebnisse der Überschneidungsmethode (siehe Abbildung 4.3-1 Beispiele für Enrichment-Plots der relevanten Signalwege).

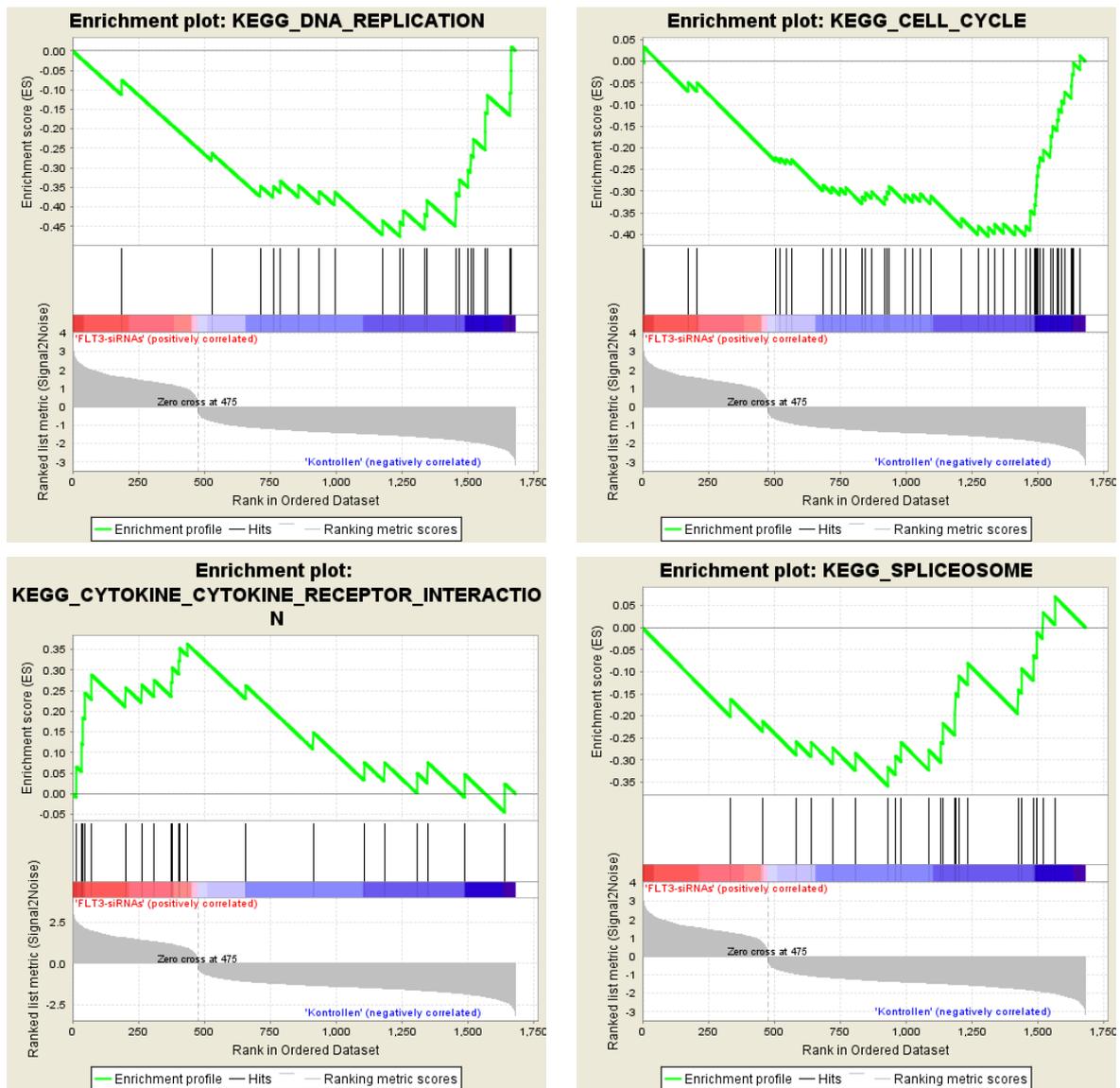


Abbildung 4.3-1 Gene set enrichment-Analysen für die Transkriptionsänderungen bei MV4;11 nach 24-stündiger Behandlung mit FLT3-siRNAs.

Der obere Bereich des Plots stellt den (laufenden) ES graphisch dar. Der ES für eine jeweilige Genliste wird durch das Maximum der Kurve definiert. Im Bereich der senkrechten Striche in der Mitte werden die einzelnen Treffer, also die Übereinstimmungen zwischen Expressionsliste und Genliste, angezeigt. Der farbige Balken in der Mitte repräsentiert die geordnete Expressionsdatenliste, darunter sind die dazugehörigen Werte der Funktion, anhand derer geordnet wurde, dargestellt.

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob sich in den Expressionsänderungen nach Inhibitorbehandlung die (spezifischen) Muster der siRNA-Behandlung wiederfinden lassen. Hierfür wurden zunächst eigene Genlisten aus den Transkriptionsmustern der Behandlungen mit den FLT3-siRNAs generiert und anschließend in den Datensätzen der Behandlung mit den Inhibitoren auf Überrepräsentation getestet.

Das Profil der achtstündigen Behandlung mit Sorafenib zeigte dabei signifikante Übereinstimmungen mit den siRNA-Behandlungen nach 16 und 24 Stunden. Dies deutet darauf hin, dass sich die Transkriptionsmuster tatsächlich ähnlich sind, sich aber in ihrer Kinetik etwas unterscheiden. Mit dem

Kontrollversuch der ACD-siRNAs hingegen teilt die Sorafenibbehandlung keine Ähnlichkeit (siehe Abbildung 9.4-1). Auch dies bestätigt die Ergebnisse der Überschneidungsmethode (vgl. Abbildung 4.1-4)

Nach dem die Ähnlichkeit der Muster gezeigt wurde, stellte sich die Frage nach der Spezifität der Inhibitoren: Angenommen man kennt den FLT3-spezifischen Teil des Expressionsprofils, ließe sich dann aus dem Rest eine mögliche „*off-target*“-Inhibition gegen andere Kinasen als FLT3 ermitteln? Hierfür wurden aus den Transkriptionsmustern zum einen die verändert exprimierten Transkriptionsfaktoren extrahiert bzw. analysiert und zum anderen wurde mittels Datenbankabgleich auf die potentielle Beteiligung von Transkriptionsfaktoren extrapoliert. Beide Ansätze haben jeweils Vor- und Nachteile: Die Analyse der verändert exprimierten Transkriptionsfaktoren ist zwar die direktere Methode, setzt aber voraus, dass die Signale der *upstream* agierenden Kinasen nicht nur die Aktivität, sondern über Rückkopplungsschleifen auch die Expression der Transkriptionsfaktoren regulieren. Sie konnte sowohl bei den kürzeren als auch bei den längeren Behandlungszeiten angewendet werden. Die Extrapolationsmethode benötigt für die zugrundeliegende Statistik ein Mindestmaß an deregulierten Genen. Daher wurde bei den kurzen Behandlungszeiten mit wenigen Transkriptionsänderungen für keinen Transkriptionsfaktor das Signifikanzniveau erreicht.

Eine Alternative zu den evidenz-basierten Transkriptionsfaktorextrapolationen sind Homologie-Modelle. Hierbei wird aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in der Promotorregionen der verändert exprimierten Gene die Wahrscheinlichkeit der Beteiligung von Transkriptionsfaktoren berechnet (Charoensawan et al., 2010).

Sowohl die Transkriptionsmuster an sich als auch die Transkriptionsfaktorextrapolationen für die Behandlungen mit Inhibitoren und siRNAs gegen FLT3 wiesen im Sinne eines zeitabhängigen FLT3-Inhibitionsusters weitreichende Übereinstimmungen (*on-target*) auf. Allerdings konnte nach Subtraktion dieses „*on-Target*-Musters“ weder aus den eigentlichen Profilen noch via Transkriptionsfaktoren eindeutig auf *off-Target*-Effekte der Inhibitoren rückgeschlossen werden.

Ein Grund könnte sein, dass die Annotation in den Datenbanken nicht optimal ist, da die verändert exprimierten Gene gar nicht oder nicht richtig (da nicht bekannt) einzelnen Transkriptionsfaktoren (Tripathi et al., 2013) oder der Aktivität bzw. Inhibition einzelner Kinasen zugeordnet sind. Wie bei der CD20-Aktivierung beobachtet, führen gleiche Signalwege in unterschiedlichen Zelllinien zu unterschiedlichen Transkriptionsmustern, was den Vergleich der gefundenen Muster mit den in den Datenbanken hinterlegten Mustern erschwert. Außerdem zeichnet sich ab, dass der *Crosstalk* verschiedener Signalwege doch komplexer ist, als die Darstellung in linearen Signalkaskaden andeutet (Meng & Xia, 2011). Daher scheint es sinnvoller eventuell über Phosphoproteomics-Ansätze statt Transkriptionsmustern auf die einzelnen Kinasen der zugrunde liegenden Signalwege zu extrapolieren.

Für eine umfassende, therapierelevante Charakterisierung von Kinaseinhibitoren im Speziellen aber auch anderen, neuen pharmazeutischen Wirkstoffen, scheint es notwendig für die jeweils verwendete Zelllinie ein „eigenes“ Modell der aktiven Signalwege und deren Interaktionen im Sinne eines

systembiologischen Ansatzes aus diversen „Omics“-Quellen zusammen zu tragen (Schadt et al., 2010). Um die dafür benötigten Vergleichsmuster zu kennen, müsste man entsprechende Profile für viele Behandlungszeiten mit den entsprechenden siRNAs und hochspezifischen Inhibitoren gegen sämtliche, möglicherweise beteiligte Proteine erstellen.

Für die Quantifizierung des Transkriptomts erscheint die *Array*-Technologie in diesem Zusammenhang jedoch völlig ausreichend, da bei der Verwendung von Zelllinien der Zugewinn an Information durch neuere Technologien wie die RNA-Sequenzierung (*RNA-seq*) vergleichsweise gering wäre, wohingegen bei Populationsstudien letztere Methode im Vorteil ist (Malone & Oliver, 2011).

Insofern kann man derzeit mit Expressionsprofilierungen nicht verlässlich auf spezifische, unbekannte Wirkungen von Substanzen *upstream* von der Transkription extrapolieren. Hingegen sind über *downstream* gelegene zelluläre Funktionen wie Zellzyklusarrest, Apoptose, bestimmte konservierte Signalwege etc. verlässliche Aussagen möglich. So gibt der Vergleich verschiedener Behandlungsarten Hinweisen auf molekulare Wirkungsweisen, die mit anderen Methoden wie ELISA ggf. untermauert oder widerlegt werden können.

4.4 **Ausblick**

Die Analyse des Transkriptomts mit den verwendeten *Microarrays* liefert sehr detaillierte Einblicke, hat aber einige Nachteile wie 3'-Bias, Beschränkung auf bekannte Sequenzen und Nichtunterscheidbarkeit von Splicingvarianten. Die Weiterentwicklung dieser Technologie zu Arrays, die verschiedene Splicing-Varianten unterscheiden können und die Entwicklung neuer Strategien wie der RNA-Sequenzierung revolutionieren gegenwärtig die Transkriptomanalyse (Wang et al., 2009). Sie ändern aber nichts am grundsätzlichen Problem der Erstellung verlässlicher Vergleichsmuster.

Bei entsprechenden Hinweisen auf gemeinsame Signalwege ist die Transkriptionsanalyse bestens geeignet, Übereinstimmungen aufzuzeigen. Das Gegenteil, also die Detektion von Unterschieden ist ungleich schwieriger. Ohne konkrete Hinweise erscheint es derzeit unmöglich aus einem Transkriptom auf die Aktivität bzw. Hemmung einer einzelnen Kinase rückzuschließen, da die Blockierung eines Signalweges auf verschiedenen Ebenen schließlich zum selben Ergebnis führen kann. Kinaseinhibitoren können mit dieser Technologie dahingehend überprüft werden, ob in einem bestimmten Zelltyp der intendierte Signalweg gehemmt wird. Für ein *Screening* welche der dabei involvierten Kinasen wirklich gehemmt wird, erscheint die Transkriptionsprofilierung derzeit jedoch ungeeignet.

Da sich die Zweifel mehren, ob die Inhibition einzelner Kinasen dauerhaften Erfolg bringen kann, werden derzeit auch Inhibitoren entwickelt die gleichzeitig mehrere Kinasen inhibieren, z.B. Rezeptortyrosinkinasen und PI3K (Apsel et al., 2008).

Neben diesen Weiterentwicklungen von Inhibitoren, die direkt die Kinaseaktivität beeinflussen, gibt es verschiedene Ansätze onkogene Kinasen und ihre Signalwege mit Transkriptioninhibitoren, siRNAs, Chaperoninhibitoren oder Antikörpern auszuschalten (Cragg et al., 2009).

5 Zusammenfassung

Um den Wirkmechanismus verschiedener Krebstherapeutika aufzuklären bzw. besser zu verstehen wurden in der vorliegenden Arbeit deren Wirkungen auf Zelllinien untersucht. Hierfür wurde die Wirkung verschiedener kommerziell erhältlicher und einiger Roche-eigener Kinaseinhibitoren auf Leukämiezelllinien untereinander und mit der Wirkung von FLT3-siRNAs verglichen. Die Auswirkungen von Behandlungen mit anti-CD20- und anti-BCR-Antikörper wurden an Lymphomzelllinien analysiert.

Für die FLT3-Inhibition konnte gezeigt werden, dass die Vorhersagen zur Spezifität aus der Display-Technologie in vier von fünf Fällen tendenziell richtig waren. In einem mehrstufigen Verfahren wurden verschiedene Eigenschaften der Inhibitoren getestet: Hemmung der Phosphorylierung von rekombinanter FLT3-Kinase, Hemmung der zellulären Phosphorylierung der Wildtyp-FLT3-Kinase, Hemmung der Phosphorylierung von FLT3 mit der ITD-Mutation. So konnte für die Substanzen VX-680, CHIR-265 und RKI-1 eine FLT3-Hemmung als primärer Wirkmechanismus in einer Zelllinie mit FLT3-ITD ausgeschlossen werden. Für die kommerziell erhältlichen Inhibitoren Sorafenib, CFI-2 und CFI-3 sowie die neue Substanz RKI-3 konnte bestätigt bzw. gezeigt werden, dass sie FLT3 / FLT3-ITD in biochemischen und zellulären Testsystemen spezifisch hemmen können.

Die Expressionsprofilierung erwies sich für die Klärung dieser Fragestellung nur als bedingt geeignet, da die Expressionsmuster der Behandlungen mit verschiedenen Inhibitoren untereinander trotz unterschiedlicher Wirkungsweisen funktionell stark übereinstimmten. In diesen Profilen zeichnete sich bereits nach vierstündiger Behandlung ein Zellzyklusarrest ab, und im weiteren Verlauf wurden sie von Expressionsänderungen aus dem Umfeld der Apoptose dominiert. Die Inhibitoren konnten jedoch hinsichtlich der FLT3-Hemmung relativ zu einander aufgrund der Übereinstimmung mit dem Muster der Behandlung mit FLT3-siRNAs eingeordnet werden. Aus den bei beiden Behandlungsarten übereinstimmend deregulierten Genen wurden zeitabhängige FLT3-Inhibitionssignaturen abgeleitet.

Die Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Typ I anti-CD20-Antikörpern zeigten, dass der Signalweg *downstream* von CD20 in den getesteten Zelllinien zumindest teilweise mit dem der BCR-Aktivierung identisch ist. Obgleich die Übereinstimmung der BCR-Aktivierungsmuster der verschiedenen Zelllinien verhältnismäßig gering war, konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsmuster der Behandlungen mit anti-CD20- bzw. anti-BCR-Antikörpern untereinander in großen Teilen übereinstimmten. Zwei der besonders schnell und stark induzierten Gene waren CCL3 und CCL4. Die Kinase SYK ist als Signalüberträger *downstream* des BCR bekannt. Die Induktion der Cytokine CCL3 und CCL4 konnte durch SYK-Hemmung mittels spezifischer Inhibitoren und das siRNA-vermittelte Stilllegen von SYK deutlich vermindert werden. Somit deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass SYK auch im Signalweg von CD20 eine wichtige Rolle spielt. Durch die Behandlung von NHL-Zelllinien mit anti-CD20-Antikörpern wie Rituximab oder LT20 wird demzufolge eine zelluläre Antwort ausgelöst, die einer BCR-Aktivierung ähnelt.

6 Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

ACD	“AllStars cell death” – Kontroll-siRNA der Firma Qiagen
Affymetrix ID	Identifikationsnummer eines <i>Probe Sets</i> auf einem Affymetrix <i>Gene Chip</i>
ALL	Akute lymphatische/lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>B cell receptor</i> : B-Zell-Rezeptor
CLL	Chronische lymphatische/lymphoblastische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)
GSEA	<i>gene-set enrichment analysis</i> : Analyse von Gen-sets
ITD	<i>internal-tandem-duplication</i> : Mutation in der Juxtamembran-Domäne bei FLT3
n.s.v.	n.s.v. = nicht signifikant verändert
RNAi	<i>RNA interference</i> : RNS-Interferenz
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
UTR	<i>untranslated region</i> : Untranslatierter Bereich

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1.2-1: ÜBERBLICK ÜBER DIE HUMANEN TYROSINKINASEN	4
ABBILDUNG 1.2-2: SIGNALWEITERLEITUNG VON FLT3.....	6
ABBILDUNG 1.2-3: SIGNALNETZWERK DES B-ZELL-REZEPTORS.....	8
ABBILDUNG 3.1-1: DETEKTION VON FLT3 IN RS4;11 NACH SIRNAS-TRANSFEKTION PER <i>WESTERN BLOT</i>	32
ABBILDUNG 3.1-2: DETEKTION VON FLT3 IN MV4;11 NACH SIRNAS-TRANSFEKTION PER <i>WESTERN BLOT</i>	34
ABBILDUNG 3.1-3: VIABILITÄT VON MV4;11-ZELLEN NACH TRANSFEKTION VON FLT3-SIRNAS	35
ABBILDUNG 3.1-4: VERÄNDERUNG DER MORPHOLOGIE VON MV4;11-ZELLEN NACH TRANSFEKTION VERSCHIEDENER FLT3-SIRNAS	36
ABBILDUNG 3.1-5: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES ZELLYKLUSSTATUS FÜR DIE ZELLINIE MV4;11 NACH BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN SIRNAS	37
ABBILDUNG 3.1-6: IPA-DARSTELLUNG DER IN DER LITERATUR BESCHRIEBENEN VERBINDUNGEN ZWISCHEN DEN DURCH FLT3-SIRNAS NACH VIER STUNDEN DEREGLIERTEN GENEN	41
ABBILDUNG 3.1-7: FLUORESZENZKURVEN DER TRF-MESSUNG.....	49
ABBILDUNG 3.1-8: DETEKTION VON PHOSPHORYLIERTEM FLT3 PER <i>WESTERN BLOT</i>	50
ABBILDUNG 3.2-1: VERGLEICH DER DEREGLIERTEN GENE NACH BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN ANTIKÖRPER-	71
ABBILDUNG 3.2-2: VERGLEICH DER DEREGLIERTEN GENE NACH BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN ANTIKÖRPERN BEI ZWEI ANTI-CD20 RESPONSIVEN ZELLINIEN	72
ABBILDUNG 3.2-3: VERGLEICH DER BCR-AKTIVIERUNG IN DEN VIER GETESTETEN ZELLINIEN	72
ABBILDUNG 3.2-4: INTERAKTIONEN DER DURCH ANTI-CD20-ANTIKÖRPER DEREGLIERTEN GENE BEI DEN ZELLINIEN SU-DHL-4 UND REC-1.....	76
ABBILDUNG 3.2-5: INHIBITION DER CCL3-INDUKTION DURCH SYK-INHIBITOREN BEI SU-DHL-4	77
ABBILDUNG 3.2-6: INHIBITION DER ANTIKÖRPERINDUZierten CCL3/CCL4-SEKRETION DURCH SYK-SIRNAS.....	77
ABBILDUNG 4.1-1: SYMBOLISIERTE INHIBITIONEN DURCH SORAFENIB ÜBER EINEM DENDROGRAMM DER HUMANEN KINASEN (KARAMAN ET AL., 2008).....	79
ABBILDUNG 4.1-2: VERÄNDERUNG DER EXPRESSION (<i>CHANGE FACTOR</i>) BEI RS4;11 DURCH BEHANDLUNG MIT FLT3-SIRNAS	86
ABBILDUNG 4.1-3: CLUSTERANALYSE 1 ZUR RELATIVEN ÄHNLICHKEIT DER TRANSKRIPTIONSPROFILE	88
ABBILDUNG 4.1-4: CLUSTERANALYSE 2 ZUR RELATIVEN ÄHNLICHKEIT DER TRANSKRIPTIONSPROFILE	89
ABBILDUNG 4.1-5: HEATMAP DER EXPRESSIONSSIGNALE FÜR 5565 PROBESETS	90
ABBILDUNG 4.1-6: EXPRESSION DER SERIN-/ THREONINKINASE PIM1 IN MV4;11 NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN INHIBITOREN UND SIRNAS.....	93
ABBILDUNG 4.3-1 <i>GENE SET ENRICHMENT</i> -ANALYSEN FÜR DIE TRANSKRIPTIONSÄNDERUNGEN BEI MV4;11 NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT FLT3-SIRNAS.	98
ABBILDUNG 9.1-1 BEISPIELE FÜR DIE ERMITTLUNG VON IC50-WERTEN.....	121

ABBILDUNG 9.4-1: <i>GENE SET ENRICHMENT</i> -ANALYSEN FÜR DIE TRANSKRIPTIONSÄNDERUNGEN BEI MV4;11 NACH ACHTSTÜNDIGER BEHANDLUNG MIT SORAFENIB IM VERGLEICH ZU DEN GENLISTEN FÜR DIE BEHANDLUNG MIT FLT3-SIRNAS.....	150
ABBILDUNG 9.5-1: VENNDIAGRAMME DER TRANSKRIPTIONSÄNDERUNGEN IN MV4;11 NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN KINASEINHIBITOREN	151
TABELLE 3.1-1: EXPRESSION DER FÜNF RELEVANTEN REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN IN AUSGEWÄHLTEN ZELLINIEN	31
TABELLE 3.1-2 ANZAHL DER DEREGULIERTEN GENE IN DER ZELLINIE RS4;11 NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT SIRNAS	33
TABELLE 3.1-3: EXPRESSIONSVERÄNDERUNG VON FLT3 UND ANZAHL AN DEREGULIERTEN GENEN BEI MV4;11 DURCH 24-STÜNDIGE BEHANDLUNG MIT SIRNAS	38
TABELLE 3.1-4: VERÄNDERUNG DER FLT3-EXPRESSION UND ANZAHL DEREGULIERTE GENE IN MV4;11 VIER, ACHT BZW. 16 STUNDEN NACH TRANSFEKTION DER SIRNAS	39
TABELLE 3.1-5: EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN BEI MV4;11 NACH VIER-, ACHT- UND 16-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT FLT3-SIRNAS	46
TABELLE 3.1-6: HEMMUNG DER FLT3-PHOSPHORYLIERUNG <i>IN VITRO</i>	48
TABELLE 3.1-7: HEMMUNG DER FLT3-PHOSPHORYLIERUNG BEI DER ZELLINIE RS4;11	50
TABELLE 3.1-8: IC50-WERTE DER GETESTETEN INHIBITOREN	51
TABELLE 3.1-9: ANZAHL DEREGULIERTER GENE IN MV4;11 DURCH BEHANDLUNG MIT NIEDERMOLEKULAREN INHIBITOREN NACH 24 STUNDEN IM VERGLEICH ZUM FLT3-SIRNA-MUSTER (62↑/112↓)	52
TABELLE 3.1-10 ANZAHL DER POTENTIELL <i>FLT3-INHIBITIONS-UNABHÄNGIG</i> BEEINFLUSSTEN GENE	55
TABELLE 3.1-11: ZELLULÄRE FUNKTIONEN DER GENEXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN	56
TABELLE 3.1-12: EXTRAPOLIERTER AKTIVITÄTSÄNDERUNGEN VON KINASEN UND EINER PHOSPHATASE BEI DER ZELLINIE MV4;11 NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT KINASEINHIBITOREN	59
TABELLE 3.1-13 ANZAHL AN DIFFERENTIELL REGULIERTEN GENEN IN MV4;11 NACH VIER-, ACHT- UND 16-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT SORAFENIB BZW. CFI-3	60
TABELLE 3.1-14 QUANTITATIVER VERGLEICH DER BEEINFLUSSTEN GENE NACH VIER-, ACHT- UND 16-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT FLT3-SIRNAS BZW. MIT NIEDERMOLEKULAREN INHIBITOREN	61
TABELLE 3.1-15: ZUSAMMENFASSUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS DER FLT3-INHIBITION DURCH FLT3-SIRNAS UND FLT3-SPEZIFISCHE INHIBITOREN	63
TABELLE 3.1-16: VERGLEICH DER ABGELEITETEN AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH 16-STÜNDIGER BEHANDLUNG	65
TABELLE 3.2-1: ANZAHL AN DEREGULIERTEN GENEN NACH BEHANDLUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN CD20 UND ANTIKÖRPERN GEGEN DEN B-ZELL-REZEPTOR	67
TABELLE 3.2-2 SCHNITTMENGEN DEREGULIERTER GENE NACH VERSCHIEDENEN BEHANDLUNGEN MIT ANTIKÖRPERN	68
TABELLE 3.2-3: OBERFLÄCHENEXPRESSION EINIGER B-ZELL-ANTIGENE LAUT DURCHFLUSSZYTOMETRIE	69
TABELLE 3.2-4: MRNA-EXPRESSION EINIGER B-ZELL-ANTIGENE LAUT AFFYMETRIX-EXPRESSIONSANALYSE	69

TABELLE 3.2-5: FUNKTIONELLE ZUSAMMENFASSUNG DER BEI REC-1, SU-DHL-4, OCI-LY18 UND Z-138 DURCH BCR-AKTIVIERUNG DEREGULIERTEN GENE	73
TABELLE 3.2-6: FUNKTIONELLE ZUSAMMENFASSUNG DER BEI REC-1 UND SU-DHL-4 DURCH BEHANDLUNG MIT ANTI-CD20-ANTIKÖRPERN DEREGULIERTEN GENE	74
TABELLE 3.2-7: GENE, DIE BEI ALLEN VIER GETESTETEN ZELLINIEN NACH BCR-AKTIVIERUNG UND BEI SU-DHL-4 UND REC-1 DURCH DIE BEHANDLUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN CD20 DEREGULIERT WURDEN	75
TABELLE 4.1-1: ZUSAMMENFASSUNG DER INHIBITORENCHARAKTERISIERUNG	84
TABELLE 9.2-1 EXPRESSIONSÄNDERUNGEN ALLER GENE IN RS4;11 NACH 24-STÜNDIGER FLT3-SIRNA-BEHANDLUNG	122
TABELLE 9.2-2: VERÄNDERUNG DER EXPRESSION VON GENEN BEI MV4;11 DURCH 24-STÜNDIGE BEHANDLUNG SOWOHL DURCH FLT3- ALS AUCH DURCH ACD-SIRNAS	123
TABELLE 9.2-3 VERÄNDERUNG DER EXPRESSION VON GENEN BEI MV4;11, DIE DURCH 24-STÜNDIGE BEHANDLUNG MIT ALLEN FLT3-SIRNAS (ABER NICHT DURCH ACD-SIRNAS) ÜBEREINSTIMMEND DEREGULIERT WURDEN („FLT3-INHIBITONSMUSTER - 24 STUNDEN“)	125
TABELLE 9.2-4 GENE, DIE BEI MV4;11 NUR DURCH ACD-SIRNAS (ABER NICHT DURCH FLT3-SIRNAS) 24 STUNDEN NACH TRANSFEKTION DEREGULIERT WURDEN	128
TABELLE 9.2-5 AUS DEN TRANSKRIPTIONSÄNDERUNGEN ABGELEITETE ZELLULÄRE FUNKTIONEN DER INHIBITOREN (TOP 5 MIT P-WERTBEREICHEN DER SUBSETS)	136
TABELLE 9.3-1 EXTRAPOLIERTE AKTIVITÄTSVERÄNDERUNGEN VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT FLT3-SIRNAS	137
TABELLE 9.3-2 EXTRAPOLIERTE AKTIVITÄTSVERÄNDERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN INHIBITOREN	138
TABELLE 9.3-3 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH BEHANDLUNG MIT SORAFENIB	140
TABELLE 9.3-4 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH BEHANDLUNG MIT VX-680	140
TABELLE 9.3-5 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH BEHANDLUNG MIT CFI-3	141
TABELLE 9.3-6 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH BEHANDLUNG MIT CFI-2	141
TABELLE 9.3-7 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH BEHANDLUNG MIT CHIR-265	142
TABELLE 9.3-8 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACH BEHANDLUNG MIT RKI-2	142
TABELLE 9.3-9 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON KINASEN UND PHOSPHATASEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT SORAFENIB	143
TABELLE 9.3-10 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON KINASEN UND PHOSPHATASEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT VX-680	143
TABELLE 9.3-11 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON KINASEN UND PHOSPHATASEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT CFI-3	143
TABELLE 9.3-12 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON KINASEN UND PHOSPHATASEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT CFI-2	144

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	106
TABELLE 9.3-13 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON KINASEN UND PHOSPHATASEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT CHIR-265	144
TABELLE 9.3-14 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON KINASEN UND PHOSPHATASEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT RKI-2	144
TABELLE 9.3-15 ABGELEITETE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN MV4;11 16 STUNDEN NACH DER TRANSFEKTION DER FLT3-SIRNAS [#]	145
TABELLE 9.3-16 EXTRAPOLIERTE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN BEI MV4;11-ZELLEN BEHANDLUNG MIT SORAFENIB	146
TABELLE 9.3-17 EXTRAPOLIERTE AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN BEI MV4;11-ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER BEHANDLUNG MIT CFI-3	147
TABELLE 9.3-18 EXPRESSION VON INTERFERONINDUZIERBAREN GENEN IN MV4;11 DURCH BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN FLT3-SIRNAS UND LUCIFERASE-SIRNAS	149

8 Literaturverzeichnis

- Adam M, Pogacic V, Bendit M, Chappuis R, Nawijn MC, Duyster J, Fox CJ, Thompson CB, Cools J, Schwaller J (2006) Targeting PIM kinases impairs survival of hematopoietic cells transformed by kinase inhibitor-sensitive and kinase inhibitor-resistant forms of Fms-like tyrosine kinase 3 and BCR/ABL. *Cancer Res.* 66:3828-3835
- Alayev A, Holz MK (2013) mTOR signaling for biological control and cancer. *J. Cell Physiol* 228:1658-1664
- Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, Shimada K, Chan CH, Tutt A, Beers SA, Glennie MJ, Cragg MS, Illidge TM (2011) Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* 117:4519-4529
- Anderson EM, Birmingham A, Baskerville S, Reynolds A, Maksimova E, Leake D, Fedorov Y, Karpilow J, Khvorova A (2008) Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA.* 14:853-861
- Apfel B, Blair JA, Gonzalez B, Nazif TM, Feldman ME, Aizenstein B, Hoffman R, Williams RL, Shokat KM, Knight ZA (2008) Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nat. Chem. Biol.* 4:691-699
- Arachchige-Don AS, Dallapiazza RF, Bennin DA, Brake T, Cowan CE, Horne MC (2006) Cyclin G2 is a centrosome-associated nucleocytoplasmic shuttling protein that influences microtubule stability and induces a p53-dependent cell cycle arrest. *Exp. Cell Res.* 312:4181-4204
- Arora D, Kothe S, van den EM, Hooft van HR, Heidel F, Fischer T, Scholl S, Tolle B, Bohmer SA, Lennartsson J, Isken F, Muller-Tidow C, Bohmer FD (2012) Expression of protein-tyrosine phosphatases in Acute Myeloid Leukemia cells: FLT3 ITD sustains high levels of DUSP6 expression. *Cell Commun. Signal.* 10:-19
- Auclair D, Miller D, Yatsula V, Pickett W, Carter C, Chang Y, Zhang X, Wilkie D, Burd A, Shi H, Rocks S, Gedrich R, Abriola L, Vasavada H, Lynch M, Dumas J, Trail PA, Wilhelm SM (2007) Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia* 21:439-445
- Audas TE, Li Y, Liang G, Lu R (2008) A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* 28:3952-3966
- Basketter DA, Clewell H, Kimber I, Rossi A, Blaauboer B, Burrier R, Daneshian M, Eskes C, Goldberg A, Hasiwa N, Hoffmann S, Jaworska J, Knudsen TB, Landsiedel R, Leist M, Locke P, Maxwell G, McKim J, McVey EA, Ouedraogo G, Patlewicz G, Pelkonen O, Roggen E, Rovida C, Ruhdel I, Schwarz M, Schepky A, Schoeters G, Skinner N, Trentz K, Turner M, Vanparys P, Yager J, Zurlo J, Hartung T (2012) A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing - t4 report*. *ALTEX.* 29:3-91
- Bassuk AG, Muthuswamy LB, Boland R, Smith TL, Hulstrand AM, Northrup H, Hakeman M, Dierdorff JM, Yung CK, Long A, Brouillette RB, Au KS, Gurnett C, Houston DW, Cornell RA, Manak JR (2013) Copy number variation analysis implicates the cell polarity gene glypican 5 as a human spina bifida candidate gene. *Hum. Mol. Genet.* 22:1097-1111
- Bates ME, Liu LY, Esnault S, Stout BA, Fonkem E, Kung V, Sedgwick JB, Kelly EA, Bates DM, Malter JS, Busse WW, Bertics PJ (2004) Expression of interleukin-5- and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor-responsive genes in blood and airway eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30:736-743
- Batlle A, Papadopoulou V, Gomes AR, Willimott S, Melo JV, Naresh K, Lam EW, Wagner SD (2009) CD40 and B-cell receptor signalling induce MAPK family members that can either induce or repress Bcl-6 expression. *Mol. Immunol.* 46:1727-1735

- Baud V, Karin M (2009) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8:33-40
- Becker N, Altenburg HP, Stegmaier C, Ziegler H (2007) Report on trends of incidence (1970-2002) of and mortality (1952-2002) from cancer in Germany. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133:23-35
- Benard G, Neutzner A, Peng G, Wang C, Livak F, Youle RJ, Karbowski M (2010) IBRD2, an IBR-type E3 ubiquitin ligase, is a regulatory factor for Bax and apoptosis activation. *EMBO J.* 29:1458-1471
- Berberich SJ, Todd A, Tuttle R (2011) Why YPEL3 represents a novel tumor suppressor. *Front Biosci.* 16:1746-1751
- Bikoff EK, Morgan MA, Robertson EJ (2009) An expanding job description for Blimp-1/PRDM1. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19:379-385
- Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D (1992) Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 80:2584-2593
- Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A (2006) 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods* 3:199-204
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365
- Boos D, Frigola J, Diffley JF (2012) Activation of the replicative DNA helicase: breaking up is hard to do. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24:423-430
- Borriello A, Caldarelli I, Bencivenga D, Criscuolo M, Cucciolla V, Tramontano A, Oliva A, Perrotta S, Della RF (2011a) p57(Kip2) and cancer: time for a critical appraisal. *Mol. Cancer Res.* 9:1269-1284
- Borriello A, Caldarelli I, Bencivenga D, Cucciolla V, Oliva A, Usala E, Danise P, Ronzoni L, Perrotta S, Della RF (2011b) p57Kip2 is a downstream effector of BCR-ABL kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia cells. *Carcinogenesis* 32:10-18
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducaux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* 34:263-264
- Brunet S, Labopin M, Esteve J, Cornelissen J, Socie G, Iori AP, Verdonck LF, Volin L, Gratwohl A, Sierra J, Mohty M, Rocha V (2012) Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *J. Clin. Oncol.* 30:735-741
- Bullinger L, Dohner K, Kranz R, Stirner C, Frohling S, Scholl C, Kim YH, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR (2008) An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood* 111:4490-4495
- Calado DP, Zhang B, Srinivasan L, Sasaki Y, Seagal J, Unitt C, Rodig S, Kutok J, Tarakhovskiy A, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K (2010) Constitutive canonical NF-kappaB activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell* 18:580-589
- Cancro MP (2009) Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nat. Rev. Immunol.* 9:657-661
- Cano-Soldado P, Molina-Arcas M, Alguero B, Larrayoz I, Lostao MP, Grandas A, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2008) Compensatory effects of the human nucleoside transporters on the response to nucleoside-derived drugs in breast cancer MCF7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 75:639-648

Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P, Witte L, Borowitz MJ, Civin CI, Small D (1996) Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 87:1089-1096

Chaouchi N, Vazquez A, Galanaud P, Leprince C (1995) B cell antigen receptor-mediated apoptosis. Importance of accessory molecules CD19 and CD22, and of surface IgM cross-linking. *J. Immunol.* 154:3096-3104

Charoensawan V, Wilson D, Teichmann SA (2010) Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 38:7364-7377

Cheetham GM, Charlton PA, Golec JM, Pollard JR (2007) Structural basis for potent inhibition of the Aurora kinases and a T315I multi-drug resistant mutant form of Abl kinase by VX-680. *Cancer Lett.* 251:323-329

Choudhary C, Mann M (2010) Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:427-439

Choudhary C, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H (2005a) Signal transduction of oncogenic Flt3. *Int. J. Hematol.* 82:93-99

Choudhary C, Schwable J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H (2005b) AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 106:265-273

Chu SY, Vostiar I, Karki S, Moore GL, Lazar GA, Pong E, Joyce PF, Szymkowski DE, Desjarlais JR (2008) Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol. Immunol.* 45:3926-3933

Cittera E, Leidi M, Buracchi C, Pasqualini F, Sozzani S, Vecchi A, Waterfield JD, Introna M, Golay J (2007) The CCL3 family of chemokines and innate immunity cooperate in vivo in the eradication of an established lymphoma xenograft by rituximab. *J. Immunol.* 178:6616-6623

Cittera E, Onofri C, D'Apolito M, Cartron G, Cazzaniga G, Zelante L, Paolucci P, Biondi A, Introna M, Golay J (2005) Rituximab induces different but overlapping sets of genes in human B-lymphoma cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.* 54:273-286

Clark JJ, Cools J, Curley DP, Yu JC, Lokker NA, Giese NA, Gilliland DG (2004) Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518. *Blood* 104:2867-2872

Cragg MS, Harris C, Strasser A, Scott CL (2009) Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat. Rev. Cancer* 9:321-326

Crowley JE, Stadanlick JE, Cambier JC, Cancro MP (2009) FcγRIIB signals inhibit BLyS signaling and BCR-mediated BLyS receptor up-regulation. *Blood* 113:1464-1473

Daver N, Cortes J (2012) Molecular targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Hematology.* 17 Suppl 1:S59-S62

de Hoog CL, Foster LJ, Mann M (2004) RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* 117:649-662

Dick FA, Rubin SM (2013) Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:297-306

Dong HY, Shahsafaei A, Dorfman DM (2002) CD148 and CD27 are expressed in B cell lymphomas derived from both memory and naive B cells. *Leuk. Lymphoma* 43:1855-1858

Donlin LT, Roman CA, Adlam M, Regelman AG, Alexandropoulos K (2002) Defective thymocyte maturation by transgenic expression of a truncated form of the T lymphocyte adapter molecule and Fyn substrate. *Sin. J. Immunol.* 169:6900-6909

Eeva J, Pelkonen J (2004) Mechanisms of B cell receptor induced apoptosis. *Apoptosis.* 9:525-531

Eidenschenk C, Crozat K, Krebs P, Arens R, Popkin D, Arnold CN, Blasius AL, Benedict CA, Moresco EM, Xia Y, Beutler B (2010) Flt3 permits survival during infection by rendering dendritic cells competent to activate NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107:9759-9764

Fabian MA, Biggs WH, III, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lelias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ (2005) A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 23:329-336

Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A, Lander ES (1999) Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* 97:727-741

Fathi AT, Chabner BA (2011) FLT3 inhibition as therapy in acute myeloid leukemia: a record of trials and tribulations. *Oncologist.* 16:1162-1174

Fei F, Stoddart S, Groffen J, Heisterkamp N (2010) Activity of the Aurora kinase inhibitor VX-680 against Bcr/Abl-positive acute lymphoblastic leukemias. *Mol. Cancer Ther.* 9:1318-1327

Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, Kienast J, Leo R, Schwartz S, Berdel WE, Serve H (2000) Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br. J. Haematol.* 108:322-330

Fink MY, Chipuk JE (2013) Survival of HER2-Positive Breast Cancer Cells: Receptor Signaling to Apoptotic Control Centers. *Genes Cancer* 4:187-195

Foged C (2012) siRNA delivery with lipid-based systems: promises and pitfalls. *Curr. Top. Med. Chem.* 12:97-107

Franke A, Niederfellner GJ, Klein C, Burtscher H (2011) Antibodies against CD20 or B-cell receptor induce similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. *PLoS. One.* 6:-e16596

Fuller-Pace FV (2013) The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): Multi-tasking transcriptional regulators. *Biochim. Biophys. Acta*

Furet P, Bold G, Meyer T, Roesel J, Guagnano V (2006) Aromatic interactions with phenylalanine 691 and cysteine 828: a concept for FMS-like tyrosine kinase-3 inhibition. Application to the discovery of a new class of potential antileukemia agents. *J. Med. Chem.* 49:4451-4454

Garcia-Echeverria C (2009) Protein and lipid kinase inhibitors as targeted anticancer agents of the Ras/Raf/MEK and PI3K/PKB pathways. *Purinergic. Signal.* 5:117-125

Giamas G, Stebbing J, Vorgias CE, Knippschild U (2007) Protein kinases as targets for cancer treatment. *Pharmacogenomics.* 8:1005-1016

Gilliland DG, Griffin JD (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100:1532-1542

Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP (2007) Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* 44:3823-3837

Glynn R, Ghandour G, Rayner J, Mack DH, Goodnow CC (2000) B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunol. Rev.* 176:216-246

Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, Chagorova T, de la SJ, Dilhuydy MS, Illmer T, Opat S, Owen CJ, Samoylova O, Kreuzer KA, Stilgenbauer S, Dohner H, Langerak AW, Ritgen M, Kneba M, Asikanius E, Humphrey K, Wenger M, Hallek M (2014) Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N. Engl. J. Med.*

Gossage L, Eisen T (2010) Targeting multiple kinase pathways: a change in paradigm. *Clin. Cancer Res.* 16:1973-1978

Gozuacik D, Chami M, Lagorce D, Faivre J, Murakami Y, Poch O, Biermann E, Knippers R, Brechot C, Paterlini-Brechot P (2003) Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMcm8. *Nucleic Acids Res.* 31:570-579

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Basseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446:153-158

Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol. Cell* 13:169-178

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674

Happel N, Doenecke D (2009) Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1-12

Harwood NE, Batista FD (2008) New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity.* 28:609-619

Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T (2000) Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 19:624-631

Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, Brandts C, Serve H, Roesel J, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller GJ, Nimer S, Stone RM, Wang Y, Kindler T, Cohen PS, Huber C, Fischer T (2006) Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* 107:293-300

Hieronymus T, Ruau D, Ober-Blobaum J, Baek JH, Rolletschek A, Rose-John S, Wobus AM, Muller AM, Zenke M (2008) The transcription factor repertoire of Flt3+ hematopoietic stem cells. *Cells Tissues. Organs* 188:103-115

Hohenauer T, Moore AW (2012) The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development* 139:2267-2282

Holmfeldt P, Stenmark S, Gullberg M (2007) Interphase-specific phosphorylation-mediated regulation of tubulin dimer partitioning in human cells. *Mol. Biol. Cell* 18:1909-1917

Horikawa K, Martin SW, Pogue SL, Silver K, Peng K, Takatsu K, Goodnow CC (2007) Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *J. Exp. Med.* 204:759-769

Hosono K, Sasaki T, Minoshima S, Shimizu N (2004) Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species. *Gene* 340:31-43

Hubbard SR (2001) Theme and variations: juxtamembrane regulation of receptor protein kinases. *Mol. Cell* 8:481-482

- Isnardi I, Bruhns P, Bismuth G, Fridman WH, Daeron M (2006) The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited to the intracytoplasmic domain of human FcγRIIB and is mandatory for negative regulation of B cell activation. *Immunol. Lett.* 104:156-165
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21:635-637
- Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA.* 12:1197-1205
- Jiang H, Karnezis AN, Tao M, Guida PM, Zhu L (2000) pRB and p107 have distinct effects when expressed in pRB-deficient tumor cells at physiologically relevant levels. *Oncogene* 19:3878-3887
- John SA, Garrett-Sinha LA (2009) Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues. *Exp. Cell Res.* 315:1077-1084
- Jonsson M, Engstrom M, Jonsson JI (2004) FLT3 ligand regulates apoptosis through AKT-dependent inactivation of transcription factor FoxO3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:899-903
- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, Maclachlan I (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 23:457-462
- Jung J, Choe J, Li L, Choi YS (2000) Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10. *Eur. J. Immunol.* 30:2437-2443
- Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I (2012) Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol.* 3:302
- Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, Chan KW, Ciceri P, Davis MI, Edeen PT, Faraoni R, Floyd M, Hunt JP, Lockhart DJ, Milanov ZV, Morrison MJ, Pallares G, Patel HK, Pritchard S, Wodicka LM, Zarrinkar PP (2008) A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 26:127-132
- Keen N, Taylor S (2004) Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 4:927-936
- Kern DJ, James BR, Blackwell S, Gassner C, Klein C, Weiner GJ (2013) GA101 induces NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity more effectively than Rituximab when complement is present. *Leuk. Lymphoma*
- Khatri P, Draghici S (2005) Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics.* 21:3587-3595
- Kheirallah S, Caron P, Gross E, Quillet-Mary A, Bertrand-Michel J, Fournie JJ, Laurent G, Bezombes C (2010) Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood* 115:985-994
- Kim KT, Baird K, Ahn JY, Meltzer P, Lilly M, Levis M, Small D (2005) Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 105:1759-1767
- Kitamura S, Sugihara K (2014) Current status of prediction of drug disposition and toxicity in humans using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* 44:123-134
- Kitzen JJ, de Jonge MJ, Verweij J (2010) Aurora kinase inhibitors. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 73:99-110
- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T (1998) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 12:1333-1337

Kluiver J, Poppema S, de JD, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den BA (2005) BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* 207:243-249

Kogan M, Fischer-Smith T, Kaminsky R, Lehmicke G, Rappaport J (2012) CSF-1R up-regulation is associated with response to pharmacotherapy targeting tyrosine kinase activity in AML cell lines. *Anticancer Res.* 32:893-899

Kola I, Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:711-715

Kolbus A, Blazquez-Domingo M, Carotta S, Bakker W, Luedemann S, von Lindern M, Steinlein P, Beug H (2003) Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 102:3136-3146

Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P (2004) Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118:477-491

Kurosaki T (2002) Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 2:354-363

Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Manzl C, Frenzel A, O'Reilly L, Strasser A, Villunger A (2008) Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development. *J. Exp. Med.* 205:641-655

Larson PS, Schlechter BL, King CL, Yang Q, Glass CN, Mack C, Pistey R, de Las MA, Rosenberg CL (2008) CDKN1C/p57kip2 is a candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *BMC. Cancer* 8:-68

Lee TH, Kim SU, Yu SL, Kim SH, Park DS, Moon HB, Dho SH, Kwon KS, Kwon HJ, Han YH, Jeong S, Kang SW, Shin HS, Lee KK, Rhee SG, Yu DY (2003) Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 101:5033-5038

Leischner H, Albers C, Grundler R, Razumovskaya E, Spiekermann K, Bohlander S, Ronnstrand L, Gotze K, Peschel C, Duyster J (2012) SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML. *Blood* 119:4026-4033

Lennartsson J, Ronnstrand L (2006) The stem cell factor receptor/c-Kit as a drug target in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 6:65-75

Levis M, Pham R, Smith BD, Small D (2004) In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood* 104:1145-1150

Li L, Piloto O, Kim KT, Ye Z, Nguyen HB, Yu X, Levis M, Cheng L, Small D (2007) FLT3/ITD expression increases expansion, survival and entry into cell cycle of human haematopoietic stem/progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 137:64-75

Lierman E, Lahortiga I, Van MH, Mentens N, Marynen P, Cools J (2007) The ability of sorafenib to inhibit oncogenic PDGFRbeta and FLT3 mutants and overcome resistance to other small molecule inhibitors. *Haematologica* 92:27-34

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-1441

Lowinger TB, Riedl B, Dumas J, Smith RA (2002) Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase. *Curr. Pharm. Des* 8:2269-2278

- Lu Y, Kitaura J, Oki T, Komeno Y, Ozaki K, Kiyono M, Kumagai H, Nakajima H, Nosaka T, Aburatani H, Kitamura T (2007) Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD. *Leukemia* 21:2246-2257
- Luo LF, Hou CC, Yang WX (2013) Nuclear factors: Roles related to mitochondrial deafness. *Gene* 520:79-89
- Lyman SD (1995) Biology of flt3 ligand and receptor. *Int. J. Hematol.* 62:63-73
- Lyman SD, Jacobsen SE (1998) c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91:1101-1134
- MacDonald KP, Palmer JS, Cronau S, Seppanen E, Olver S, Raffelt NC, Kuns R, Pettit AR, Clouston A, Wainwright B, Branstetter D, Smith J, Paxton RJ, Cerretti DP, Bonham L, Hill GR, Hume DA (2010) An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* 116:3955-3963
- Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR (1995) Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 3:147-161
- Mahboobi S, Uecker A, Sellmer A, Cenac C, Hocher H, Pongratz H, Eichhorn E, Hufsky H, Trumpler A, Sicker M, Heidel F, Fischer T, Stocking C, Elz S, Bohmer FD, Dove S (2006) Novel bis(1H-indol-2-yl)methanones as potent inhibitors of FLT3 and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J. Med. Chem.* 49:3101-3115
- Malone JH, Oliver B (2011) Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC. Biol.* 9:-34
- Man CH, Fung TK, Ho C, Han HH, Chow HC, Ma AC, Choi WW, Lok S, Cheung AM, Eaves C, Kwong YL, Leung AY (2012) Sorafenib treatment of FLT3-ITD(+) acute myeloid leukemia: favorable initial outcome and mechanisms of subsequent nonresponsiveness associated with the emergence of a D835 mutation. *Blood* 119:5133-5143
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934
- Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dorken B, Mapara MY (2000) Anti-CD20- and B-cell Receptor mediated Apoptosis: Evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res.* 60:7170-7176
- Mayumi M, Ohshima Y, Hata D, Kim KM, Heike T, Katamura K, Furusho K (1995) IgM-mediated B cell apoptosis. *Crit Rev. Immunol.* 15:255-269
- McGargill MA, Choy C, Wen BG, Hedrick SM (2008) Drak2 regulates the survival of activated T cells and is required for organ-specific autoimmune disease. *J. Immunol.* 181:7593-7605
- Meng Q, Xia Y (2011) c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* 2:889-898
- Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, Scholl S, Fey M, Gotze K, Linn YC, Kroger M, Reiter A, Salih HR, Heinicke T, Stuhlmann R, Muller L, Giagounidis A, Meyer RG, Brugger W, Vohringer M, Dreger P, Mori M, Basara N, Schafer-Eckart K, Schultheis B, Baldus C, Neubauer A, Burchert A (2012) High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. *Leukemia* 26:2353-2359
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A (2004) High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes. Cancer* 39:167-169
- Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri YU, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y, Fujimoto J (2003) Costimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia* 17:1164-1174

Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H (2000) Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96:3907-3914

Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Bohmer FD, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H (2003) Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 101:3164-3173

Mizuno T, Rothstein TL (2005a) B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement creates an alternate pathway for BCR signaling that activates I kappa B kinase/I kappa B alpha/NF-kappa B without the need for PI3K and phospholipase C gamma. *J. Immunol.* 174:6062-6070

Mizuno T, Rothstein TL (2005b) B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement enhances BCR-induced ERK activation. *J. Immunol.* 174:3369-3376

Mony U, Jawad M, Seedhouse C, Russell N, Pallis M (2008) Resistance to FLT3 inhibition in an in vitro model of primary AML cells with a stem cell phenotype in a defined microenvironment. *Leukemia* 22:1395-1401

Moore AS, Faisal A, Gonzalez de CD, Bavetsias V, Sun C, Atrash B, Valenti M, de Haven BA, Avery S, Mair D, Mirabella F, Swansbury J, Pearson AD, Workman P, Blagg J, Raynaud FI, Eccles SA, Linardopoulos S (2012) Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD+ acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a model for emerging clinical resistance patterns. *Leukemia* 26:1462-1470

Mordant P, Loriot Y, Leteur C, Calderaro J, Bourhis J, Wislez M, Soria JC, Deutsch E (2010) Dependence on phosphoinositide 3-kinase and RAS-RAF pathways drive the activity of RAF265, a novel RAF/VEGFR2 inhibitor, and RAD001 (Everolimus) in combination. *Mol. Cancer Ther.* 9:358-368

Morello LG, Hesling C, Coltri PP, Castilho BA, Rimokh R, Zanchin NI (2011) The NIP7 protein is required for accurate pre-rRNA processing in human cells. *Nucleic Acids Res.* 39:648-665

Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van PE, Ferrara C, Sondermann P, Jager C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schull C, Bauer S, Dal PJ, Del NC, Dabbagh K, Dyer MJ, Poppema S, Klein C, Umama P (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115:4393-4402

Nakamura M, Kitaura J, Enomoto Y, Lu Y, Nishimura K, Isobe M, Ozaki K, Komeno Y, Nakahara F, Oki T, Kume H, Homma Y, Kitamura T (2012) Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a negative-feedback regulator of Ras / Raf signaling: Implications for tumorigenesis. *Cancer Sci.* 103:26-33

Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S (1996) Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1911-1918

Natarajan K, Xie Y, Burcu M, Linn DE, Qiu Y, Baer MR (2013) Pim-1 Kinase Phosphorylates and Stabilizes 130 kDa FLT3 and Promotes Aberrant STAT5 Signaling in Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Internal Tandem Duplication. *PLoS. One.* 8:-e74653

Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB (2009) Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin. Lung Cancer* 10:281-289

Niederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KG (2010) FcgammaRIIB, FcgammaRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183:69-88

Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, Franke A, Wiechmann K, Jenewein S, Sloatstra JW, Timmerman P, Brannstrom A, Lindstrom F, Mossner E,

Umana P, Hopfner KP, Klein C (2011) Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 118:358-367

Nihiro H, Clark EA (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2:945-956

Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Takeshita A, Taniguchi A, Komatsu N, Togitani K, Koeffler HP, Yokoyama A (2008) Blockade of MEK/ERK signaling enhances sunitinib-induced growth inhibition and apoptosis of leukemia cells possessing activating mutations of the FLT3 gene. *Leuk. Res.* 32:865-872

Nojima T, Hayashi K, Goitsuka R, Nakayama K, Nakayama K, Kitamura D (2006) Double knockout mice show BASH and PKCdelta have different epistatic relationships in B cell maturation and CD40-mediated activation. *Immunol. Lett.* 105:48-54

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435:839-843

Ong FS, Das K, Wang J, Vakili H, Kuo JZ, Blackwell WL, Lim SW, Goodarzi MO, Bernstein KE, Rotter JI, Grody WW (2012) Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 12:593-602

Park SH, Chi HS, Min SK, Cho YU, Jang S, Park CJ, Lee JH, Lee JH, Lee KH, Im HJ, Seo JJ (2011) Prognostic significance of the FLT3 ITD mutation in patients with normal-karyotype acute myeloid leukemia in relapse. *Korean J. Hematol.* 46:88-95

Pawson T, Saxton TM (1999) Signaling networks--do all roads lead to the same genes? *Cell* 97:675-678

Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J (2002) The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 99:1314-1319

Perosa F, Prete M, Racanelli V, Dammacco F (2010) CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. *J. Intern. Med.* 267:260-277

Petrie RJ, Deans JP (2002) Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J. Immunol.* 169:2886-2891

Polyak MJ, Li H, Shariat N, Deans JP (2008) CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 283:18545-18552

Pratz K, Levis M (2008) Incorporating FLT3 inhibitors into acute myeloid leukemia treatment regimens. *Leuk. Lymphoma* 49:852-863

Pratz KW, Luger SM (2014) Will FLT3 inhibitors fulfill their promise in acute myeloid leukemia? *Curr. Opin. Hematol.* 21:72-78

Pruitt KD, Maglott DR, Brown GR, Tatusova T (2012) NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res.* 40:

Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG (2003) FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 17:120-124

Radomska HS, Basseres DS, Zheng R, Zhang P, Dayaram T, Yamamoto Y, Sternberg DW, Lokker N, Giese NA, Bohlander SK, Schnittger S, Delmotte MH, Davis RJ, Small D, Hiddemann W, Gilliland DG, Tenen DG (2006) Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *J. Exp. Med.* 203:371-381

Ragelle H, Vandermeulen G, Preat V (2013) Chitosan-based siRNA delivery systems. *J. Control Release* 172:207-218

Rankin CT, Veri MC, Gorlatov S, Tuailon N, Burke S, Huang L, Inzunza HD, Li H, Thomas S, Johnson S, Stavenhagen J, Koenig S, Bonvini E (2006) CD32B, the human inhibitory Fc-gamma receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma. *Blood* 108:2384-2391

Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino AC, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Buhring HJ (1997) Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 90:111-125

Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, Katayama S, Bajic VB, Tan K, Akalin A, Schmeier S, Kanamori-Katayama M, Bertin N, Carninci P, Daub CO, Forrest AR, Gough J, Grimmond S, Han JH, Hashimoto T, Hide W, Hofmann O, Kamburov A, Kaur M, Kawaji H, Kubosaki A, Lassmann T, van NE, MacPherson CR, Ogawa C, Radovanovic A, Schwartz A, Teasdale RD, Tegner J, Lenhard B, Teichmann SA, Arakawa T, Ninomiya N, Murakami K, Tagami M, Fukuda S, Imamura K, Kai C, Ishihara R, Kitazume Y, Kawai J, Hume DA, Ideker T, Hayashizaki Y (2010) An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* 140:744-752

Rosnet O, Birnbaum D (1993) Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. *Crit Rev. Oncog.* 4:595-613

Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, Okita H, Katagiri YU, Saito M, Shimizu T, Fujimoto J, Kiyokawa N (2008) B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells. *Immunology* 125:570-590

Samanta J, Kessler JA (2004) Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development* 131:4131-4142

Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS (2004) Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:1892-1897

Schadt EE, Linderman MD, Sorenson J, Lee L, Nolan GP (2010) Computational solutions to large-scale data management and analysis. *Nat. Rev. Genet.* 11:647-657

Schittenhelm MM, Yee KW, Tyner JW, McGreevey L, Haley AD, Town A, Griffith DJ, Bainbridge T, Brazier RM, O'Farrell AM, Cherrington JM, Heinrich MC (2006) FLT3 K663Q is a novel AML-associated oncogenic kinase: Determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248). *Leukemia* 20:2008-2014

Schmidt-Arras D, Schwable J, Bohmer FD, Serve H (2004) Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Curr. Pharm. Des* 10:1867-1883

Schwable J, Choudhary C, Thiede C, Tickenbrock L, Sargin B, Steur C, Rehage M, Rudat A, Brandts C, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H (2005) RGS2 is an important target gene of Flt3-ITD mutations in AML and functions in myeloid differentiation and leukemic transformation. *Blood* 105:2107-2114

Scupoli MT, Pizzolo G (2012) Signaling pathways activated by the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Expert. Rev. Hematol.* 5:341-348

Shaffer AL, Rosenwald A, Hurt EM, Giltnane JM, Lam LT, Pickeral OK, Staudt LM (2001) Signatures of the immune response. *Immunity.* 15:375-385

Shaffer AL, Wright G, Yang L, Powell J, Ngo V, Lamy L, Lam LT, Davis RE, Staudt LM (2006) A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunol. Rev.* 210:67-85

Shan D, Ledbetter JA, Press OW (2000) Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 48:673-683

- Sharma M, Ravandi F, Bayraktar UD, Chiattono A, Bashir Q, Giralt S, Chen J, Qazilbash M, Kebriaei P, Konopleva M, Andreeff M, Cortes J, McCue D, Kantarjian H, Champlin RE, de LM (2011) Treatment of FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic stem cell transplantation with sorafenib. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17:1874-1877
- Shav-Tal Y, Zipori D (2002) The role of activin a in regulation of hemopoiesis. *Stem Cells* 20:493-500
- Sledz CA, Williams BR (2004) RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 32:952-956
- Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Buske C, Schnittger S, Kelly LM, Gilliland DG, Hiddemann W (2003) The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* 101:1494-1504
- Starkova J, Gadgil S, Qiu YH, Zhang N, Hermanova I, Kornblau SM, Drabkin HA (2011) Up-regulation of homeodomain genes, DLX1 and DLX2, by FLT3 signaling. *Haematologica* 96:820-828
- Stirewalt DL, Radich JP (2003) The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 3:650-665
- Su GH, Chen HM, Muthusamy N, Garrett-Sinha LA, Baunoch D, Tenen DG, Simon MC (1997) Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *EMBO J.* 16:7118-7129
- Su Y, Vilgelm AE, Kelley MC, Hawkins OE, Liu Y, Boyd KL, Kantrow S, Splittgerber RC, Short SP, Sobolik T, Zaja-Milatovic S, Dahlman KB, Amiri KI, Jiang A, Lu P, Shyr Y, Stuart DD, Levy S, Sosman JA, Richmond A (2012) RAF265 inhibits the growth of advanced human melanoma tumors. *Clin. Cancer Res.* 18:2184-2198
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:15545-15550
- Sullivan RJ, Flaherty KT (2013) Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur. J. Cancer* 49:1297-1304
- Tam WF, Gilliland DG (2008) Can FLT3 inhibitors overcome resistance in AML? *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 21:13-20
- Tripathi S, Christie KR, Balakrishnan R, Huntley R, Hill DP, Thommesen L, Blake JA, Kuiper M, Laegreid A (2013) Gene Ontology annotation of sequence-specific DNA binding transcription factors: setting the stage for a large-scale curation effort. *Database. (Oxford)* 2013:-bat062
- Tse KF, Mukherjee G, Small D (2000) Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 14:1766-1776
- Tyner JW, Yang WF, Bankhead A, III, Fan G, Fletcher LB, Bryant J, Glover JM, Chang BH, Spurgeon SE, Fleming WH, Kovacovics T, Gotlib JR, Oh ST, Deininger MW, Zwaan CM, Den Boer ML, van den Heuvel-Eibrink MM, O'Hare T, Druker BJ, Loriaux MM (2013) Kinase pathway dependence in primary human leukemias determined by rapid inhibitor screening. *Cancer Res.* 73:285-296
- Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:1663-1667
- Vlachos P, Nyman U, Hajji N, Joseph B (2007) The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cell Death. Differ.* 14:1497-1507

Volkening M, Hoffmann I (2005) Involvement of human MCM8 in prereplication complex assembly by recruiting hcdc6 to chromatin. *Mol. Cell Biol.* 25:1560-1568

Wakabayashi C, Adachi T, Wienands J, Tsubata T (2002) A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science* 298:2392-2395

Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW (2010) When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid. Redox. Signal.* 13:1649-1663

Waldschmidt TJ, Tygrett LT (1992) The low affinity IgE Fc receptor (CD23) participates in B cell activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 323:149-156

Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK, Glennie MJ, Cragg MS (2008) Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 283:16971-16984

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10:57-63

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411:834-842

Wolf U, Barnes B, Bertz J, Haberland J, Laudi A, Stocker M, Schonfeld I, Kraywinkel K, Kurth BM (2011) [The (German) Center for Cancer Registry Data (ZfKD) at the Robert Koch Institute (RKI) in Berlin]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 54:1229-1234

Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, Rajeev KG, Nakayama T, Charrise K, Ndungo EM, Zimmermann T, Koteliensky V, Manoharan M, Stoffel M (2007) Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 25:1149-1157

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kadera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97:2434-2439

Yee KW, Schittenhelm M, O'Farrell AM, Town AR, McGreevey L, Bainbridge T, Cherrington JM, Heinrich MC (2004) Synergistic effect of SU11248 with cytarabine or daunorubicin on FLT3 ITD-positive leukemic cells. *Blood* 104:4202-4209

Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, Naoe T (1997) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 11:1605-1609

Yu J, Ershler M, Yu L, Wei M, Hackanson B, Yokohama A, Mitsui T, Liu C, Mao H, Liu S, Liu Z, Trotta R, Liu CG, Liu X, Huang K, Visser J, Marcucci G, Plass C, Belyavsky AV, Caligiuri MA (2009) TSC-22 contributes to hematopoietic precursor cell proliferation and repopulation and is epigenetically silenced in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 113:5558-5567

Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, Bassini A, Papa S, Alnemri ES, Guidotti L, Vitale M, Zauli G (2000) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood* 95:3716-3724

Zaragosi LE, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, Bourlier V, Mohsen-Kanson T, Ladoux A, Elabd C, Scheideler M, Trajanoski Z, Takashima Y, Amri EZ, Lacasa D, Sengenès C, Ailhaud G, Clement K, Bouloumie A, Kirkland JL, Dani C (2010) Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 59:2513-2521

Zauli G, Celeghini C, Melloni E, Voltan R, Ongari M, Tiribelli M, di Iasio MG, Lanza F, Secchiero P (2012) The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of FLT3 and p53 status. *Haematologica* 97:1722-1730

- Zenke M, Hieronymus T (2006) Molecular switches and developmental potential of adult stem cells. Ernst. Schering. Res. Found. Workshop69-79
- Zhang DE, Hohaus S, Voso MT, Chen HM, Smith LT, Hetherington CJ, Tenen DG (1996) Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 211:137-147
- Zhang J, Chen YL, Ji G, Fang W, Gao Z, Liu Y, Wang J, Ding X, Gao F (2013) Sorafenib Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition through an Epigenetic-Based Mechanism in Human Lung Epithelial Cells. *PLoS. One.* 8:-e64954
- Zhang W, Konopleva M, Shi YX, McQueen T, Harris D, Ling X, Estrov Z, Quintas-Cardama A, Small D, Cortes J, Andreeff M (2008) Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 100:184-198
- Zhao W, Zhang T, Qu B, Wu X, Zhu X, Meng F, Gu Y, Shu Y, Shen Y, Sun Y, Xu Q (2011) Sorafenib induces apoptosis in HL60 cells by inhibiting Src kinase-mediated STAT3 phosphorylation. *Anticancer Drugs* 22:79-88
- Zheng R, Friedman AD, Small D (2002) Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations. *Blood* 100:4154-4161
- Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, Beran M, Zhu Z, Ludwig D, Hicklin D, Witte L, Li Y, Small D (2004) FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 103:267-274
- Zheng R, Small D (2005) Mutant FLT3 signaling contributes to a block in myeloid differentiation. *Leuk. Lymphoma* 46:1679-1687
- Zhou D, Zhong S, Ye JJ, Quach KM, Johnson DL, Chen S (2007) PNRC is a unique nuclear receptor coactivator that stimulates RNA polymerase III-dependent transcription. *J. Mol. Signal.* 2:-5
- Zhu W, Ukomadu C, Jha S, Senga T, Dhar SK, Wohlschlegel JA, Nutt LK, Kornbluth S, Dutta A (2007) Mcm10 and And-1/CTF4 recruit DNA polymerase alpha to chromatin for initiation of DNA replication. *Genes Dev.* 21:2288-2299
- Zimmermann M, Arachchige-Don AS, Donaldson MS, Dallapiazza RF, Cowan CE, Horne MC (2012) Elevated cyclin g2 expression intersects with DNA damage checkpoint signaling and is required for a potent g2/m checkpoint arrest response to Doxorubicin. *J. Biol. Chem.* 287:22838-22853

9 Appendix

9.1 Ermittlung der zellulären IC₅₀ der Inhibitoren auf MV4;11 und RS4;11-Zellen

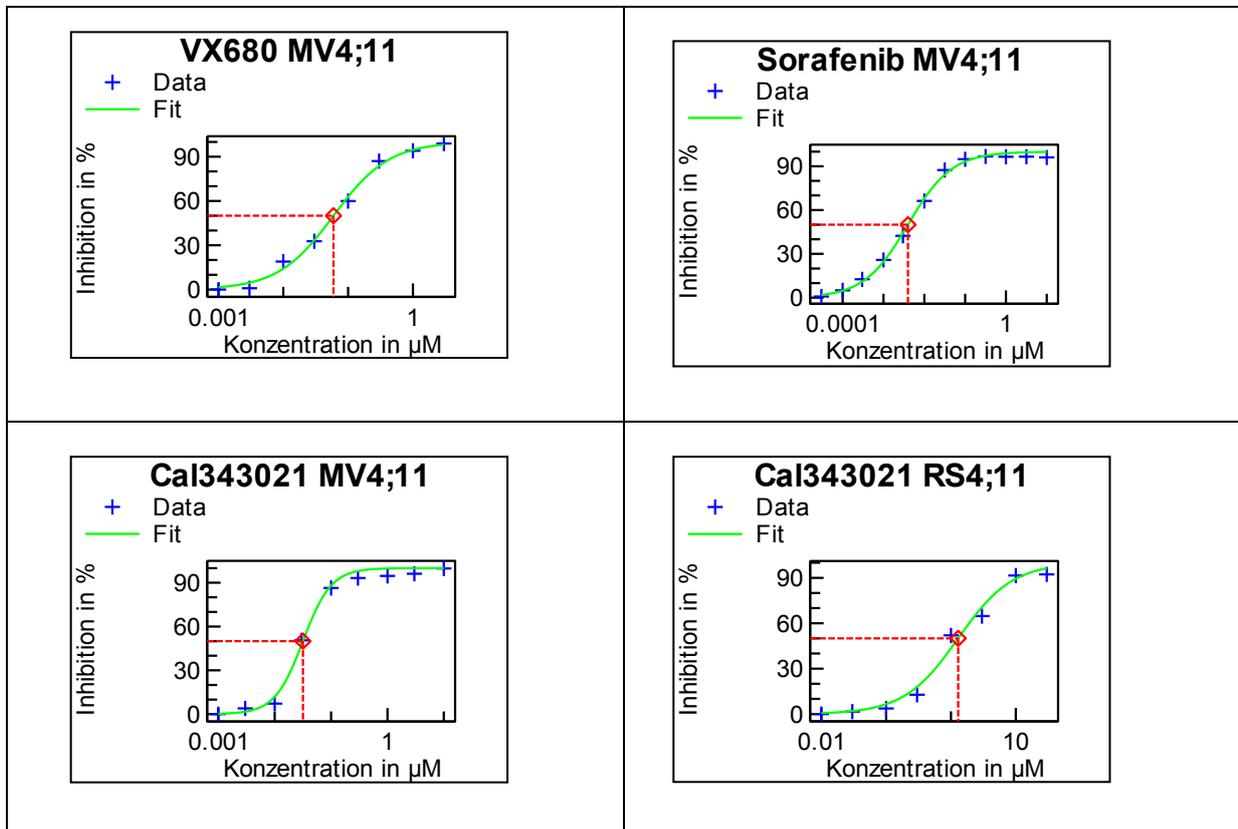


Abbildung 9.1-1 Beispiele für die Ermittlung von IC₅₀-Werten

9.2 Listen der Genexpressionsprofilierung (downstream)

9.2.1 Differentiell exprimierte Gene in der Zelllinie RS4;11 (FLT3-Wildtyp) nach Behandlung mit der FLT3-siRNAs

Tabelle 9.2-1 Expressionsänderungen aller Gene in RS4;11 nach 24-stündiger FLT3-siRNA-Behandlung

Angegeben ist der *Change factor*: 1 entspricht einer Verdopplung des Signals, -1 entspricht einer Halbierung des Signals

Gen-Symbol	AFFY-ID	CHGF RF zu Kontrolle (Luc.- siRNA.)	CHGF RF zu FLT3-siRNA 1	CHGF RF zu FLT3-siRNA 2	CHGF RF zu FLT3-siRNA 4
ATP6V1A	201972_at	-0.1	0.0	-1.4	0.0
CANX	208852_s_at	0.0	0.1	-1.1	-0.1
FLT3	206674_at	-0.2	-3.4	-3.3	-3.2
SNX11	53912_at	1.0	0.4	0.7	0.3
TNPO1	209226_s_at	-0.1	0.0	0.0	-1.5
WDR61	232075_at	0.0	-0.4	-0.6	-1.4
ZAK	225665_at	0.0	0.0	-2.3	-0.1

RF = „RISC free“ Kontroll-siRNA

9.2.2 MV4;11 und FLT3-siRNAs (Behandlungsdauer 24 Stunden)

Tabelle 9.2-2: Veränderung der Expression von Genen bei MV4;11 durch 24-stündige Behandlung sowohl durch FLT3- als auch durch ACD-siRNAs

(„Schnittmenge“; Angegeben ist der *Change factor*: 1 entspricht einer Verdopplung des Signals, -1 entspricht einer Halbierung des Signals)

Symbol	AFFY-ID	ACD	FLT3-10	FLT3-11	FLT3-12	LUC-OTP	FLT3-1	FLT3-2	FLT3-4	LUC
ATAD2	222740_at	-2.9	-3.8	-2.6	-3.3	-0.2	-1.6	-2.0	-2.0	-0.1
AXL	202686_s_at	2.1	4.2	4.1	4.2	0.1	3.7	2.9	3.2	0.2
BRCA1	204531_s_at	-4.2	-2.2	-3.0	-2.3	0.0	-1.2	-1.9	-1.6	-0.1
CASP8AP2	222201_s_at	-1.4	-1.0	-1.1	-1.2	0.0	-1.0	-1.3	-1.5	0.0
CBX5	209715_at	-1.3	-1.2	-1.7	-1.8	-0.1	-1.2	-1.6	-1.9	0.1
CCDC99	221685_s_at	-2.6	-2.3	-2.5	-2.4	0.0	-1.0	-1.3	-1.2	0.0
CCNE2	205034_at	-5.3	-3.5	-4.6	-4.4	0.0	-2.4	-2.8	-2.5	0.0
CD44	1557905_s_at	1.4	1.3	1.4	1.3	0.1	1.1	1.2	1.4	-0.1
CDC25A	204695_at	-4.4	-2.3	-3.6	-2.1	0.1	-1.3	-1.4	-1.5	-0.1
CDC6	203967_at	-3.7	-3.2	-3.8	-3.6	0.0	-1.6	-2.5	-2.0	-0.1
CDT1	228868_x_at	-3.2	-2.8	-2.9	-2.6	-0.2	-1.2	-1.7	-1.5	0.1
CENPK	222848_at	-4.6	-2.9	-3.1	-2.6	-0.1	-1.2	-1.8	-1.5	0.0
CENPM	218741_at	-3.9	-2.9	-4.6	-3.6	-0.1	-1.7	-2.0	-2.1	0.1
CEP55	218542_at	-4.8	-3.1	-3.5	-2.8	-0.1	-1.2	-2.1	-1.6	-0.1
CHAC2	235117_at	-1.5	-1.5	-1.4	-1.9	0.0	-1.7	-1.6	-2.2	0.1
CHAF1A	203975_s_at	-1.6	-1.2	-1.6	-1.1	-0.2	-0.9	-1.6	-2.0	0.0
CKS1B	201897_s_at	-2.1	-2.3	-2.6	-2.6	-0.1	-1.0	-1.6	-1.4	0.0
DEPDC1B	226980_at	-6.7	-3.7	-3.2	-4.0	0.0	-1.4	-2.0	-1.8	0.0
DHFR	202534_x_at	-5.0	-1.8	-1.9	-1.7	-0.1	-1.3	-1.4	-1.7	0.0
DSCC1	219000_s_at	-5.3	-3.0	-2.8	-3.3	-0.1	-1.7	-2.4	-2.0	0.0
DTL	218585_s_at	-4.5	-3.4	-4.0	-3.4	0.0	-2.2	-3.5	-2.8	0.0
DTYMK	203270_at	-2.4	-1.8	-2.8	-2.0	-0.1	-1.4	-1.9	-2.5	0.1
E2F7	228033_at	-1.2	-2.1	-2.1	-1.9	0.1	-1.1	-1.2	-1.4	0.0
E2F8	219990_at	-11.2	-4.3	-5.6	-4.6	-0.1	-2.1	-2.8	-2.6	0.0
ESCO2	235178_x_at	-10.2	-3.5	-2.8	-2.7	-0.2	-1.2	-1.8	-1.5	-0.1
FADS1	208962_s_at	-1.1	-2.2	-1.9	-2.3	0.0	-1.7	-1.9	-1.8	0.0
FAM54A	228069_at	-2.7	-2.7	-2.7	-3.0	-0.1	-1.2	-1.9	-1.8	0.1
FANCI	213007_at	-4.1	-2.0	-2.2	-2.1	0.0	-1.1	-1.3	-1.2	0.0
FEN1	204767_s_at	-2.5	-2.1	-3.3	-2.4	0.0	-1.1	-1.8	-1.9	0.1
FIGL1	222843_at	-2.1	-1.7	-2.2	-2.0	0.0	-1.2	-1.3	-1.6	0.0
GINS1	206102_at	-5.2	-2.8	-3.1	-2.7	0.0	-1.8	-2.2	-2.5	0.0

GINS2	221521_s_at	-4.5	-2.6	-3.5	-3.2	-0.1	-1.6	-2.2	-2.1	0.0
GINS3	45633_at	-2.7	-2.4	-2.6	-2.5	-0.1	-1.2	-1.6	-1.8	0.0
H2AFX	205436_s_at	-2.0	-1.5	-2.0	-1.8	0.0	-1.1	-2.0	-2.0	0.0
HELLS	223556_at	-7.0	-2.9	-2.8	-3.2	0.0	-1.5	-2.2	-1.7	0.1
INCENP	242787_at	-2.0	-1.8	-1.9	-2.3	-0.1	-1.4	-1.1	-1.4	0.1
ISOC1	218170_at	-1.0	-1.5	-1.3	-1.7	0.1	-1.1	-1.4	-1.3	0.0
MCM10	220651_s_at	-4.6	-2.8	-2.9	-2.6	-0.1	-1.1	-1.5	-1.4	0.0
MCM2	202107_s_at	-2.4	-1.9	-2.4	-2.6	0.0	-1.3	-2.2	-1.8	-0.1
MCM4	222037_at	-4.3	-2.4	-2.8	-2.6	0.0	-2.0	-2.5	-2.3	-0.1
MCM6	238977_at	-2.5	-2.6	-1.9	-1.9	-0.1	-1.7	-1.5	-1.5	0.0
MCM8	224320_s_at	-4.0	-2.1	-2.1	-1.7	-0.2	-1.2	-1.8	-1.8	0.0
MELK	204825_at	-3.7	-2.1	-2.7	-2.5	0.1	-1.1	-1.6	-1.2	0.0
MYBL2	201710_at	-3.7	-2.2	-2.6	-2.0	-0.1	-2.1	-3.3	-2.0	0.0
NCAPG	218663_at	-4.2	-2.9	-3.3	-2.4	-0.1	-1.1	-2.1	-1.0	-0.3
NDC80	204162_at	-6.7	-3.0	-3.7	-2.8	-0.1	-1.0	-1.5	-1.2	0.0
NUDT15	219347_at	-1.1	-1.4	-1.6	-2.0	-0.3	-1.2	-1.2	-1.5	0.1
PIGW	1558292_s_at	-1.0	-1.2	-1.3	-1.6	-0.1	-1.3	-1.6	-1.9	0.1
PLK4	204886_at	-7.2	-3.1	-4.1	-3.5	0.0	-1.9	-2.6	-2.7	-0.1
POLE2	205909_at	-2.8	-2.2	-2.8	-2.6	0.0	-1.4	-2.2	-2.0	0.0
POLQ	219510_at	-3.4	-1.7	-2.5	-2.4	0.0	-1.2	-1.7	-1.5	-0.1
PSIP1	205961_s_at	-1.6	-1.4	-1.3	-1.9	0.0	-1.1	-1.0	-1.1	0.0
RAD51AP1	204146_at	-4.5	-2.8	-2.9	-2.7	0.1	-1.3	-1.9	-1.9	0.0
RAD54B	219494_at	-2.3	-1.6	-2.1	-2.0	0.1	-1.1	-1.6	-1.9	0.1
RECQL4	213520_at	-2.2	-1.4	-2.5	-2.0	0.0	-1.4	-3.6	-1.8	-0.1
RFC5	203209_at	-2.8	-1.8	-2.7	-2.2	0.0	-1.1	-1.4	-1.1	-0.1
SIVA1	210792_x_at	-1.4	-1.9	-2.0	-2.2	-0.1	-1.5	-1.3	-2.0	0.1
SLC7A11	209921_at	5.7	1.1	2.3	2.1	0.1	1.9	2.3	2.8	-0.1
SPC25	209891_at	-6.7	-4.0	-3.7	-3.1	-0.2	-1.2	-1.7	-1.7	0.1
TIPIN	219258_at	-2.3	-2.1	-2.3	-2.4	-0.1	-1.1	-1.5	-1.6	0.0
TOP2A	201291_s_at	-4.2	-2.8	-3.1	-3.0	-0.1	-1.3	-2.1	-1.9	-0.1
TTF2	204407_at	-1.2	-2.6	-1.4	-3.1	-0.3	-1.2	-1.3	-1.7	0.2
UBE2T	223229_at	-2.4	-1.6	-1.9	-1.9	0.0	-1.3	-1.6	-2.0	0.1
WDHD1	204727_at	-4.0	-3.1	-3.2	-2.8	0.0	-1.6	-3.1	-2.0	0.0
ZNF367	229551_x_at	-8.6	-2.6	-3.5	-2.7	0.0	-1.8	-2.5	-2.1	0.0

Tabelle 9.2-3 Veränderung der Expression von Genen bei MV4;11, die durch 24-stündige Behandlung mit allen FLT3-siRNAs (aber nicht durch ACD-siRNAs) übereinstimmend dereguliert wurden („FLT3-Inhibitionsmuster - 24 Stunden“)

Angegeben ist der *Change factor*: 1 entspricht einer Verdopplung des Signals, -1 entspricht einer Halbierung des Signals

Symbol	AFFY-ID	ACD	FLT3-10	FLT3-11	FLT3-12	LUC-OTP	FLT3-1	FLT3-2	FLT3-4	LUC
ABCA7	219577_s_at	0.2	1.7	2.2	2.2	0.1	1.9	1.5	1.6	-0.1
AHNAK	211986_at	0.3	1.8	2.2	2.0	-0.1	1.5	1.9	1.8	0.1
ANKRD9	230972_at	-0.2	-1.1	-1.2	-1.3	0.0	-1.2	-1.6	-2.0	0.1
ARRB1	222912_at	0.2	-1.5	-1.4	-1.9	0.0	-1.4	-1.5	-1.8	0.0
ATAD3A	1552641_s_at	0.2	-1.9	-1.5	-3.2	0.0	-2.6	-4.9	-4.4	0.0
BMF	226530_at	-0.2	1.7	1.6	1.9	0.1	1.7	1.9	1.7	-0.1
CALR	200935_at	0.5	-1.3	-1.4	-2.3	0.1	-1.2	-1.3	-2.3	-0.1
CCR5	206991_s_at	-0.6	2.9	1.7	2.3	0.2	1.1	1.3	1.7	-0.4
CD151	204306_s_at	0.4	-2.0	-2.4	-1.9	0.1	-3.5	-1.7	-3.9	-0.1
CDKN1C	216894_x_at	0.5	5.0	4.0	4.9	0.0	3.0	2.3	2.1	-0.1
CFP	206380_s_at	-0.4	1.1	1.1	1.3	0.4	1.4	2.3	1.3	0.1
COL24A1	238732_at	-0.8	1.7	2.3	2.6	0.1	1.9	2.4	2.0	0.1
CSF1R	203104_at	0.2	1.6	2.1	1.4	0.2	2.4	2.6	1.8	0.2
CSPG5	39966_at	-0.9	-2.2	-2.9	-2.1	0.0	-1.8	-1.7	-2.5	0.2
CYTH4	219183_s_at	0.3	1.2	1.2	1.3	0.2	1.1	1.3	1.0	-0.1
DDX58	242961_x_at	-0.2	1.1	1.3	1.7	0.1	1.2	1.1	1.8	0.0
DNASE2	209831_x_at	-0.2	1.2	1.5	1.4	0.0	1.9	1.9	2.5	0.2
DPEP2	219452_at	-0.7	4.2	3.8	4.1	0.4	2.4	2.4	2.9	-0.1
DUSP6	208892_s_at	-0.2	-1.1	-1.0	-1.8	0.2	-1.3	-2.6	-2.3	0.1
EFHC1	225656_at	-0.7	1.4	1.3	1.7	-0.4	1.8	1.8	1.9	0.0
EFHC1	219833_s_at	-0.4	1.5	1.9	2.3	0.1	1.7	2.7	2.4	0.1
EXOSC3	223490_s_at	-0.1	-1.0	-1.0	-1.3	0.0	-1.0	-1.2	-1.6	0.0
FABP5	202345_s_at	-0.2	-1.3	-1.3	-1.9	0.0	-1.4	-1.8	-1.9	0.0
FKSG49	211454_x_at	0.2	1.7	1.3	3.4	0.0	1.6	1.7	1.8	0.0
FKSG49	224288_x_at	0.4	1.6	1.3	2.9	0.0	1.4	1.3	2.0	0.2
FRMD4A	225163_at	0.1	2.1	1.8	2.5	-0.2	1.7	2.5	2.5	0.1
GALK1	204374_s_at	-1.0	-1.3	-1.4	-1.4	0.0	-2.9	-2.6	-3.7	0.0
GCAT	205164_at	0.3	-1.5	-2.5	-2.9	0.1	-7.3	-2.3	-1.9	-0.1
GCH1	204224_s_at	0.9	-1.1	-1.4	-1.8	-0.4	-1.4	-1.7	-1.9	-0.1
GMPPB	219920_s_at	-0.5	-1.6	-1.1	-1.8	0.1	-1.0	-1.0	-1.4	0.0
H1FO	208886_at	0.0	2.4	2.3	2.1	0.0	2.5	1.8	3.1	0.1
HIST1H2AC	215071_s_at	0.1	5.5	6.9	7.2	0.1	4.9	5.1	6.1	0.0

HIST1H2AG	207156_at	-0.3	2.2	2.2	2.1	-0.1	1.5	2.0	1.1	0.0
HIST1H2BD	209911_x_at	-0.5	3.5	3.9	4.3	0.1	2.6	2.5	3.2	-0.1
HIST1H2BE	208527_x_at	-0.7	1.3	1.3	1.5	0.1	1.1	1.2	1.4	0.3
HLA-DRA	210982_s_at	-3.6	2.7	1.6	3.2	0.6	2.2	2.0	3.0	-0.2
HLA-E	200904_at	-0.6	1.7	1.7	1.8	0.2	1.7	2.1	2.3	0.1
HSPA4L	205543_at	0.1	-1.3	-1.3	-1.3	0.0	-1.2	-1.8	-1.7	0.0
HSPH1	208744_x_at	1.0	-1.8	-1.6	-1.8	0.0	-1.5	-1.6	-1.4	0.0
HTR2B	206638_at	-1.8	2.0	1.2	1.9	0.3	1.9	2.7	2.1	0.1
ID2	213931_at	0.9	4.2	3.1	7.2	0.3	5.7	3.1	4.2	-0.1
IGF1	211577_s_at	-0.8	4.3	3.7	5.1	0.4	5.1	2.9	2.7	0.1
IGFBP2	202718_at	0.0	-2.3	-3.3	-4.0	-0.2	-2.1	-3.0	-3.1	0.1
IL18	206295_at	-0.8	2.0	1.6	2.7	0.1	1.0	1.6	1.4	-0.1
IL7R	205798_at	1.4	-1.3	-2.8	-1.6	0.3	-1.7	-2.9	-2.3	-0.1
INHBA	210511_s_at	0.8	-1.4	-1.4	-2.0	-0.1	-1.8	-2.4	-1.9	0.0
IVNS1ABP	201363_s_at	-0.5	-1.3	-1.2	-1.8	-0.3	-1.1	-1.8	-1.3	0.0
KIT	205051_s_at	-4.4	1.7	1.3	1.9	0.0	2.6	2.1	2.0	-0.1
LAPTM4B	214039_s_at	0.5	-1.7	-1.8	-2.4	0.1	-1.6	-2.0	-2.1	0.1
LMNB2	216952_s_at	-0.7	-1.4	-1.4	-2.2	-0.1	-1.1	-1.4	-1.9	0.0
LY6E	202145_at	0.9	-1.3	-1.2	-2.1	0.1	-4.5	-4.7	-6.9	-0.1
MAP4K1	214339_s_at	-0.5	1.1	1.1	1.1	-0.2	1.3	1.5	2.1	0.0
METRNL	232269_x_at	-0.3	-1.2	-2.4	-2.4	0.1	-1.8	-1.5	-2.2	0.1
NPM3	205129_at	-1.0	-1.2	-1.0	-1.5	-0.1	-1.1	-1.6	-1.6	0.1
PIM1	209193_at	-0.5	-1.9	-2.4	-3.0	0.2	-2.9	-2.8	-3.7	0.1
PMP22	210139_s_at	0.2	-2.1	-2.1	-2.1	0.2	-1.7	-2.0	-1.6	0.0
PRDX4	201923_at	-0.4	-1.1	-1.1	-1.6	0.0	-1.1	-1.5	-1.9	0.0
PRNP	201300_s_at	1.1	-1.6	-2.0	-2.1	-0.1	-1.7	-1.8	-1.3	0.0
PSAT1	223062_s_at	-0.8	-1.5	-1.4	-1.8	0.0	-1.1	-1.4	-1.3	0.1
PTPRN2	203029_s_at	0.1	1.5	2.6	2.1	0.0	1.1	1.6	1.2	-0.2
PYCR1	218944_at	-0.5	-1.7	-1.5	-4.3	0.1	-3.7	-4.6	-4.3	0.0
RANBP1	202483_s_at	-0.1	-1.1	-1.4	-1.5	0.0	-1.3	-1.8	-2.4	0.0
RASEF	1553185_at	0.5	3.1	3.2	4.4	0.1	2.9	2.5	3.7	-0.1
RIN3	219457_s_at	0.5	2.1	2.4	2.4	0.2	1.7	1.8	2.3	0.2
RUVBL1	201614_s_at	-0.1	-1.4	-1.0	-1.8	-0.1	-1.5	-1.6	-1.6	0.1
SCD5	220232_at	0.2	2.5	2.0	4.8	-0.1	3.3	2.1	3.5	-0.1
SDK2	242064_at	-0.5	1.9	2.4	2.2	-0.3	1.1	1.4	1.2	0.1
SERPINF1	202283_at	-0.9	1.9	1.9	2.0	0.2	1.9	1.9	2.0	0.0
SH3GL3	211565_at	0.6	2.8	2.2	4.9	0.0	2.5	2.3	2.7	0.3
SLC25A16	210686_x_at	0.1	1.5	1.4	2.4	0.0	2.7	2.9	3.9	-0.1

SORL1	203509_at	0.3	2.9	3.0	3.2	-0.1	1.9	1.4	2.1	0.0
STK17B	226525_at	1.5	-1.2	-1.3	-2.0	0.0	-1.4	-1.8	-1.3	0.1
STON1	213413_at	-0.4	-1.0	-1.2	-1.2	0.0	-1.1	-1.5	-1.2	0.0
TAF5	210053_at	-0.6	-1.3	-1.5	-1.5	0.0	-1.1	-1.0	-1.1	0.0
TBC1D3C	209403_at	0.4	1.3	1.7	1.7	0.1	1.3	1.3	1.5	-0.1
TFDP1	242939_at	-0.3	-2.2	-2.6	-2.6	-0.1	-1.3	-2.2	-1.8	0.1
TMEM64	225974_at	-0.1	-1.2	-1.2	-1.9	-0.1	-1.1	-1.4	-1.2	0.1
TRIM4	224159_x_at	0.2	2.0	1.7	2.9	0.0	2.0	1.6	2.5	0.0
TSC22D3	208763_s_at	0.2	1.6	2.1	1.9	0.0	1.9	2.2	2.3	0.0
TUBA4A	212242_at	0.2	-1.5	-1.4	-1.6	-0.1	-1.3	-1.8	-1.8	0.0
TXNIP	201008_s_at	0.2	1.7	2.0	1.8	0.3	1.1	1.3	1.3	-0.3
UBE2S	202779_s_at	-0.1	-1.2	-1.4	-1.6	0.0	-1.1	-1.6	-2.0	0.0
YPEL3	223179_at	0.2	2.5	2.7	3.9	0.2	3.2	3.1	2.8	0.1
ZNF277	1555193_a_at	0.3	1.1	2.0	1.3	0.2	1.4	1.7	1.7	0.0
ZNF673	206583_at	-0.1	2.0	2.0	3.0	0.4	1.3	2.0	1.6	-0.1

Tabelle 9.2-4 Gene, die bei MV4;11 nur durch ACD-siRNAs (aber nicht durch FLT3-siRNAs) 24 Stunden nach Transfektion dereguliert wurden

Symbol	AFFY-ID	ACD	FLT3 -10	FLT3 -11	FLT3 -12	LUC- OTP	FLT3 -1	FLT3 -2	FLT3 -4	LUC
AATK	205986_at	2.3	0.4	0.8	0.7	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
ABHD14B	224821_at	-1.8	0.1	0.3	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1
ABTB2	213497_at	4.1	0.3	0.6	0.5	-0.1	0.1	0.4	0.2	-0.2
ACSL1	207275_s_at	4.8	-0.3	-0.1	-0.6	0.1	-0.1	-0.3	-0.3	-0.1
ADA	204639_at	1.2	0.3	0.5	0.3	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0
ADRB2	206170_at	2.0	0.7	0.7	0.7	0.1	0.1	0.7	0.3	0.0
AGA	204333_s_at	-1.9	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0
AIM1	212543_at	-1.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.6	0.0
AKR1C1	204151_x_at	2.2	-1.2	-1.0	-0.7	-0.1	-0.6	-0.5	-0.4	-0.1
ALAS1	205633_s_at	1.0	0.1	0.1	-0.1	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
ALG10B	228941_at	-2.2	-0.5	-0.3	-0.2	-0.1	-0.3	-0.3	-0.2	0.1
ALKBH2	225625_at	-1.3	-0.1	0.0	-0.3	-0.1	-0.3	-0.3	-0.3	0.0
AMY1A	208498_s_at	-1.0	0.6	0.9	0.9	0.7	0.3	0.6	0.7	-0.1
ANKRD22	238439_at	1.5	-2.4	-1.8	-2.1	0.2	-1.9	-1.4	-1.5	0.1
ANPEP	202888_s_at	3.1	0.4	0.6	0.8	0.0	0.3	0.4	0.2	-0.1
AP1S3	237159_x_at	1.3	-0.6	-0.9	-1.1	-0.1	-1.2	-0.7	-2.2	-0.2
APLP2	214875_x_at	1.2	0.2	0.5	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.0	-0.2
ARRDC4	225283_at	1.3	0.6	0.8	0.4	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1
ARSB	232197_x_at	-1.5	-0.1	-0.4	-0.4	0.1	0.1	0.0	-0.2	0.0
ASCC3	231269_at	1.1	-0.4	-0.5	-0.4	0.2	-0.7	-0.6	-0.7	0.0
ASPHD2	227015_at	1.4	0.2	0.2	0.2	0.0	0.1	0.0	-0.1	-0.2
BAG3	217911_s_at	1.5	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.0	-0.1	-0.1
BAIAP2	205294_at	1.9	0.2	0.3	0.2	0.1	0.5	0.1	0.3	0.1
BLVRA	203773_x_at	1.5	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.2	0.2	0.2	0.0
BNIP3	201849_at	1.0	-0.3	0.3	-0.2	0.1	-0.4	-0.2	-0.4	0.2
BTG2	201236_s_at	2.5	0.5	0.4	0.7	0.0	0.7	0.5	0.7	-0.1
BTN3A3	204820_s_at	-1.5	0.3	0.3	0.2	0.2	-0.1	0.2	0.2	0.1
C5	205500_at	-3.9	0.4	0.1	0.4	-0.1	0.4	0.7	0.5	0.0
CABLES2	226004_at	-1.1	-0.4	-0.1	-0.4	0.0	-0.3	-0.3	-0.2	0.0
CARD16	1552701_a_at	-1.1	0.1	0.1	0.1	0.3	-0.1	0.1	0.0	-0.1
CASP1	206011_at	-1.2	0.3	0.4	0.4	0.2	0.3	0.5	0.2	0.1
CASP6	209790_s_at	-1.3	-0.2	-0.3	-0.3	0.1	0.0	-0.1	-0.4	0.0
CCDC111	227157_at	-1.9	-0.2	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
CCDC14	225017_at	-1.2	-0.2	-0.1	-0.1	0.0	-0.2	-0.1	-0.2	0.0
CCL23	210548_at	-1.2	0.0	0.3	0.1	0.2	-0.1	-0.2	-0.3	-0.2

CCNA1	205899_at	1.3	0.1	0.3	0.2	0.0	0.3	0.8	0.8	-0.1
CCND2	200951_s_at	2.0	-1.1	-0.7	-1.8	-0.2	-4.1	-2.5	-2.7	0.0
CD180	206206_at	-1.7	-0.4	-0.5	-0.8	0.1	-0.4	-0.1	-0.2	0.0
CD302	203799_at	-4.3	0.5	0.6	0.5	0.0	0.4	0.8	0.3	-0.1
CDC42EP3	209286_at	1.8	-0.2	-0.5	-0.4	0.4	-0.8	-0.8	-0.8	-0.1
CDCA7	230060_at	-2.1	0.1	0.2	0.5	-0.2	0.0	0.2	0.1	0.1
CDKN1A	202284_s_at	3.6	-0.8	-0.8	-1.2	0.1	-0.5	-0.6	-0.4	-0.1
CEP135	206003_at	-1.2	-0.5	-0.6	-0.6	0.0	-0.3	-0.4	-0.4	0.0
CEP152	239413_at	-1.4	-0.9	-0.5	-0.9	0.1	-0.3	-0.4	-0.6	-0.2
CEP57	209862_s_at	-1.0	-0.2	-0.1	-0.4	0.0	0.2	0.0	0.3	-0.1
CEP70	219036_at	-1.1	0.0	0.1	-0.1	-0.2	-0.1	0.0	-0.1	-0.1
CIDEB	221188_s_at	-1.5	-1.0	-0.8	-1.0	0.0	-0.4	-0.8	-0.5	0.0
CIT	212801_at	-1.6	-0.5	-0.6	-0.5	0.0	0.3	0.1	0.4	0.0
CKAP2	218252_at	-1.3	-0.8	-0.7	-1.0	-0.1	-0.5	-0.7	-0.6	-0.1
CKAP4	200999_s_at	2.7	-0.8	-1.0	-0.7	0.0	-0.3	-0.4	-0.5	-0.1
CKB	200884_at	1.0	0.3	0.8	0.6	-0.1	0.7	0.8	0.5	0.1
CLECL1	244413_at	-1.4	-0.3	-0.3	-0.3	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0
CMBL	227522_at	3.0	-0.6	-0.1	-0.8	-0.2	-1.9	-0.6	-1.1	-0.1
CMTM4	225009_at	1.3	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.1
COL27A1	225293_at	2.1	-0.2	-0.2	-0.3	-0.1	-0.2	-0.5	-0.6	0.0
COL4A2	211964_at	1.4	0.3	0.5	0.2	0.2	0.3	0.8	0.4	-0.1
COX15	235204_at	1.4	0.0	0.2	0.1	0.3	0.1	0.0	0.1	0.1
CRLF3	205474_at	-1.8	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	-0.3
CSNK1E	226858_at	1.4	-0.6	-0.4	-0.6	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
CTDSPL2	239133_at	-1.2	-0.4	-0.3	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	0.0
CTSC	201487_at	-1.1	-0.5	-0.3	-0.5	0.0	-0.5	-0.5	-0.5	0.0
CTSS	202902_s_at	-2.0	0.3	0.6	0.4	0.2	1.2	0.8	1.2	0.1
CYBRD1	222453_at	-1.2	0.7	0.7	0.6	0.1	0.7	0.6	1.3	0.0
CYFIP1	208923_at	1.2	0.2	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1
CYFIP2	215785_s_at	3.0	-0.7	-0.3	-1.3	0.0	-1.2	-0.7	-0.4	0.0
CYTIP	209606_at	4.1	-0.3	0.0	-0.3	0.1	-0.3	-0.3	-0.4	-0.1
DBN1	202806_at	1.1	-0.2	0.0	-0.7	-0.1	-0.8	-0.9	-1.5	0.0
DCUN1D4	212855_at	-1.2	-0.6	-0.3	-0.5	0.1	-0.7	-0.8	-0.6	-0.1
DDX11	213378_s_at	-1.9	-0.5	-0.5	-0.4	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.0
DEK	200934_at	-1.3	-0.9	-0.8	-0.8	0.0	-0.4	-0.4	-0.2	0.0
DENND1A	219763_at	1.3	-0.4	-0.5	-0.8	-0.1	-0.8	-0.7	-1.1	0.0
DENND5A	212561_at	1.5	0.6	0.6	0.5	-0.1	0.2	0.5	0.4	0.2
DGKQ	226605_at	1.6	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.0	-0.1	0.1
DHFRL1	241727_x_at	-1.2	-0.1	-0.3	-0.1	-0.3	0.1	0.1	0.1	0.2

DLG5	201681_s_at	1.3	-0.5	-0.3	-0.5	0.1	-0.8	-0.6	-0.5	-0.1
DLX2	207147_at	2.8	-0.4	-0.8	-0.8	0.1	-0.6	-1.2	-2.0	-0.1
DOCK6	55583_at	1.2	0.1	0.3	-0.1	0.0	-0.6	-0.4	-0.6	0.1
DSTYK	229017_s_at	1.0	0.5	0.2	0.4	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.1
EBAG9	204278_s_at	-1.0	-0.2	-0.3	-0.4	0.0	-0.3	-0.2	-0.2	0.1
EEF2K	225546_at	-1.5	-0.1	-0.3	-0.3	0.1	-0.4	-0.3	-0.4	0.2
EFCAB2	233375_at	-1.5	0.2	0.4	0.2	0.1	0.0	0.4	0.1	-0.1
EHD1	209037_s_at	1.2	-0.4	0.1	-0.3	0.1	-0.7	-0.4	-0.3	-0.2
ENPP2	209392_at	-1.6	0.1	-0.3	-0.3	0.2	-0.4	-0.7	-0.4	0.0
ERI2	213365_at	-1.0	-0.5	-0.5	-0.5	0.1	-0.4	-0.3	-0.4	0.0
FADS3	204257_at	2.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0
FAM120C	229512_at	-1.6	-0.2	-0.4	-0.3	-0.1	0.2	0.3	0.3	0.3
FAM129A	217967_s_at	1.3	-1.4	-1.3	-0.9	0.0	-0.8	-0.8	-0.8	-0.3
FAM178A	203482_at	-1.4	-0.2	-0.5	-0.5	0.0	-0.4	-0.4	-0.3	-0.2
FAM64A	221591_s_at	-1.9	-0.9	-1.0	-0.7	-0.1	-0.1	-0.3	-0.1	0.0
FANCA	203805_s_at	-1.9	-0.3	-0.2	-0.3	-0.2	0.1	0.1	0.1	0.0
FANCL	218397_at	-1.7	-0.7	-0.6	-0.7	0.0	-0.4	-0.4	-0.5	0.0
FAS	204780_s_at	1.9	-0.6	-0.4	-1.2	0.1	-0.6	-0.6	-0.9	-0.1
FBF1	1555288_s_at	-1.2	-1.0	-0.8	-0.7	0.0	-0.2	-0.5	-0.2	0.1
FBXO31	224162_s_at	1.2	0.1	-0.2	-0.3	0.1	-0.8	-3.3	-1.4	0.1
FCGR1A	216950_s_at	-1.1	-0.4	-0.3	-0.5	0.0	-0.2	-0.3	-0.3	0.0
FDXR	207813_s_at	2.0	-0.4	-0.6	-0.6	0.0	-0.4	-0.6	-0.7	0.0
FNDC3B	229865_at	2.4	-0.8	-0.7	-0.5	-0.2	-0.5	-0.7	-0.9	0.0
FOS	209189_at	1.5	0.1	0.1	-0.2	0.0	-0.3	-0.3	-0.6	0.2
FOXRED2	231846_at	-1.1	-0.5	-0.5	-0.4	-0.1	-0.1	0.0	-0.2	0.1
GADD45A	203725_at	1.3	-0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.4	-0.2	-0.2	0.0
GAS2L1	31874_at	1.6	-0.3	-0.2	-0.4	0.1	-0.4	-0.3	-0.3	0.0
GAS7	211067_s_at	1.4	0.2	0.4	0.3	0.0	0.2	0.1	0.4	-0.2
GATAD2A	218131_s_at	1.4	-0.4	-0.3	-1.3	0.6	-0.3	-0.5	-0.8	0.1
GCUD2	225834_at	-2.2	-1.8	-1.9	-1.7	0.0	-0.8	-1.1	-1.0	0.1
GEN1	228286_at	-1.0	-0.4	-0.2	-0.1	-0.1	-0.3	-0.1	-0.2	-0.1
GOSR2	210009_s_at	1.0	-0.6	-0.2	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1	-0.4	-0.2
GPD2	225447_at	-1.2	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.3	-0.1	0.0
GPR114	229971_at	1.4	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	-0.1	-0.1
GPSM3	214847_s_at	-1.4	0.0	-0.1	-0.4	-0.3	0.2	-0.2	0.0	-0.1
H1FX	204805_s_at	-2.3	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	-0.1	0.1	0.0
HBEGF	203821_at	1.1	0.6	0.8	0.6	0.4	0.4	0.3	0.2	0.0
HCST	223640_at	-1.1	0.1	-0.1	0.0	-0.1	-0.2	-0.1	-0.3	0.0
HIP1	226364_at	1.3	0.5	0.8	0.6	0.0	0.2	0.3	0.3	0.0

HIST1H1C	209398_at	-2.1	0.7	1.1	1.1	0.1	1.1	0.8	1.1	0.1
HIST1H2BD	222067_x_at	-1.7	0.9	1.5	1.8	0.2	1.2	0.9	1.8	0.0
HIST1H2BF	208490_x_at	-1.5	0.3	0.2	0.6	0.1	0.3	0.2	0.3	0.0
HIST2H2AA4	214290_s_at	1.0	0.6	0.5	0.5	-0.1	0.2	0.2	0.1	0.0
HLA-DRB1	208306_x_at	-1.1	0.7	0.6	1.0	0.2	1.8	1.4	1.5	0.1
HMGB1	224734_at	-1.4	-0.2	-0.4	-0.4	-0.1	-0.3	-0.2	-0.5	0.0
HPCAL1	205462_s_at	1.1	0.4	0.8	0.5	0.1	0.7	0.5	0.3	-0.1
HPSE	219403_s_at	1.2	-0.4	-0.1	-0.3	-0.1	-0.1	-0.3	0.0	-0.1
HSD17B11	217989_at	-1.4	0.2	0.2	0.4	0.0	0.6	0.6	0.5	0.1
HSPA1A	200799_at	1.2	-0.7	-0.7	-1.2	0.0	-1.1	-1.2	-1.6	0.0
IL21R	221658_s_at	2.2	-0.3	-0.6	-0.2	0.1	-0.2	-0.3	-0.3	-0.2
IL7R	205798_at	1.4	-1.3	-2.8	-1.6	0.3	-1.7	-2.9	-2.3	-0.1
ING2	205981_s_at	-3.1	-0.8	-0.6	-0.9	0.0	-0.4	-0.3	-0.4	0.0
IP6K2	218192_at	1.1	0.2	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	-0.2	0.0
KIAA0528	212943_at	-1.3	0.0	0.1	0.0	0.1	-0.2	-0.2	-0.4	0.1
KIF18A	221258_s_at	-1.5	-0.9	-0.9	-0.7	0.0	-0.3	-0.7	-0.3	-0.1
KIF1B	225878_at	1.9	0.0	0.2	0.1	-0.2	0.3	0.6	0.4	0.0
KIF22	202183_s_at	-2.1	-0.6	-0.7	-0.5	-0.1	-0.3	-0.3	-0.4	0.1
KPNB1	213573_at	-1.0	-0.5	-0.5	-0.3	0.0	-0.2	-0.1	0.0	0.0
KYNU	210663_s_at	-1.6	0.5	0.7	0.6	0.3	0.8	1.2	0.9	-0.1
LDLRAD3	234985_at	1.2	-1.2	-1.0	-1.5	0.0	-1.5	-1.7	-2.1	0.0
LGALS3	208949_s_at	1.3	0.1	0.3	0.2	-0.1	0.3	0.4	0.3	0.1
LITAF	200706_s_at	2.3	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	0.2	0.1	0.0
LMO4	209204_at	-1.1	0.2	0.1	0.3	-0.1	-0.2	0.1	-0.2	0.0
LPAR4	206960_at	-1.5	0.0	0.2	0.3	0.1	0.0	0.2	-0.3	0.1
LPHN1	47560_at	2.4	0.6	0.8	0.7	0.1	0.2	0.5	0.2	0.0
LRP11	225060_at	-1.3	-0.7	-0.6	-0.7	0.1	-0.7	-0.7	-0.8	0.0
LRRCC1	231872_at	-2.0	-0.9	-0.5	-0.4	-0.1	-0.4	-0.2	-0.2	0.0
LY86	205859_at	-1.9	1.0	0.9	0.9	0.1	0.6	0.7	0.8	0.0
LYN	202625_at	1.1	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	0.3	0.2	-0.1
MAFF	36711_at	2.7	0.1	0.1	0.3	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1
MANEA	222805_at	-1.5	-0.3	-0.3	-0.4	0.0	-0.5	-0.4	-0.4	-0.1
MAP1LC3B	208786_s_at	1.0	0.2	0.3	0.1	0.0	0.3	0.4	0.4	0.0
MAP4K4	206571_s_at	1.3	-0.2	-0.2	-0.6	0.1	-0.4	-0.2	-0.3	0.0
MAPK11	211499_s_at	1.8	-0.3	-0.4	-0.1	0.2	-0.2	-0.7	-0.2	0.0
MARK4	55065_at	1.3	0.3	0.5	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1
MBD3	202463_s_at	-1.3	-0.8	-0.7	-0.6	0.0	-0.4	-0.6	-0.6	0.1
MCAM SKP2	211042_x_at	-1.2	-0.5	-0.7	-0.5	0.1	-0.2	-0.4	-0.2	0.1

MDC1	203062_s_at	-1.2	-0.6	-0.9	-0.7	0.0	-0.4	-0.5	-0.6	0.0
MFI2	223723_at	2.0	-1.2	-2.2	-1.0	-0.1	-3.7	-3.4	-4.2	-0.2
MKLN1	204423_at	1.1	-0.3	-0.1	-0.4	0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0
MKKNK1	243256_at	1.4	-0.1	0.0	0.0	0.1	-0.4	-0.7	-1.1	-0.1
MKKNK2	218205_s_at	1.7	0.2	0.2	0.1	0.2	-0.1	0.1	0.0	0.0
MS4A4A	219607_s_at	-1.5	-0.5	-0.3	-0.6	0.0	0.1	0.0	-0.1	-0.1
MT1F	217165_x_at	-1.5	-0.5	-0.3	-0.7	-0.1	-0.4	-0.7	-0.3	0.0
MT2A	212185_x_at	-1.3	-0.3	-0.2	-0.6	-0.1	-0.3	-0.6	-0.1	0.0
MTG1	212767_at	-1.1	-0.4	0.0	-0.6	0.0	-0.1	-0.5	-0.3	-0.1
MXD4	212347_x_at	1.3	0.2	0.4	0.0	0.1	0.0	-0.3	-0.1	0.0
MXRA7	212509_s_at	1.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
MYEF2	222771_s_at	-1.2	0.1	0.3	0.2	0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.0
MYLIP	228098_s_at	1.2	0.7	0.8	0.8	0.0	0.0	0.1	-0.2	0.0
MYO19	225947_at	-1.2	-0.5	-0.5	-0.5	-0.1	-0.2	0.0	-0.1	0.1
NAAA	227135_at	-1.2	0.0	0.0	-0.1	0.1	-0.2	-0.1	0.0	0.0
NAB1	209272_at	-1.4	-0.4	-0.5	-0.5	0.0	-0.4	-0.4	-0.4	0.0
NAMPT	217739_s_at	1.2	0.0	0.0	-0.2	0.0	-0.4	-0.3	-0.3	0.0
NBR2	1553992_s_at	-1.0	0.2	0.7	0.4	0.1	0.2	0.4	0.1	0.1
NCALD	211685_s_at	-1.4	0.7	0.5	0.5	0.0	0.5	0.7	0.6	0.1
NCF1	204961_s_at	8.1	0.7	0.8	0.7	0.4	0.7	0.2	0.2	0.0
NCF4	205147_x_at	-1.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.1	-0.1
NEDD9	202149_at	-1.2	0.4	0.9	0.4	0.1	0.0	0.4	0.0	0.0
NFAT5	224984_at	1.0	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0
NQO1	201467_s_at	1.3	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
NRM	225592_at	-2.0	-0.2	-0.4	-0.2	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0
NT5C3L	225044_at	2.0	-0.4	-0.3	-0.3	-0.1	-0.6	-0.8	-1.2	-0.1
NUCB2	229838_at	-1.7	-0.2	-0.5	-0.3	-0.2	-0.3	-0.1	-0.3	-0.1
NUDT7	228855_at	-2.0	0.1	0.2	0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.1	0.0
NUP210	212315_s_at	-1.2	-0.2	-0.2	-0.5	0.0	-0.2	-0.1	-0.3	0.1
NUP62	202153_s_at	-1.0	-0.3	-0.5	-0.7	0.0	-0.5	-0.5	-0.6	0.0
OGG1	205760_s_at	-1.6	0.1	0.4	0.2	-0.1	0.4	0.6	0.2	0.0
OMA1	226020_s_at	-1.7	0.5	0.8	0.6	0.2	0.4	0.7	0.8	0.0
OPLAH	222025_s_at	1.3	0.3	0.5	0.3	0.0	-0.2	-0.2	-0.3	-0.2
OSGEPL1	230032_at	-2.2	-0.3	-0.5	-0.4	0.0	-0.6	-0.3	-0.6	0.1
OVOS2	228245_s_at	-2.2	-0.5	-0.7	-0.3	0.0	0.1	0.0	-0.1	-0.1
PAQR4	212858_at	-1.0	-0.7	-0.8	-0.5	-0.3	-0.4	-0.8	-0.5	0.0
PAQR8	227626_at	-1.2	0.8	0.7	1.0	-0.1	0.7	1.0	1.1	-0.2
PDGFA	205463_s_at	2.2	0.3	0.0	0.1	-0.1	-0.2	-0.1	-0.6	0.1
PDXK	218018_at	1.2	-0.4	-0.2	-1.1	-0.1	-0.8	-0.9	-1.5	0.1

PEX19	201707_at	1.2	-0.1	0.0	-0.4	0.1	0.0	-0.1	-0.2	0.2
PHLDB3	1557948_at	2.3	0.7	0.9	0.7	0.3	0.2	0.1	0.1	0.0
PIGK	227639_at	-1.1	-0.1	-0.2	-0.2	0.0	-0.2	-0.2	-0.3	0.1
PIGV	51146_at	-1.4	-0.2	-0.2	-0.2	0.0	-0.2	-0.1	-0.1	0.0
PIK3R5	227645_at	1.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
PLAUR	211924_s_at	1.3	-0.1	0.0	-0.1	0.1	-0.2	0.0	-0.3	-0.1
PLEK	203470_s_at	1.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.2	0.2	-0.1	0.0
PLP2	201136_at	-1.1	0.0	0.0	-0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
PLXNA1	221538_s_at	1.4	-0.9	-0.9	-1.7	0.0	-1.0	-4.4	-1.5	0.2
POR	208928_at	1.0	0.2	0.3	0.1	0.0	0.0	0.2	-0.1	0.1
PPP1R16B	41577_at	1.7	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	-0.2
PRIM2	205628_at	-1.2	-0.6	-0.4	-0.3	-0.1	-0.3	-0.3	-0.3	0.1
PRKACB	202742_s_at	-2.4	0.3	0.2	0.3	0.2	0.5	0.8	0.5	0.1
PRNP	201300_s_at	1.1	-1.6	-2.0	-2.1	-0.1	-1.7	-1.8	-1.3	0.0
PROCR	203650_at	1.3	-0.4	-0.2	-1.0	-0.4	-0.9	-0.4	-0.5	0.0
PRR11	219392_x_at	-1.5	-0.1	-0.4	0.1	0.0	0.2	0.5	0.4	-0.1
PRR3	204795_at	-1.3	-0.5	-0.5	-0.6	0.0	-0.4	-0.7	-0.4	-0.1
PSMB9	204279_at	-1.6	-0.1	-0.2	-0.3	-0.1	-0.3	-0.5	-0.5	0.0
PTGER4	204897_at	1.1	0.1	0.1	0.0	0.0	-0.1	0.1	-0.2	0.0
PTPN18	203555_at	-1.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.1	-0.1	0.0
PTPRC	207238_s_at	-1.3	0.3	0.7	0.5	0.1	0.6	0.7	0.6	-0.1
PTPRE	221840_at	3.7	-0.5	-0.3	-0.8	0.0	-0.8	-0.7	-0.7	0.0
RAB11FIP1	219681_s_at	1.2	-0.2	-0.2	-0.3	0.1	-0.3	-0.4	-0.6	0.0
RAB1A	213440_at	1.3	-0.1	-0.1	0.0	0.1	-0.2	0.1	-0.2	0.0
RAPGEF2	203097_s_at	1.4	0.0	0.2	-0.1	0.2	-0.1	0.1	-0.1	0.1
RCC1	206499_s_at	-1.0	-0.7	-0.7	-1.0	0.0	-0.3	-0.4	-0.3	-0.1
RELL1	226430_at	-1.4	-0.4	-0.1	-0.2	-0.2	-0.2	-0.1	0.1	0.0
RFC1	208021_s_at	-1.1	-0.6	-0.6	-0.5	0.0	-0.3	-0.1	0.0	0.0
RHBDF2	219202_at	1.0	0.5	0.6	0.5	0.1	0.8	0.7	0.7	0.1
RHOC	200885_at	3.1	0.5	0.7	0.5	-0.1	0.4	0.4	0.6	0.0
RNASE2	206111_at	-1.2	-0.2	-0.1	-0.3	0.1	-0.3	-0.1	-0.2	0.0
RNASE3	206851_at	-1.9	0.0	0.0	-0.2	0.2	-0.3	0.0	-0.1	-0.2
RNASE6	213566_at	-1.7	0.4	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.5	0.0
RNF149	225414_at	1.6	-0.1	0.2	0.2	0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.1
RNF175	236465_at	-1.6	0.0	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
RTTN	227072_at	-2.4	-0.7	-0.8	-0.7	0.0	-0.3	-0.4	-0.2	0.0
RXFP1	1552715_a_at	-1.2	0.2	0.8	0.4	0.1	0.8	1.3	0.9	-0.2
RYK	202853_s_at	1.2	-0.3	-0.2	-0.3	0.0	-0.8	-0.6	-0.8	0.0
SAMD13	229402_at	-1.3	0.1	0.2	0.2	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.0

SAMD9	219691_at	-1.1	0.2	0.3	0.4	-0.1	0.4	0.5	0.8	0.1
SAMSN1	220330_s_at	-2.1	-0.2	0.0	-0.2	0.3	-0.6	-0.5	-0.7	0.1
SAT2	225272_at	1.7	0.6	0.7	0.5	0.1	0.5	1.0	0.7	0.0
SCLT1	236487_at	-1.6	-0.6	-0.9	-0.7	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.0
SDC2	212157_at	1.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.0	0.3	-0.1
SELPLG	209879_at	-1.5	0.4	0.5	0.5	0.1	0.3	0.6	0.5	-0.1
SERINC2	224762_at	1.1	0.2	0.0	-0.1	0.3	-0.3	-0.5	-0.5	0.0
SESN1	218346_s_at	1.2	-0.4	-0.7	-0.3	0.0	-0.3	-0.8	0.0	0.0
SESN2	223196_s_at	1.6	0.0	-0.3	-0.2	0.0	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1
SGSH	35626_at	3.5	1.6	1.5	1.5	0.3	1.6	1.1	2.1	0.3
SH3BP5	201811_x_at	2.7	0.2	0.0	0.2	0.2	-0.3	-0.3	-0.1	0.0
SHB	1557458_s_at	1.6	0.4	0.4	0.7	0.2	0.2	0.2	0.3	0.0
SKP2	210567_s_at	-1.2	-1.9	-1.7	-1.7	0.0	-0.5	-1.2	-1.1	-0.1
SLC35C2	219447_s_at	1.1	0.0	0.1	0.1	0.1	-0.2	-0.4	-0.5	-0.4
SLC39A13	225277_at	1.0	0.2	0.4	0.4	0.5	0.3	0.2	0.0	0.0
SLC6A6	228754_at	1.3	-0.3	-0.3	-0.6	0.0	-0.3	-0.2	-0.4	0.1
SMARCA2	206542_s_at	-1.3	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0
SMOX	210357_s_at	2.6	0.1	0.3	-0.1	0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.1
SNAPC4	215926_x_at	1.0	0.2	0.2	0.4	0.0	0.1	0.2	-0.2	0.1
SP110	208012_x_at	-1.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.2	0.2	0.1
SP140L	214791_at	-1.2	0.3	0.9	0.6	0.1	0.6	0.3	0.8	-0.2
SP4	236265_at	-1.2	-0.2	-0.2	-0.4	-0.1	-0.5	-0.3	-0.2	0.1
SPN	1568964_x_at	-1.2	-0.5	-0.2	-0.6	0.0	-0.3	-0.1	-0.1	-0.1
SPTLC2	203128_at	-1.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0
SQRDL	217995_at	1.2	0.5	0.3	0.4	0.2	0.5	0.5	0.8	0.0
SSR3	217790_s_at	-1.1	-0.3	-0.2	-0.6	0.1	-0.4	-0.4	-0.4	-0.1
STK17A	202693_s_at	1.4	-0.7	-0.3	-0.7	0.0	-0.5	-0.7	-0.4	0.0
STK17B	226525_at	1.5	-1.2	-1.3	-2.0	0.0	-1.4	-1.8	-1.3	0.1
TARS2	221189_s_at	-1.0	-0.6	-0.3	-0.3	-0.1	-0.1	-0.4	0.2	0.0
TCF4	203753_at	-1.3	0.6	0.1	1.2	0.0	0.4	0.4	0.0	0.2
THAP10	219596_at	-1.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.2	0.2	0.0
THAP5	227636_at	-1.5	-0.5	-0.2	-0.4	0.0	-0.3	-0.2	-0.3	0.0
THBD	203887_s_at	2.5	0.2	0.2	0.0	0.1	-0.3	0.0	-0.3	-0.1
TJP2	202085_at	-1.7	-0.4	-0.5	-0.4	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0
TMED1	203679_at	-1.5	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	-0.3	-0.1	0.1
TMEM107	239824_s_at	-2.5	-0.6	-0.7	-0.5	0.0	-0.1	-0.3	-0.2	0.0
TMEM194A	212621_at	-1.5	-0.6	-0.7	-0.5	0.0	-0.2	-0.2	-0.1	0.0
TMEM209	235158_at	-1.0	-0.4	-0.3	-0.6	0.0	-0.3	-0.3	-0.4	0.0
TMEM71	238429_at	-3.6	0.1	0.0	0.2	0.2	0.5	0.7	1.0	0.0

TMEM80	221951_at	-1.3	0.2	0.2	0.3	0.1	0.0	0.2	-0.2	-0.1
TNF	207113_s_at	3.5	-0.8	-0.8	-1.1	0.0	-1.1	-1.4	-1.5	0.2
TNFAIP2	202510_s_at	1.7	0.5	0.8	0.7	0.2	0.5	0.8	0.5	0.0
TNFAIP8	210260_s_at	-1.6	-0.5	-0.6	-0.8	0.0	-0.4	-0.5	-0.4	0.0
TNFRSF10B	209295_at	1.0	-0.2	-0.1	-0.3	0.1	-0.3	-0.5	-0.2	0.0
TOB1	202704_at	1.3	0.1	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0
TOE1	204080_at	-1.4	-0.6	-0.6	-0.8	0.0	-0.4	-0.6	-0.3	0.0
TP53	201746_at	-1.1	-0.3	-0.1	-0.6	0.0	-0.6	-0.6	-0.7	0.0
TP53INP1	225912_at	3.1	0.5	0.2	0.6	-0.1	0.5	0.5	0.3	0.0
TPCN1	217914_at	-1.2	-0.1	0.1	0.2	-0.4	0.7	0.5	0.8	0.0
TPM4	212481_s_at	1.3	-0.4	-0.3	-0.5	0.0	-0.4	-0.4	-0.4	-0.1
TUBE1	226181_at	-1.1	-0.5	-0.2	-0.2	-0.1	-0.1	0.0	-0.2	0.1
TXNDC16	226747_at	-2.2	-0.1	-0.4	-0.2	-0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
UBE2E2	225651_at	2.1	-0.9	-0.9	-1.2	0.1	-0.8	-0.8	-0.8	0.0
UBR7	218108_at	-1.7	-0.6	-0.8	-0.8	0.1	-0.6	-0.6	-0.8	-0.2
UBTF	202692_s_at	-1.1	-0.5	-0.3	-0.2	0.0	0.0	-0.2	-0.3	-0.1
ULBP2	238542_at	2.1	-0.2	-0.1	0.3	-0.2	0.3	0.3	0.4	0.1
USP37	232033_at	-1.2	-0.5	-0.9	-0.4	0.0	-0.6	-1.0	-1.0	-0.1
YEATS4	218911_at	-1.4	-0.8	-0.5	-0.7	-0.2	-0.6	-0.4	-0.5	-0.1
YPEL2	227020_at	2.7	0.8	1.0	0.9	0.0	0.3	0.5	0.4	0.0
ZC3H12D	1559263_s_at	-2.2	0.1	0.4	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.0
ZDHHC12	226088_at	-1.1	-0.6	-0.2	-0.6	-0.1	-0.3	-0.4	-0.6	0.0
ZMYND8	209048_s_at	-1.2	-0.1	0.0	-0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	-0.1
ZNF184	213452_at	-1.2	0.0	-0.1	-0.2	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.1
ZNF618	226590_at	-1.0	0.0	0.1	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
ZNF718	1553269_at	-1.7	-0.4	-0.2	-0.4	-0.1	-0.6	-0.4	-0.9	0.0

9.2.3 Downstream-Funktionen bei 24-stündiger Behandlung von MV4;11 mit verschiedenen Inhibitoren

Tabelle 9.2-5 Aus den Transkriptionsänderungen abgeleitete zelluläre Funktionen der Inhibitoren (Top 5 mit p-Wertbereichen der Subsets)

Behandlung	Funktionen	p-Werte der Subsets
Sorafenib	Zellzyklus Zellulärer Aufbau (Assembly) und Organisation DNA Replikation Zelltod und Überleben Zelluläres Wachstum und Proliferation	$1,5 \cdot 10^{-36}$ - $3,4 \cdot 10^{-4}$ $2,1 \cdot 10^{-24}$ - $2,9 \cdot 10^{-4}$ $2,1 \cdot 10^{-24}$ - $2,8 \cdot 10^{-4}$ $1,2 \cdot 10^{-19}$ - $2,9 \cdot 10^{-4}$ $1,9 \cdot 10^{-18}$ - $3,2 \cdot 10^{-4}$
VX-680	Zellzyklus DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur Lipid-Metabolismus Biochemie niedermolekularer Substanzen Vitamin und Mineral Metabolismus	$5,7 \cdot 10^{-16}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$ $1,4 \cdot 10^{-15}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$ $3,7 \cdot 10^{-11}$ - $1,6 \cdot 10^{-3}$ $3,7 \cdot 10^{-11}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$ $3,7 \cdot 10^{-11}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$
CFI-3	Zellzyklus Zelltod und Überleben DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur Zelluläres Wachstum und Proliferation Genexpression	$7,7 \cdot 10^{-17}$ - $1,7 \cdot 10^{-3}$ $2,6 \cdot 10^{-13}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$ $1,6 \cdot 10^{-12}$ - $1,7 \cdot 10^{-3}$ $4,3 \cdot 10^{-11}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$ $1,4 \cdot 10^{-7}$ - $1,4 \cdot 10^{-3}$
CFI-2	DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur Zellzyklus Zelltod und Überleben Zelluläres Wachstum und Proliferation RNA post-transkriptionelle Modifikation	$7,5 \cdot 10^{-15}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$ $7,3 \cdot 10^{-13}$ - $2,3 \cdot 10^{-3}$ $1,4 \cdot 10^{-12}$ - $2,4 \cdot 10^{-3}$ $1,9 \cdot 10^{-11}$ - $2,4 \cdot 10^{-3}$ $1,1 \cdot 10^{-9}$ - $9,3 \cdot 10^{-4}$
CHIR-265	Zellzyklus DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur Zelltod und Überleben Zellulärer Aufbau (Assembly) und Organisation Zelluläres Wachstum und Proliferation	$5,2 \cdot 10^{-25}$ - $1,7 \cdot 10^{-3}$ $5,9 \cdot 10^{-16}$ - $1,6 \cdot 10^{-3}$ $3,1 \cdot 10^{-15}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$ $4,2 \cdot 10^{-15}$ - $1,5 \cdot 10^{-3}$ $3,5 \cdot 10^{-14}$ - $1,8 \cdot 10^{-3}$
RKI-2	Zellzyklus DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur Zelluläres Wachstum und Proliferation Zelltod und Überleben RNA post-transkriptionelle Modifikation	$3,3 \cdot 10^{-18}$ - $2,4 \cdot 10^{-3}$ $1,8 \cdot 10^{-14}$ - $2,4 \cdot 10^{-3}$ $1,4 \cdot 10^{-12}$ - $2,5 \cdot 10^{-3}$ $1,6 \cdot 10^{-11}$ - $2,5 \cdot 10^{-3}$ $6,9 \cdot 10^{-11}$ - $2,4 \cdot 10^{-3}$
FLT3-siRNAs	Zellzyklus DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur Zellulärer Aufbau (Assembly) und Organisation Zelltod und Überleben Zelluläres Wachstum und Proliferation	$3,0 \cdot 10^{-9}$ - $9,2 \cdot 10^{-3}$ $3,0 \cdot 10^{-9}$ - $9,2 \cdot 10^{-3}$ $1,2 \cdot 10^{-7}$ - $9,2 \cdot 10^{-3}$ $3,0 \cdot 10^{-7}$ - $9,2 \cdot 10^{-3}$ $1,5 \cdot 10^{-6}$ - $9,2 \cdot 10^{-3}$
ACD-siRNAs	Zellzyklus Zellulärer Aufbau (Assembly) und Organisation DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur Zelltod und Überleben Zelluläres Wachstum und Proliferation	$7,3 \cdot 10^{-41}$ - $2,8 \cdot 10^{-4}$ $1,8 \cdot 10^{-40}$ - $2,8 \cdot 10^{-4}$ $1,8 \cdot 10^{-40}$ - $2,8 \cdot 10^{-4}$ $3,8 \cdot 10^{-18}$ - $2,8 \cdot 10^{-4}$ $4,7 \cdot 10^{-17}$ - $2,8 \cdot 10^{-4}$

9.3 Extrapolierte Aktivität von Transkriptionsregulatoren, Kinasen und Phosphatasen

9.3.1 Extrapolierte Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren nach 24-stündiger Behandlung bei der Zelllinie MV4;11

Tabelle 9.3-1 Extrapolierte Aktivitätsveränderungen von Transkriptionsfaktoren nach 24-stündiger Behandlung mit FLT3-siRNAs

Regulator	Vorhersage zur	z-Score	Statistische	p-Wert für
RB1	Aktiviert	4.7		6.79E-38
TP53	Aktiviert	6.0		2.30E-37
CDKN2A	Aktiviert	6.2		3.23E-26
Rb	Aktiviert	3.5		1.30E-22
NUPR1	Aktiviert	6.9		6.92E-22
RBL1	Aktiviert	3.9	Bias	1.01E-20
SMARCB1	Aktiviert	3.4	Bias	1.92E-15
KDM5B	Aktiviert	4.9	Bias	2.37E-15
TCF3	Aktiviert	3.9		2.45E-13
HNF4A	Aktiviert	2.2		1.68E-07
TOB1	Aktiviert	3.2		4.95E-07
FOXO3	Aktiviert	2.4		9.75E-06
SMARCA4	Aktiviert	2.7	Bias	1.73E-05
E2F1	Inhibiert	-5.4	Bias	4.30E-43
E2f	Inhibiert	-3.9	Bias	1.44E-29
TBX2	Inhibiert	-5.6		3.29E-28
FOXM1	Inhibiert	-4.6	Bias	5.92E-26
E2F3	Inhibiert	-2.7	Bias	6.56E-25
E2F2	Inhibiert	-3.3	Bias	3.70E-20
MYC	Inhibiert	-6.0		1.89E-19
FOXO1	Inhibiert	-3.1	Bias	8.97E-09
MAX	Inhibiert	-2.2		4.07E-07
TP63	Inhibiert	-2.1		2.87E-06
TFDP1	Inhibiert	-2.2	Bias	3.47E-06
PAX8	Inhibiert	-2.2	Bias	9.56E-04
MYOD1	Inhibiert	-2.3	Bias	1.91E-03
Hdac	Inhibiert	-2.3		4.13E-03
CREBBP	Inhibiert	-2.2	Bias	2.15E-02
SREBF1	Inhibiert	-2.3	Bias	2.86E-02

Tabelle 9.3-2 Extrapolierte Aktivitätsveränderung von Transkriptionsfaktoren nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren

(Zum Vergleich wurden auch die Veränderungen durch die FLT3-siRNAs aus Tab. 9.3-1 angegeben.)

Transkriptionsfaktor	Sorafenib	VX-680	CFI-3	CFI-2	CHIR-265	RKI-2	FLT3-siRNAs
AR	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
ARNT	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
ARNT2	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
ATF4	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
CDKN2A	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert	Aktiviert
CEBPA	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert		n.s.v.
CREB1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
CREBBP	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
CREM	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
DACH1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
E2F1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert
E2F2	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
E2F3	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
EGR1	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
EGR2	Inhibiert	Inhibiert*	Inhibiert	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
FLI1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.
FOXM1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
FOXO1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
FOXO3	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
GATA1	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
Hdac	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
HIF1A	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
HMGA1	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
HNF4A	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
HOXB4	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert*	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.
HSF2	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
IRF3	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
IRF4	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
KDM5B	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
MAX	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert
MTPN	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
MYC	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert
MYCN	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.
MYOD1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
NFATC2	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
NFE2L2	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.

NFKB1	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
NFKBIA	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert
NFYA	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
NKX2-3	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
NR1H3	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
NUPR1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	Aktiviert
PAX8	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
PGR	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
PITX2	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.
PPARGC1B	Inhibiert	Inhibiert*	Inhibiert	Inhibiert*	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.
RB1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
RBL1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert*
SATB1	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
SIM1	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
SIRT2	Inhibiert	Inhibiert*	n.s.v.	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
SMARCA4	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert*
SMARCB1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
SNAI1	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
SP1	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
SREBF1	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert	Inhibiert*	Inhibiert	Inhibiert*	Inhibiert*
SREBF2	Inhibiert	Inhibiert*	Inhibiert	Inhibiert*	Inhibiert	Inhibiert*	n.s.v.
STAT4	Inhibiert	Inhibiert*	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.
STAT5B	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
TBX2	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert
TCF3	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
TFAM	Aktiviert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.
TFDP1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert*
TOB1	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
TP53	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Aktiviert
TP63	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert
TRIM24	n.s.v.	n.s.v.	Inhibiert	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.	n.s.v.

*Bias; n.s.v. = nicht signifikant verändert

Tabelle 9.3-3 Abgeleitete Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit Sorafenib

(*off-target*, da das Expressionsprofil um die Vereinigungsmenge des FLT3-siRNA-Musters reduziert wurde)

Regulator	Vorhersage zur	z-Score	Statistische	p-Wert für
CDKN2A	Aktiviert	2,2		4,5E-05
IRF4	Aktiviert	2,3		1,6E-04
TFAM	Aktiviert	2,0		9,5E-04
SREBF2	Inhibiert	-4,4		4,6E-19
SREBF1	Inhibiert	-4,3		4,0E-18
HIF1A	Inhibiert	-4,3		2,1E-10
PPARGC1B	Inhibiert	-2,8		2,1E-07
ATF4	Inhibiert	-2,4		2,3E-07
SIRT2	Inhibiert	-2,2		1,1E-05
MTPN	Inhibiert	-2,2		6,8E-04
NFYA	Inhibiert	-2,2		2,5E-03
EGR2	Inhibiert	-2,8		2,7E-03
STAT4	Inhibiert	-2,8		4,6E-03
EGR1	Inhibiert	-2,2		8,7E-03
ARNT	Inhibiert	-2,4		1,3E-02
NFKB1	Inhibiert	-2,2		5,3E-02
MYCN	Inhibiert	-3,0		6,5E-02
NFE2L2	Inhibiert	-2,5		8,2E-02
SATB1	Inhibiert	-2,2		1,1E-01

Tabelle 9.3-4 Abgeleitete Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit VX-680

(*off-target*, da das Expressionsprofil um die Vereinigungsmenge des FLT3-siRNA-Musters reduziert wurde)

Regulator	Vorhersage zur	z-Score	Statistische	p-Wert für
HMGA1	Aktiviert	2		1.28E-03
SREBF2	Inhibiert	-4.3	Bias	1.90E-23
SREBF1	Inhibiert	-4.5		7.57E-20
PPARGC1	Inhibiert	-2.8	Bias	1.14E-08
SIRT2	Inhibiert	-2.2	Bias	5.55E-07
EGR2	Inhibiert	-2.8	Bias	9.92E-06
CREM	Inhibiert	-2.0		1.50E-04
STAT4	Inhibiert	-2.4	Bias	5.47E-04

Tabelle 9.3-5 Abgeleitete Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit CFI-3

(*off-target*, da das Expressionsprofil um die Vereinigungsmenge des FLT3-siRNA-Musters reduziert wurde)

Regulator	Vorhersage zur	z-Score	Statistische	p-Wert für
FOXO3	Aktiviert	2.6		2.07E-04
NFATC2	Aktiviert	2.7		1.47E-02
SNAI1	Aktiviert	2.0		5.03E-02
GATA1	Aktiviert	2.2		7.03E-02
IRF3	Aktiviert	2.2		1.14E-01
ARNT2	Aktiviert	2.1		1.98E-01
SIM1	Aktiviert	2.6		3.51E-01
MYC	Inhibiert	-3.1		3.09E-09
SREBF2	Inhibiert	-3.4		1.06E-08
SP1	Inhibiert	-2.0		1.99E-07
SREBF1	Inhibiert	-3.6		1.38E-06
HOXB4	Inhibiert	-2.0		6.60E-04
PPARGC1B	Inhibiert	-2.2		4.39E-03
STAT5B	Inhibiert	-2.2		2.29E-02
EGR2	Inhibiert	-2.4		1.38E-01
TRIM24	Inhibiert	-2.0		2.52E-01

Tabelle 9.3-6 Abgeleitete Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit CFI-2

(*off-target*, da das Expressionsprofil um die Vereinigungsmenge des FLT3-siRNA-Musters reduziert wurde)

Regulator	Vorhersage zur	z-Score	Statistische	p-Wert für
DACH1	Aktiviert	2.0	Bias	7.37E-03
HMGA1	Aktiviert	2.0		8.72E-02
SREBF2	Inhibiert	-4.0	Bias	3.23E-12
MYC	Inhibiert	-4.6		3.66E-12
SREBF1	Inhibiert	-4.3	Bias	1.28E-08
PPARGC1B	Inhibiert	-2.8	Bias	6.62E-05
FLI1	Inhibiert	-2.3	Bias	1.30E-04
SP1	Inhibiert	-2.2	Bias	2.79E-04
SIRT2	Inhibiert	-2.0	Bias	1.66E-03
HOXB4	Inhibiert	-2.0	Bias	1.66E-03
CREB1	Inhibiert	-2.5	Bias	9.38E-03
HSF2	Inhibiert	-2.0	Bias	1.26E-02
NFYA	Inhibiert	-2.2	Bias	2.80E-02
SATB1	Inhibiert	-2.6		7.12E-02
NKX2-3	Inhibiert	-2.2		1.00E+00

Tabelle 9.3-7 Abgeleitete Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit CHIR-265

(*off-target*, da das Expressionsprofil um die Vereinigungsmenge des FLT3-siRNA-Musters reduziert wurde)

Regulator	Vorhersage zur	z-Score	Statistische	p-Wert für
CDKN2A	Aktiviert	2.2		7.20E-03
SREBF2	Inhibiert	-2.9		8.69E-12
HIF1A	Inhibiert	-2.5		1.91E-10
SREBF1	Inhibiert	-3.1		3.10E-09
EGR2	Inhibiert	-2.2		6.62E-06
CEBPA	Inhibiert	-2.6		1.98E-04
STAT4	Inhibiert	-2.4		1.32E-03

Tabelle 9.3-8 Abgeleitete Aktivität von Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit RKI-2

(*off-target*, da das Expressionsprofil um die Vereinigungsmenge des FLT3-siRNA-Musters reduziert wurde)

Regulator	Vorhersage zur	z-Score	Statistische	p-Wert für
NUPR1	Aktiviert	2.2		1.05E-02
CDKN2A	Aktiviert	2.6		1.23E-02
MYC	Inhibiert	-4.7		3.93E-11
SREBF1	Inhibiert	-3.1	Bias	4.28E-06
SREBF2	Inhibiert	-3.4	Bias	1.14E-05
FLI1	Inhibiert	-2.3	Bias	9.82E-05
HOXB4	Inhibiert	-2.0	Bias	1.80E-03
NFE2L2	Inhibiert	-2.8	Bias	7.19E-03
PPARGC1B	Inhibiert	-2.2	Bias	1.33E-02
PITX2	Inhibiert	-2.2	Bias	1.66E-02
MYCN	Inhibiert	-2.2		4.16E-01

9.3.2 Extrapolierte Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung

Tabelle 9.3-9 Abgeleitete Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung mit Sorafenib

Kinase/	Vorhersage	z-Score	Statistische	p-Wert für die
PTEN	Aktiviert	2.3		1.53E-06
MTORC1	Inhibiert	-2.2		8.97E-05
MTOR	Inhibiert	-2.2		2.58E-04
PI3K	Inhibiert	-2.6		2.89E-04
ERK1/2	Inhibiert	-2.4		3.04E-04
ERBB2	Inhibiert	-2.8		3.35E-04
SRC	Inhibiert	-2.2		8.69E-04
Pkc(s)	Inhibiert	-2.2		1.59E-03
P38 MAPK	Inhibiert	-2.9		3.70E-02
TGFBR2	Inhibiert	-2.1		6.01E-02
Jnk	Inhibiert	-2.2		3.34E-01

Tabelle 9.3-10 Abgeleitete Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung mit VX-680

Kinase/	Vorhersage	z-Score	Statistische	p-Wert für die
ERK1/2	Inhibiert	-2.3		1.16E-03
ERBB2	Inhibiert	-2.8		6.57E-02
MAPK1	Inhibiert	-2.2		2.54E-01

Tabelle 9.3-11 Abgeleitete Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung mit CFI-3

Kinase/	Vorhersage	z-Score	Statistische	p-Wert für die
PTEN	Aktiviert	2.2		4.53E-06
AKT1	Inhibiert	-2.2		2.70E-06
PIM1	Inhibiert	-2.6		2.00E-05
CDK2	Inhibiert	-2.2		4.95E-05
Mek	Inhibiert	-2.4		1.47E-02
ERBB2	Inhibiert	-2.4		6.83E-02

Tabelle 9.3-12 Abgeleitete Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung mit CFI-2

Kinase/	Vorhersage	z-Score	Statistische	p-Wert für die
PTEN	Aktiviert	2.3		9.47E-05
EIF2AK3	Inhibiert	-2.2	Bias	7.12E-07
PIM1	Inhibiert	-2.8	Bias	1.42E-05
CDK2	Inhibiert	-2.2		3.02E-04
LDL	Inhibiert	-2.0	Bias	1.95E-03
PRKCE	Inhibiert	-2.2	Bias	3.21E-03
Mek	Inhibiert	-2.9		4.77E-03
PI3K	Inhibiert	-2.0	Bias	5.68E-03
ERBB2	Inhibiert	-3.2		1.00E+00

Tabelle 9.3-13 Abgeleitete Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung mit CHIR-265

Kinase/	Vorhersage	z-Score	Statistische	p-Wert für die
ERBB2	Inhibiert	-2.4		3.64E-07
MAPK1	Inhibiert	-2.2		3.73E-02

Tabelle 9.3-14 Abgeleitete Aktivität von Kinasen und Phosphatasen nach 24-stündiger Behandlung mit RKI-2

Kinase/	Vorhersage	z-Score	Statistische	p-Wert für die
PTEN	Aktiviert	2.0		9.33E-05
PIM1	Inhibiert	-2.8	Bias	1.22E-05
Mek	Inhibiert	-3.0		1.53E-03
PRKCE	Inhibiert	-2.2	Bias	2.21E-03
Pkc(s)	Inhibiert	-2.2	Bias	1.67E-02
MAPK3	Inhibiert	-2.2	Bias	1.82E-02
ERBB2	Inhibiert	-3.1		3.38E-01

9.3.3 Extrapolierte Aktivitätsänderungen von Transkriptionsfaktoren nach vier-, acht- bzw. 16-stündiger Behandlung

Tabelle 9.3-15 Abgeleitete Aktivität von Transkriptionsfaktoren in MV4;11 16 Stunden nach der Transfektion der FLT3-siRNAs[#]

Regulator	FLT3-siRNA10			FLT3-siRNA11			FLT3-siRNA12		
	Status	Z-Score	p-Wert	Status	Z-Score	p-Wert	Status	Z-Score	p-Wert
ATF4	Inhibiert*	-2,4	2,4E-02	n.s.v.			n.s.v.		
CDKN2A	Aktiviert	3,2	4,4E-07	Aktiviert	2,8	1,8E-05	Aktiviert	3,0	2,0E-04
CTNNB1	Inhibiert*	-2,2	3,8E-02	n.s.v.			n.s.v.		
E2F (als Gruppe)	Inhibiert*	-3,1	2,0E-06	Inhibiert	-2,7	1,9E-06	Inhibiert	-2,6	1,5E-06
E2F1	Inhibiert*	-3,0	1,5E-10	Inhibiert	-2,4	3,5E-11	n.s.v.		
E2F2	Inhibiert*	-2,2	4,9E-05	Inhibiert	-2,2	9,7E-06	Inhibiert	-2,0	2,5E-03
EGR2	n.s.v.			Inhibiert	-2,0	1,5E-03	n.s.v.		
EP300	Inhibiert*	-2,5	2,0E-04	n.s.v.			n.s.v.		
FOXO3	n.s.v.			n.s.v.			Aktiviert	2,4	7,8E-04
HDAC (als	n.s.v.			Inhibiert	-2,3	8,8E-03	n.s.v.		
HNF4A	n.s.v.			Aktiviert	2,4	9,6E-02	n.s.v.		
JUNB	n.s.v.			n.s.v.			Aktiviert	2,2	5,3E-03
KDM5B	Aktiviert*	3,3	6,1E-03	n.s.v.			n.s.v.		
MAX	n.s.v.			Inhibiert	2,0	9,8E-06	Inhibiert	-2,2	1,1E-05
MDM2	Aktiviert	2,2	2,1E-02	n.s.v.			n.s.v.		
MYC	Inhibiert	-4,0	7,0E-07	Inhibiert	-3,2	2,2E-09	Inhibiert	-3,5	1,6E-09
MYOD1	n.s.v.			n.s.v.			Inhibiert	-2,2	5,4E-02
NUPR1	Aktiviert	2,7	3,9E-03	Aktiviert	2,2	7,7E-03	n.s.v.		
RB1	Aktiviert*	2,3	1,1E-12	Aktiviert	2,2	8,5E-17	n.s.v.		
SOX2	Inhibiert	-2,2	1,7E-01	n.s.v.			Inhibiert	-2,0	2,2E-01
SPI1	n.s.v.			n.s.v.			Aktiviert	2,4	4,6E-07
SREBF1	n.s.v.			Inhibiert	-2,1	2,4E-03	Inhibiert	-2,7	3,2E-03
SREBF2	n.s.v.			n.s.v.			Inhibiert	-2,4	8,3E-03
TBX2	Inhibiert	-2,3	3,1E-05	Inhibiert	-2,1	5,1E-05	Inhibiert	-2,4	4,1E-02
TOB1	Aktiviert	2,4	6,3E-03	Aktiviert	2,2	9,6E-04	Aktiviert	2,0	5,7E-02
TP53	n.s.v.			Aktiviert	2,4	2,8E-14	n.s.v.		
TP63	Inhibiert*	-3,4	5,8E-04	Inhibiert	-2,6	7,4E-03	Inhibiert	-2,3	4,3E-03

[#]basierend auf signifikanten Transkriptionsänderungen, berechnet mit IPA *Bias; n.s.v. = nicht signifikant verändert

Tabelle 9.3-16 Extrapolierte Aktivität von Transkriptionsfaktoren bei MV4;11-Zellen Behandlung mit Sorafenib

Zeit:	Vier Stunden				Acht Stunden				16 Stunden			
	0,5 % FKS		10 % FKS		0,5 % FKS		10 % FKS		0,5 % FKS		10 % FKS	
Transkriptionsregulator	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score
ATF3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,2
CDKN2A	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,9	n.s.v.		Aktiviert	4,7	Aktiviert	5,2
CEBPE	Aktiviert	2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
CREB1	Inhibiert	-2,3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
E2F	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		Inhibiert	-3,6	Inhibiert	3,1
E2F1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-5,1	Inhibiert	4,6
E2F2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,0	Inhibiert	3,0
E2F3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,7	n.s.v.	
EGR1	Inhibiert	-2,0	Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
ESRRA	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
EPAS1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.	
EZH2	Inhibiert	-2,4	Inhibiert	-2,4	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
FOXM1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-3,3
FOXO1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4	Inhibiert	-3,3
GLI1	Inhibiert	-2,5	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
HMGA1	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
HNF4A	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,1	Aktiviert	2,1	Aktiviert	2,0
HOXB4	Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
IKZF1	Aktiviert		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
IRF3	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
IRF7	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,9	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
IRF9	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
KDM5B	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,4	n.s.v.		Aktiviert	2,4	Aktiviert	4,2
MED1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.	
MYC	n.s.v.		Inhibiert	-3,2	Inhibiert	-5,2	Inhibiert	-3,9	Inhibiert	-3,0	Inhibiert	-4,1
MYOD1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,9	n.s.v.	
NANOG	Inhibiert	-2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
NFkB1	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
NFkB	Inhibiert	-2,1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
NFKBIA	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,5
NKX2-3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4
NR3C1	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,2	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,2
NUPR1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	4,9	Aktiviert	4,7
PITX2	Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
RB1	Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	4,1	Aktiviert	4,0
RBL1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	3,6	Aktiviert	3,9
SIRT2	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
SMARCA4	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,4	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
SMARCB1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,1	n.s.v.		Aktiviert	4,0

SNAI1	Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
SP1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4	n.s.v.	
SREBF1	Inhibiert	-2,5	n.s.v.		Inhibiert	-3,8	Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.	
SREBF2	Inhibiert	-2,2	n.s.v.		Inhibiert	-3,5	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
STAT5B	Inhibiert	-2,1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
TBX2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-3,7	Inhibiert	-5,0
TCF3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	3,7
TFDP1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.	
TOB1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,8	Aktiviert	2,2
TP53	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,8	Aktiviert	3,8	Aktiviert	2,6	Aktiviert	5,4
TP63	Inhibiert	-2,8	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,5	n.s.v.	
TP73	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,1	n.s.v.	
TRIM24	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
XBP1	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
ZNF217	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	

(*) Bias; n.s.v. = nicht signifikant verändert

Tabelle 9.3-17 Extrapolierte Aktivität von Transkriptionsfaktoren bei MV4;11-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit CFI-3

Zeit:	Vier Stunden				Acht Stunden				16 Stunden			
	0,5 % FKS		10 % FKS		0,5 % FKS		10 % FKS		0,5 % FKS		10 % FKS	
Serumgehalt:	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score	Status	Z-Score
AR	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,6	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
ATF4	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,6	Inhibiert	-2,6	n.s.v.		Inhibiert	-2,2
CDKN2A	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,8	Aktiviert	3,5	Aktiviert	5,0	Aktiviert	6,3
CEBPE	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,4	n.s.v.		Aktiviert	2,4
CREBBP	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4
E2F1	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,5	Inhibiert	-2,2	Inhibiert	-5,3	Inhibiert	-4,7
E2F2	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,0	Inhibiert	-2,0	Inhibiert	-2,2	Inhibiert	-3,6
E2F3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,8	Inhibiert	-2,9
EGR1	Inhibiert	-2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
EZH2	Inhibiert	-2,6	Inhibiert	-2,2	Inhibiert	-2,2	Inhibiert	-2,6	n.s.v.		n.s.v.	
FOXM1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,5	Inhibiert	-3,6
FOXO1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-3,2	Inhibiert	-2,7
FOXO3	n.s.v.		Aktiviert	2,3	n.s.v.		Aktiviert	2,8	n.s.v.		Aktiviert	2,1
HDAC	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,7
HMGA1	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
HNF4A	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,2	Aktiviert	2,6
HOXB4	Inhibiert	-2,2	Inhibiert	-2,0	Inhibiert	-2,0	Inhibiert	-2,2	n.s.v.		Inhibiert	2,0
HOXD10	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
IFI16	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,1	n.s.v.	
IKZF1	n.s.v.		Aktiviert	2,1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	

IRF7	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,4	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
IRF9	n.s.v.		Aktiviert	2,0	n.s.v.		Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.	
JUN	n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
KDM5B	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	3,0	Aktiviert	3,0	Aktiviert	3,6	Aktiviert	5,3
MAX	n.s.v.		Inhibiert	-2,6								
MED1	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,0	Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.	
MXI1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,2	n.s.v.		Aktiviert	2,4
MYBL2	n.s.v.		Inhibiert	-2,2								
MYC	Inhibiert	-2,3	Inhibiert	-3,1	Inhibiert	-6,4	Inhibiert	-6,0	Inhibiert	-2,7	Inhibiert	-7,7
MYOD1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.	
NFE2L2	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4	Inhibiert	-2,9	n.s.v.		n.s.v.	
NKX2-3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,3	n.s.v.	
NOTCH1	n.s.v.		Inhibiert	-2,4	n.s.v.		Inhibiert	-2,1	n.s.v.		n.s.v.	
NR3C1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,1	n.s.v.		Aktiviert	2,5
NUPR1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	5,2	Aktiviert	6,4
PAX8	n.s.v.		Inhibiert	-2,2								
PPARG	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,3	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
PPARGC1B	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
RB1	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,4	Aktiviert	2,1	Aktiviert	4,6	Aktiviert	4,5
RBL1	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,4	n.s.v.		Aktiviert	4,2	Aktiviert	4,0
REL	n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
SIN3A	Inhibiert	-2,0	n.s.v.									
SIRT1	n.s.v.		Aktiviert	2,5								
SIRT2	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
SMARCA4	n.s.v.		Aktiviert	2,4								
SMARCB1	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,3	Aktiviert	2,1	n.s.v.		Aktiviert	4,1
SNAI1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,2	Aktiviert	2,2	Aktiviert	2,2
SP1	Inhibiert	-2,0	n.s.v.		Inhibiert	-2,1	n.s.v.		Inhibiert	-2,2	Inhibiert	-2,1
SPI1	n.s.v.		Aktiviert	2,4								
SREBF1	Inhibiert	-2,7	Inhibiert	-2,1	Inhibiert	-4,3	Inhibiert	-3,5	n.s.v.		n.s.v.	
SREBF2	Inhibiert	-2,4	n.s.v.		Inhibiert	-3,9	Inhibiert	-3,1	n.s.v.		n.s.v.	
STAT5A/B	n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
TBX2	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,6	Inhibiert	-4,0	Inhibiert	-5,2
TCF3	n.s.v.		Aktiviert	3,8								
TFDP1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,4	Inhibiert	-2,2
THRB	Aktiviert	2,4	n.s.v.		Aktiviert	2,0	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.	
TOB1	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,6	Aktiviert	2,8
TP53	n.s.v.		n.s.v.		Aktiviert	2,0	Aktiviert	3,0	Aktiviert	2,7	Aktiviert	5,8
TP63	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,0	Inhibiert	-2,1	n.s.v.	
TP73	n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		n.s.v.		Inhibiert	-2,2	n.s.v.	

(*) Bias; n.s.v. = nicht signifikant verändert

Tabelle 9.3-18 Expression von interferoninduzierbaren Genen in MV4;11 durch Behandlung mit verschiedenen FLT3-siRNAs und Luciferase-siRNAs

(angegeben ist der *Change factor* zur Referenz (Unbehandelte Zellen und RISC-free-siRNA); 1 entspricht einer Verdopplung, -1 entspricht einer Halbierung des Signals)

	IFI35	STAT1	IFI6	PMP22	ISG15	IRF7	IFITM1	IRF9
FLT3-10_4H	0.3	0.1	0.3	-1.4	0.2	0.4	0.0	0.2
FLT3-11_4H	0.2	0.0	0.1	-0.5	0.5	0.1	0.1	-0.1
FLT3-12_4H	0.2	0.3	0.2	-1.6	0.3	0.6	0.1	0.2
LUC_4H	0.3	-0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	-0.1
FLT3-10_8H	0.1	0.1	0.4	-0.8	-0.3	0.8	-0.1	0.3
FLT3-11_8H	-0.1	0.1	0.0	-0.6	-0.3	0.3	-0.2	0.0
FLT3-12_8H	0.1	0.0	0.2	-1.4	-0.4	1.1	-0.1	0.2
LUC_8H	-0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1
FLT3-10_16H	0.2	0.2	0.2	-1.5	-0.6	1.2	0.1	0.8
FLT3-11_16H	0.4	0.0	0.3	-1.3	-0.4	0.7	0.1	0.1
FLT3-12_16H	0.3	0.1	0.4	-1.2	-0.6	1.0	0.0	0.4
LUC_16H	-0.1	0.0	-0.2	0.0	-0.2	0.1	-0.1	-0.2
FLT3-10_24H	0.3	0.0	0.9	-2.7	0.0	0.3	0.2	0.6
FLT3-11_24H	0.1	-0.1	0.7	-2.6	-0.1	0.3	0.1	0.2
FLT3-12_24H	0.1	0.0	1.2	-2.9	-0.1	0.5	0.1	0.8
LUC_24H	0.2	0.1	0.2	0.2	0.0	-0.3	-0.3	0.0

9.4 Gene set enrichment-Analysen

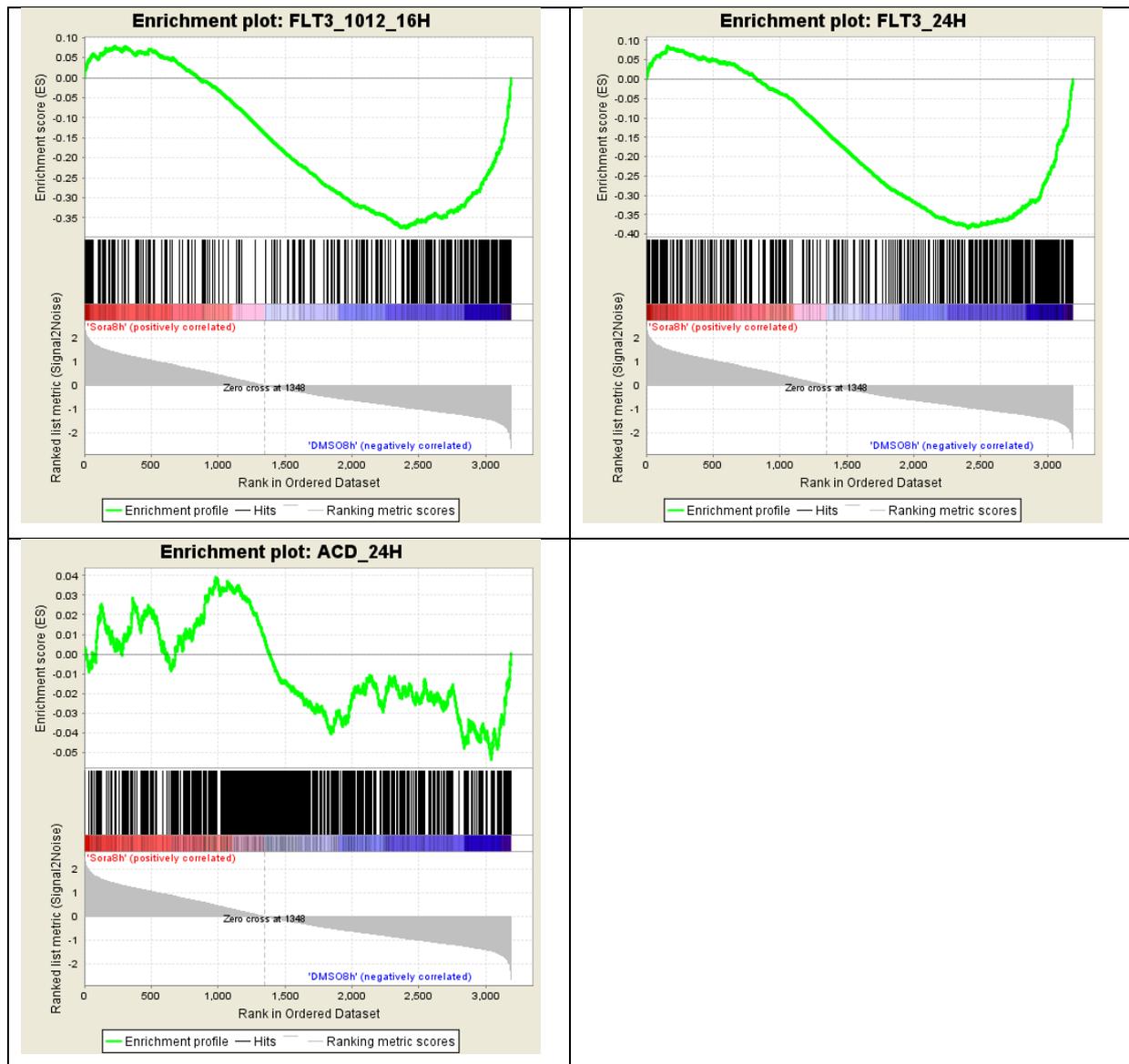


Abbildung 9.4-1: Gene set enrichment-Analysen für die Transkriptionsänderungen bei MV4;11 nach achtstündiger Behandlung mit Sorafenib im Vergleich zu den Genlisten für die Behandlung mit FLT3-siRNAs.

Der obere Bereich des Plots stellt den (laufenden) ES graphisch dar. Der ES für eine jeweilige Genliste wird durch das Maximum der Kurve definiert. Im Bereich der senkrechten Striche in der Mitte werden die einzelnen Treffer, also die Übereinstimmungen zwischen Expressionsliste und Genliste, angezeigt. Der farbige Balken in der Mitte repräsentiert die geordnete Expressionsdatenliste, darunter sind die dazugehörigen Werte der Funktion, anhand derer geordnet wurde, dargestellt.

9.5 Schnittmengen der Transkriptionsmuster der Behandlungen mit Kinaseinhibitoren

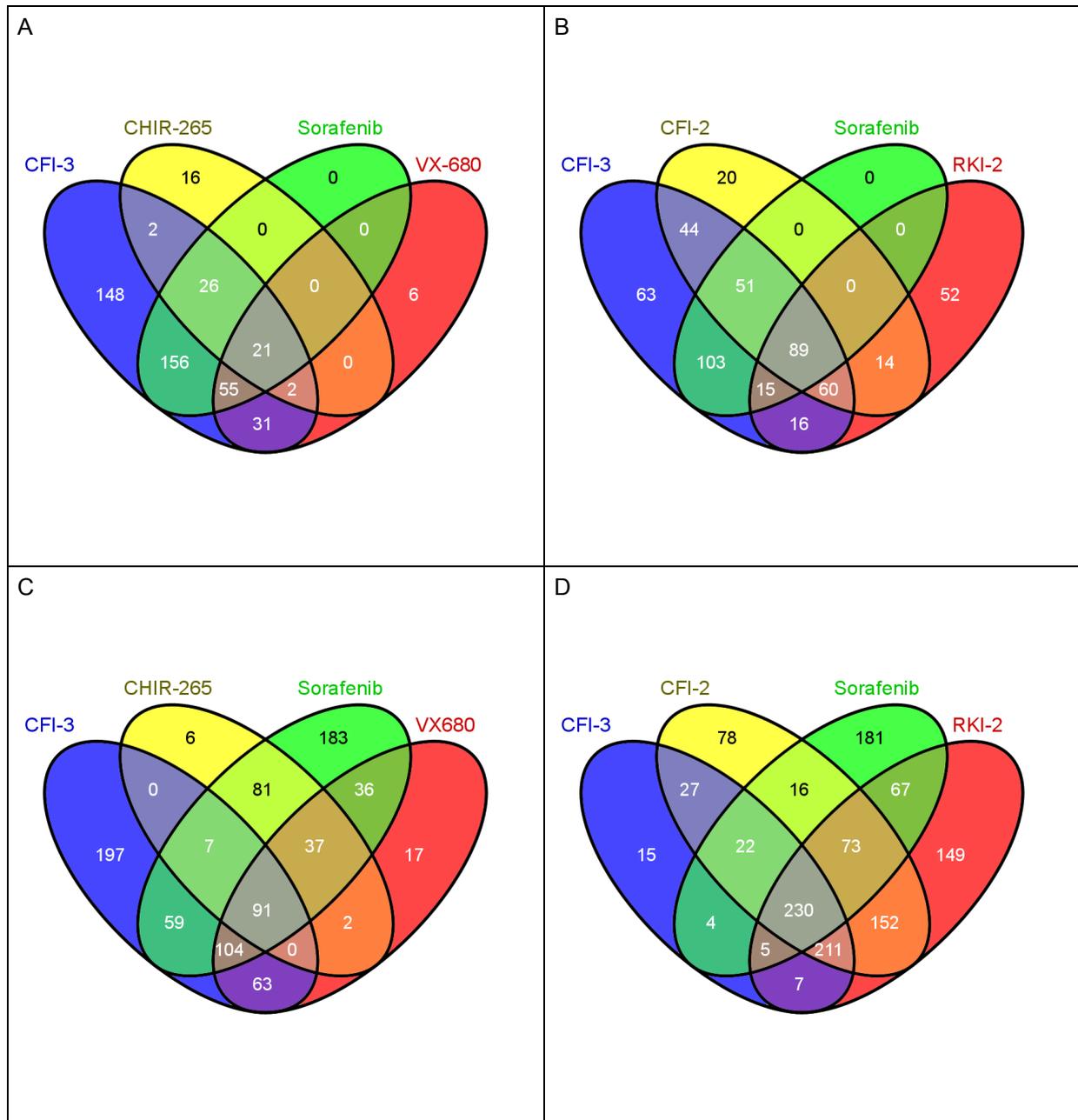


Abbildung 9.5-1: Venndiagramme der Transkriptionsänderungen in MV4;11 nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen Kinaseinhibitoren

A und B: Anzahl induzierter Gene; C und D: Anzahl reprimierter Gene

Danksagung

Primär gilt mein Dank Herrn Dr. Helmut Burtscher, der mir das Thema überlassen hat und in dessen Arbeitsgruppe ich die praktischen Arbeiten ausgeführt habe. Hierbei möchte ich besonders für die hilfreichen Anregungen und seine schier endlose Geduld beim Verfassen dieser Arbeit danken. Ebenso danke ich Herrn Dr. Gerhard Niederfellner für die zahlreichen Anregungen und die Unterstützung beim Verfassen der Publikation.

Herrn Prof. Martin Biel möchte ich danken für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Georg-Burkhard Kresse bedanke ich mich für die Durchsicht der Dissertation und seine vielen konstruktiven Ratschläge.

Meinen Laborkolleginnen Ute Bär, Klara Palme und Claudia Vetter gilt mein Dank für die wunderbare Atmosphäre und Unterstützung in allen Entstehungsphasen dieser Arbeit. Durch Euch hab ich nicht nur fachlich viel gelernt.

Dank sagen möchte ich auch allen anderen Kollegen der Onkologie-Abteilung, die mich unterstützt haben, sei es mit hilfreichem Rat bei der Etablierung von Testsystemen oder durch aufmunternde Worte.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihren stetigen Rückhalt, ihr Verständnis und die unzähligen Aufmunterungen. Eure Unterstützung half mir auch die widrigsten Zeiten zu überwinden.

Widmen möchte ich diese Arbeit Dr. Klaus Oberleiter, der im November 2010 seinen Kampf gegen AML letztendlich doch verloren hat - trotz zwischenzeitlicher Remissionen durch Chemotherapie und Transplantation.