

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

**Charakterisierung von FLT3 assoziierten  
Signaltransduktionsproteinen und TET2 als epigenetischer  
Regulator in der akuten myeloischen Leukämie**

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

vorgelegt von  
Judith Hecker  
aus Karlsruhe

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Irmela Jeremias, Prof Dr. Heinrich Leonhardt

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Harald Polzer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2017

# Eidesstattliche Versicherung

Hecker, Judith

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## **Charakterisierung von FLT3 assoziierten Signaltransduktionsproteinen und TET2 als epigenetischer Regulator in der akuten myeloischen Leukämie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, August 2016

Judith Hecker

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti, Alpha
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AKT	Protein-Kinase-B
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
CBL	engl. casitas B-lineage lymphoma protein
CC	coiled-coil
CIN85	engl. CBL-interacting protein of 85kDa
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
DNA	engl. desoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. epidermal growth factor
EGFR	engl. epidermal growth factor receptor
FAB	French-American-British
FACS	engl. fluorescence activated cell sorter
FKS	fötales Kälberserum
FL	FLT3-Ligand
FLT3	engl. FMS-like tyrosin kinase 3
GRB2	engl. growth factor receptor-bound protein 2
h	Stunde
HBS	engl. hepes-buffered saline solution
IL-3	Interleukin-3
ITD	engl. internal tandem duplication
JM	juxtamembranös
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
min	Minute

MIG	pMSCV-IRES-eGFP
MIY	pMSCV-IRES-eYFP
MPN	myeoloproliferative Neoplasien
MLL	engl. mixed-lineage leukemia
NPM1	Nucleophosmin Member 1
OS	engl. overall survival
PBS	engl. phosphat buffer saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PTK	Proteintyrosinkinase
RING	engl. really interesting new gene
rpm	engl. rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SB1	engl. SETA binding protein 1
SCF	engl. stem cell factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	engl. SRC-homology 2
SH3	engl. SRC-homology 3
SNP	engl. Single Nucleotide Polymorphism
STAT5	engl. signal transducer and activator of transcription 5
TET	Tet-Methylcytosin-Dioxygenase
TKB	Tyrosinkinasebindung
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
U	engl. Unit
VCM	engl. virus containing medium
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor
VEGFR	engl. vascular endothelial growth factor receptor
WHO	engl. World Health Organization
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius

5-hmC	5-Hydroxy-Methylcytosin
5-mC	5-Methylcytosin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die akute myeloische Leukämie	1
1.2	Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3	3
1.2.1	Struktureller Aufbau und Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3	4
1.2.2	Signalkaskaden und Mutationen des FLT3-Rezeptors	5
1.2.3	Funktion von FLT3 in der malignen Hämatopoese	6
1.3	CBL, CIN85 und SB1 in der Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen	8
1.4	TET2 als epigenetischer Regulator	13
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Material	17
2.1.1	Inhibitoren, Enzyme, Zytokine und Chemikalien	17
2.1.2	Software	19
2.1.3	Kits	20
2.1.4	Laboraausstattung	20
2.1.5	Zelllinien	21
2.1.6	Antikörper	22
2.1.7	Plasmide	23
2.1.8	Oligonukleotide	24
2.1.9	Puffer, Medien, Lösungen	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Zellkultur	26
2.2.1.1	Zellkultur von adhärenenten Suspensionszellen	26
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
2.2.1.3	Transiente Transfektion	27
2.2.1.4	Stabile Ba/F3-Zell-Transduktion	27
2.2.1.5	Lebendzellzahl-Bestimmung	28
2.2.1.6	Apoptosemessung mit Annexin-V-/7-AAD-Färbung	28
2.2.1.7	Expressionsanalyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie	29
2.2.1.8	Hungern der Zellen und Stimulation vor der Zellyse	29
2.2.1.9	Immunfluoreszenz von adhärenenten Zellen (Immunostaining)	29
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.2.1	Proteinlysate	30
2.2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	30
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.2.4	Western-Blot	31
2.2.2.5	Strippen der Nitrozellulosemembran	31
2.2.3	Bakterienkultur	32
2.2.3.1	Transformation kompetenter E.coli Bakterien	32
2.2.3.2	Plasmid-DNA-Präparation	32
2.2.3.2.1	Mini-Präparation	32
2.2.3.2.2	Maxi-Präparation	32
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.4.1	DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme	33
2.2.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.4.3	Isolierung von mRNA	34
2.2.4.4	Die Synthese von cDNA durch reverse Transkription	34
2.2.4.5	Extraktion genomischer DNA	34
2.2.4.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.2.4.7	Ortsgerichtete Mutagenese	35
2.2.4.8	Sequenzierung	35
2.2.5	Präparation der Patientenproben	35

2.2.5.1	<i>Ficoll</i> .....	35
2.2.5.2	<i>MACS Zellseparation</i> .....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1	Funktionelle Charakterisierung von CIN85 und SB1 in rezeptor-exprimierenden Zellen	37
3.1.1	<i>Endogene Expression von CIN85 in AML-Zelllinien</i> .....	38
3.1.2	<i>Expressionsnachweis von FLT3-WT, CIN85-WT und SB1-WT und Mutanten in einzeln bzw. doppelt-transduzierten Ba/F3-Zelllinien</i> .....	39
3.1.3	<i>Untersuchung einer möglichen Induktion von IL-3-unabhängigem Ba/F3-Zellwachstum durch SB1-Mutanten</i> .....	41
3.1.4	<i>Untersuchung einer möglichen Apoptoseresistenz nach Zytokinenzug durch SB1-Mutanten</i> .....	44
3.1.5	<i>Die Internalisierung des FLT3-Rezeptors wird durch die Koexpression der CIN85 bzw. SB1-Konstrukte nicht beeinflusst</i> .....	45
3.1.6	<i>Detektion der Lokalisation von SB1-WT und SB1-Mutanten mittels Immunostaining</i> .....	47
3.1.7	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von CIN85 und SB1 in rezeptor-exprimierenden Zellen</i> .....	49
3.2	Vergleich des transformierenden Potentials der AKT1-E17K-Mutante in FLT3-exprimierenden Zellen mit der FLT3-ITD-Mutante W51 .....	49
3.2.1	<i>Stabile Expression der FLT3- und AKT1-Konstrukte in den Ba/F3-Zelllinien</i> .....	50
3.2.2	<i>Vergleich des pro-proliferativen Phänotyps der AKT1-E17K-Mutante und FLT3-ITD-Mutante W51 in den Ba/F3-Zelllinien und Inhibition des AKT1-E17K-induzierten proliferativen Phänotyps mittels AKT- und FLT3-Inhibitoren</i> .....	51
3.2.3	<i>Einfluss der AKT1-E17K-Mutante auf die Apoptose nach IL-3-Entzug</i> .....	54
3.2.4	<i>Untersuchung der Signalwege STAT5, AKT und MAPK in den Ba/F3-FLT3/AKT-Zelllinien</i> .....	56
3.2.5	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse des biologischen Phänotyps von AKT1-E17K und FLT3-ITD im Vergleich</i> .....	58
3.3	Der epigenetische Regulator TET2 .....	59
3.3.1	<i>Funktionelle Charakterisierung von hTET2-WT in Ba/F3-Zellen</i> .....	59
3.3.2	<i>Screening von CMML-Patienten auf TET2-Mutationen</i> .....	60
3.3.3	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse des epigenetischen Regulators TET2</i> .....	62
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>63</b>
4.1	Charakterisierung der neu detektierten Punktmutationen in SB1 .....	63
4.2	Der biologische Phänotyp von AKT1-E17K und FLT3-ITD im Vergleich .....	66
4.3	Mutationen des epigenetischen Regulators TET2 in CMML-Patienten .....	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>82</b>
7.1	Tabellen .....	82
7.2	Abbildungen .....	83
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>85</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Die akute myeloische Leukämie

Bei akuten Leukämien handelt es sich um hochmaligne Stammzellerkrankungen mit klonaler Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen, die unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod führen [1]. Durch maligne Transformation von Stammzellen kommt es zur Vermehrung eines leukämischen Zellklons, auch Blast genannt, welcher neben einem unkontrollierten Wachstum auch einen apoptotischen und Differenzierungsblock aufweist, der auf verschiedenen Ebenen der Zellreifung entstehen kann. Die autonome Proliferation einer malignen Zellpopulation mit Akkumulation unreifer und funktionsloser Blasten führt zur Verdrängung der normalen Hämatopoese mit konsekutiver Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie als Folge der Knochenmarkinsuffizienz. In Abhängigkeit der eingeschlagenen Differenzierungsrichtung unterscheidet man die akute lymphatische Leukämie, die durch unkontrollierte Proliferation von Vorläuferzellen der Lymphopoese gekennzeichnet ist, von der akuten myeloischen Leukämie, bei der es sich um eine Neoplasie der Myelopoese mit variabler Beteiligung myeloischer Zellen, insbesondere der Granulozyten und Monozyten, handelt. Selten gibt es biphänotypische Formen [2].

Die akute myeloische Leukämie ist mit 80 % die häufigste Unterform der akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Die Inzidenz der AML liegt bei 3-4/100.000, im Alter kontinuierlich zunehmend mit einem mittleren Erkrankungsalter von ca. 65 Jahren [1, 3, 4]. Ab einem Infiltrationsgrad des Knochenmarks mit mehr als 20 % unreifer Vorläuferzellen ist laut WHO („World-Health-Organization“)-Klassifikation eine akute Leukämie gegeben [5].

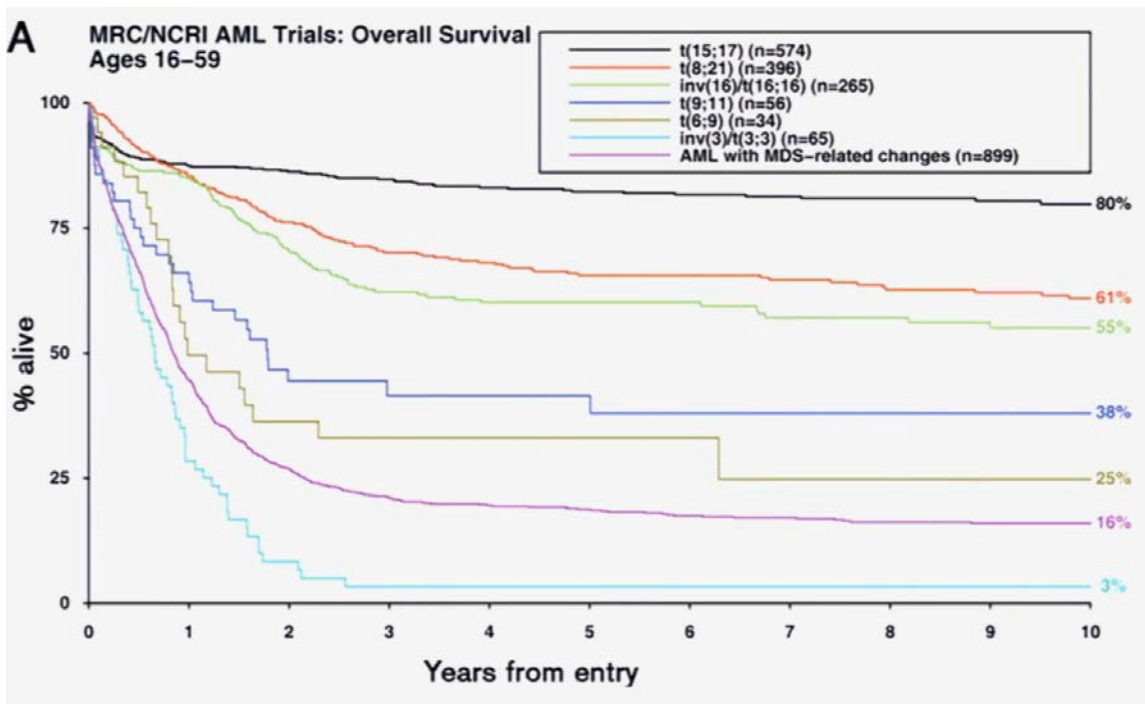
Neben der Einteilung der AML nach zytomorphologischen Gesichtspunkten wie in der FAB („French-American-British“)-Klassifikation aus dem Jahr 1976, die auf einer Analyse von Knochenmark- oder peripheren Blutausstrichen durch zytomorphologische und zytochemische Methoden basiert, erlaubt die neue WHO-Klassifikation von 2008 (siehe Tab. 1.1) durch die Kombination von verschiedenen additiven Techniken wie Immunphänotypisierung, Zytogenetik sowie Molekulargenetik eine genaue Definition von Subtypen in der AML und damit eine präzise Diagnosestellung [2, 5].

**Tabelle 1.1: Einteilung der akuten myeloischen Leukämie.** Einteilung nach der WHO 2008-Klassifizierung [2, 5]. Tabelle aus [2].

<b>Akute myeloische Leukämie</b>
<b>AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Abnormalitäten</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)</li> <li>- mit inv(16)(p13;q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBF<math>\beta</math>/MYH11)</li> <li>- akute Promyelozytenleukämie: mit t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR<math>\alpha</math>) und Varianten</li> <li>- mit 11q23 (MLL) Abnormalitäten</li> </ul>
<b>AML mit Dysplasie mehrerer Zellreihen (multilineär)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mit MDS-Vorphase</li> <li>- ohne MDS-Vorphase</li> </ul>
<b>AML und MDS, therapiebedingt</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- nach alkylierenden Substanzen</li> <li>- nach Topoisomerase-Inhibitoren</li> </ul>
<b>AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mit minimaler Ausreifung</li> <li>- ohne Ausreifung</li> <li>- akute myelomonozytäre Leukämie</li> <li>- akute monoblastische und monozytäre Leukämie</li> <li>- akute Erythroleukämie</li> <li>- akute Megakaryoblastenleukämie</li> <li>- akute Basophilenleukämie</li> <li>- akute Panmyelosis mit Myelofibrose</li> <li>- myeloisches Sarkom</li> <li>- akute biphänotypische Leukämie</li> </ul>

Vor allem Zyto- und Molekulargenetik sind für die Wahl der Therapie, aber auch für die Prognoseeinschätzung unerlässlich, gezielte Therapieansätze rücken immer mehr in den Fokus moderner Behandlungskonzepte. Rund 60 % der AML-Patienten weisen in der nicht vorbehandelten zytogenetischen Analyse einen abnormalen Karyotyp auf, der je nach zytogenetischer Entität, wie in Abbildung 1.1 zu sehen, unterschiedlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben der AML-Patienten hat [6, 7].

Auch in der Gruppe der AML-Patienten mit normalem Karyotyp (rund 40 %) wurde durch molekulare Analysen eine prognostische Signifikanz und Relevanz der sehr heterogenen genetischen Alterationen entdeckt. Zu diesen gehören beispielsweise Mutationen des Gens für die Rezeptor-Tyrosinkinase „fibroblast-macrophage stimulating factor receptor (FMS)-related tyrosine kinase 3“ (*FLT3*), Mutationen des Nucleophosmin Member 1 (*NPM1*)-Gens, aber auch partielle Tandem-Duplikationen des myeloid/lymphoid oder mixed-lineage leukemia (*MLL*)- sowie Überexpression des *BAALC*-Gens [8].



**Abbildung 1.1: Der Einfluss des Karyotyps auf das Überleben von jüngeren Erwachsenen mit AML.** Dargestellt ist das Gesamtüberleben von Erwachsenen in einem Alter zwischen 16-59 Jahren (medianes Alter: 43 Jahre) nach zytogenetischer Aberration. Abbildung aus [7].

## 1.2 Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3

Rezeptor-Tyrosinkinasen sind transmembrane Proteine mit einer eigenen intrinsischen, ligandenstimulierbaren Proteintyrosinkinaseaktivität, die durch reversible Phosphorylierung von Tyrosinen bei zahlreichen Prozessen wie Zellteilung und Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung einer Zelle als auch Gentranskription eine entscheidende Rolle spielen. Beim Vorgang der Phosphorylierung fügen Proteintyrosinkinasen – deren Aktivität in nicht-transformierten Zellen normalerweise streng reguliert wird – einen Phosphatrest an spezifische Tyrosine von Zielproteinen, welche intrazelluläre Signalkaskaden wie Mitoseaktivität und Genaktivierung initiieren [9, 10].

Durch eine deregulierte Kinaseaktivität aufgrund von somatischen Mutationen oder anderen genetischen Alterationen können Rezeptor-Tyrosinkinasen zu potenten Onkoproteinen werden und für die maligne Transformation einer Zelle ursächlich sein.

Das humane Genom umfasst 58 Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), die in 20 Familien unterteilt sind. Mehr als die Hälfte dieser sind mit humanen malignen Erkrankungen assoziiert [11]. Alle Rezeptor-Tyrosinkinasen verbindet ihre ähnliche molekulare Architektur, wobei vor allem die extrazelluläre liganden-bindende Domäne die größte Varianz aufweist. Neben der Ligand-bindenden extrazellulären Domäne bestehen RTKs aus der darauffolgenden transmembranösen Domäne mit einer singulären transmembranösen Helix und zudem der zytoplasmatischen Region, die die juxtamembranöse Domäne und die Kinasedomäne beinhaltet [12].

### **1.2.1 Struktureller Aufbau und Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3**

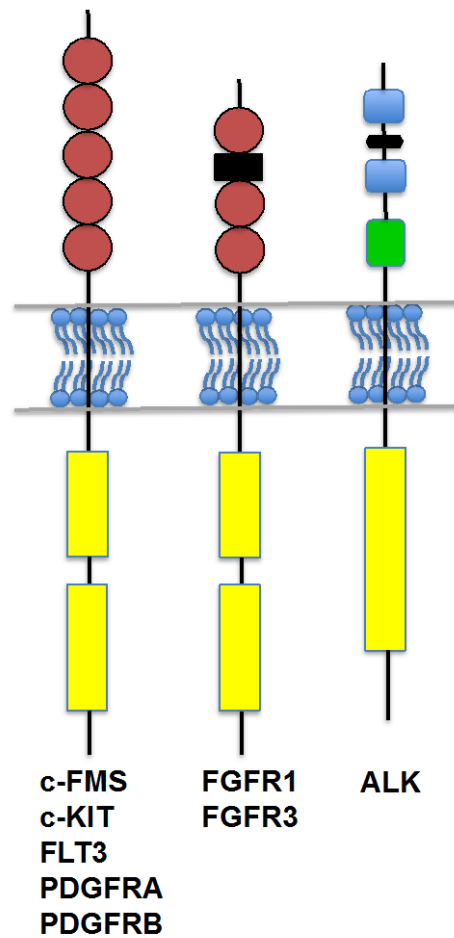
FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), auch FLK-2 (fetal liver kinase-2) oder STK-1 (human stem cell kinase-1) genannt, wurde erstmals 1991 von zwei unabhängigen Gruppen isoliert und das humane *FLT3*-Gen auf Chromosom 13q12 lokalisiert [13-15].

FLT3 kommt eine wichtige Rolle in der Entwicklung pluripotenter Stammzellen und B-Zellen zu und wird größtenteils in hämatopoetischen Stammzellen, frühen, unreifen Vorläuferzellen und dendritischen Zellen exprimiert.

Das humane FLT3-Protein mit 993 Aminosäuren kommt in der Zelle als ein posttranslational N-linked glykosyliertes Protein mit rund 160 kDa, welches in der Plasmamembran lokalisiert ist, sowie als schwächer glykosyliertes Protein mit etwa 140 kDa vor [16, 17].

Mit Progression der Zelldifferenzierung in der Hämatopoese nimmt die Expression des humanen FLT3 (hFLT3) ab. Die Expression des hFLT3 ist auf Stammzellen und Vorläuferzellen wie beispielsweise frühe lymphoide Progenitorzellen, myeloische und granulozytär / makrophagische Progenitorzellen beschränkt [13, 18].

Der FLT3-Rezeptor zählt zu den Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Sie sind durch große Homologie in ihrer Sequenz, aber auch in ihrer Struktur gekennzeichnet. Sie zeigen eine extrazelluläre Domäne bestehend aus fünf immunoglobulin-ähnlichen Domänen, eine transmembranöse Domäne und eine zytoplasmatische Domäne, welche aus juxtamembranöser Domäne und zwei Proteintyrosinkinasedomänen, die durch eine Interkinasedomäne voneinander getrennt sind, besteht [16, 19]. Neben FLT3 besteht die Familie der Klasse-III-Rezeptor-Tyrosinkinasen (siehe auch Abbildung 1.2.1) aus den Rezeptoren „stem cell factor receptor“ (KIT), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) A und B, „colony-stimulating-factor 1“-Rezeptor (CSF1R) sowie „macrophage colony-stimulating factor receptor“ (FMS) [12, 20].



**Abb. 1.2.1: Einige in maligne hämatologische Erkrankungen involvierte Rezeptor-Tyrosinkinase-Familien und deren Aufbau.** Unterschiedliche Rezeptorfamilien mit ihren extrazellulären, transmembranösen und intrazellulären Domänen; in Gelb sind die intrazellulären Kinasedomänen dargestellt. Abbildung nach [21].

## 1.2.2 Signalkaskaden und Mutationen des FLT3-Rezeptors

Der inaktive FLT3-Rezeptor liegt als monomere, unphosphorylierte Form mit einer inaktiven Kinasedomäne in der Membran vor. Die Bindung seines spezifischen Liganden FLT3-Ligand (FL) führt zur Aktivierung und Konformationsänderung des Rezeptors, was durch Freilegung der Dimerisierungsdomäne die Dimerisierung von Rezeptormonomeren induziert. Nach Aktivierung der zytoplasmatischen Kinasedomänen kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten intrazellulärer Rezeptoranteile. Die durch die Tyrosinphosphorylierung geschaffenen Erkennungsmotive für Src-Homologie-2 (SH2)-Domänen anderer zytoplasmatischer Proteine führen dazu, dass diese mit der Kinasedomäne interagieren und ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert werden [22, 23].

Zu den Adapterproteinen des Komplexes der Protein-Protein-Interaktionen, die an der intrazellulären Domäne mit dem aktivierten FLT3-Rezeptor stattfinden, gehören beispielsweise Casitas B-lineage lymphoma (CBL), CBLB (CBLB-related protein), SHIP, GRB2 und GRB2-associated binder 2 (GAB2) [22, 24-27].

Die Kaskade an Phosphorylierungen resultiert in der Aktivierung von Signalkaskaden wie dem „mitogen-activated protein“ (MAP)-Kinase-, Protein-Kinase-B (AKT) / „Phosphatidylinositol-3“ (PI3) - Kinase-Signalweg und dem „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT)-Signalweg, die im Zellkern die transkriptionelle Regulierung von Genen beeinflussen, die Zellüberleben, Proliferation, Apoptose und Differenzierung spezifischer Vorläuferpopulationen steuern [28].

FLT3 kann als Protoonkogen Zellen transformieren und das Überleben und die Proliferation leukämischer Blasten fördern [28]. Das Wildtyp (WT)-FLT3-Protein wird in vielen hämatologischen Tumorerkrankungen exprimiert. Vor allem in der AML mit 70 bis zu 100 % der Patienten und in der ALL finden sich hohe Expressionslevel von WT-FLT3, aber auch in der fortgeschrittenen Krankheitsphase der CML, in der Blastenkrise, wurde die Expression nachgewiesen [16, 29].

### **1.2.3 Funktion von FLT3 in der malignen Hämatopoese**

Zudem zeigten Analysen von leukämischen Blasten in AML-Patienten somatische Mutationen im *FLT3*-Gen. Die 1996 von Nakao *et al.* zuerst beschriebenen „internal tandem duplication“ (ITD)-Mutationen des *FLT3*-Gens stellen mit beispielsweise 20 - 30 % in der AML die häufigsten *FLT3*-Mutationen dar [16, 30]. Durch in-frame Duplikationen eines Fragments der juxtamembranösen Domäne, die in ihrer Länge von 2 bis 68 Aminosäuren variieren, resultiert eine konstitutive Autophosphorylierung und damit Aktivierung des FLT3-Rezeptors aufgrund von gestörter Autoinhibition [31]. FLT3-ITD-Mutationen korrelieren mit schlechter Prognose, erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit, erniedrigter Remissionsdauer und erniedrigtem Gesamtüberleben [32-34].

Mit bis zu 7 % in der AML ist die zweite Tyrosinkinasedomäne (TKD) des FLT3-Rezeptors betroffen und stellt eine weitere häufige FLT3-Mutation dar. Hierbei kommt es durch Punktmutationen zum Austausch des Aspartats 835 meist gegen ein Tyrosin (D835Y), seltener gegen ein Histidin, Valin oder Glutamat oder aber durch kleine Deletionen und Insertionen zu konstitutiver ligandenunabhängiger Rezeptoraktivierung. Eine prognostische Auswirkung der TKD-Mutationen konnte bisher nicht nachgewiesen werden und bleibt ungewiss [35-37].

Des Weiteren wurden Punktmutationen wie beispielsweise in der juxtamembranösen Domäne

(FLT3-JM-PMs) und Längenmutationen wie FLT3-ITD-W51, FLT3-ITD-NPOS und FLT3-ITD-W78 beschrieben [38-42].

Auch durch Mutationen verursachte konstitutive Aktivierung nachgeschalteter Signalwege von RTKs wie zum Beispiel im PI3K/AKT-Signalweg stellt ein bekanntes Charakteristikum der AML und anderer humaner Tumorerkrankungen dar [43, 44]. Zu Beginn des PI3K/AKT-Signalwegs steht die Aktivierung der Phosphoinositid-Kinase (PI3K). Sie kann durch mehrere Mechanismen stattfinden: beispielsweise durch direkte Bindung an phosphorylierte RTKs oder assoziierte Tyrosinkinase oder über die membrangebundene GTPase Ras. Aktivierte PI3K bindet an der Membrannenseite Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und phosphoryliert dieses zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) [45]. Als sekundärer Botenstoff lokalisiert PIP<sub>3</sub> die Proteinkinase B (AKT), welche zu den Serin-Threonin-Kinasen gehört, an die Plasmamembran. AKT wird dort mittels Phosphorylierung am Threonin 308 durch die 3-phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) sowie mittels Phosphorylierung am Serin 473 durch eine weitere Kinase aktiviert [46]. Die Downstream-Wirkungen von AKT - wie Blockade der Apoptose, Aktivierung der Translation oder Verhinderung von zellteilungshemmender Wirkung - sind vielfältig. Über die Aktivierung multipler Effektoren und Substrate generiert AKT-Signale, die in die Regulation der Apoptose und Proliferation eingreifen [23, 47, 48].

Auch die deregulierte „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT5)-Signalübertragung und konstitutive Aktivierung von STAT5, was zu erhöhter Transkription von antiapoptotischen und pro-proliferativen Genen führt, wurde in leukämischen Blasten von AML-Patienten nachgewiesen [49, 50]. Der STAT5-Signalweg wird entweder direkt von RTKs, über JAK-Kinasen oder über SRC family-Kinasen (SFK) aktiviert [51]. Phosphorylierte STATs dimerisieren und gelangen als STAT-Dimere in den Zellkern, in dem sie durch Bindung an DNA die Expression von Zielgenen verändern. Die aberrante Aktivierung des STAT-Signalwegs bei FLT3-ITDs induziert zu einem entscheidenden Teil die maligne Transformation [50].

Die aberrant aktivierte FLT3-Kinase ist ein attraktiver Angriffspunkt zielgerichteter Therapien. Mehrere FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) befinden sich in präklinischen und klinischen Studien, wobei sich in den meisten AML-Patienten nicht anhaltende oder eingeschränkte Effektivität der Inhibitoren zeigt. Ein weiteres Problem stellt Resistenzbildung dar, sodass eine Kombination von TKI mit beispielsweise konventioneller Chemotherapie als neue Therapieoption evaluiert wird [52-54].

### 1.3 CBL, CIN85 und SB1 in der Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen

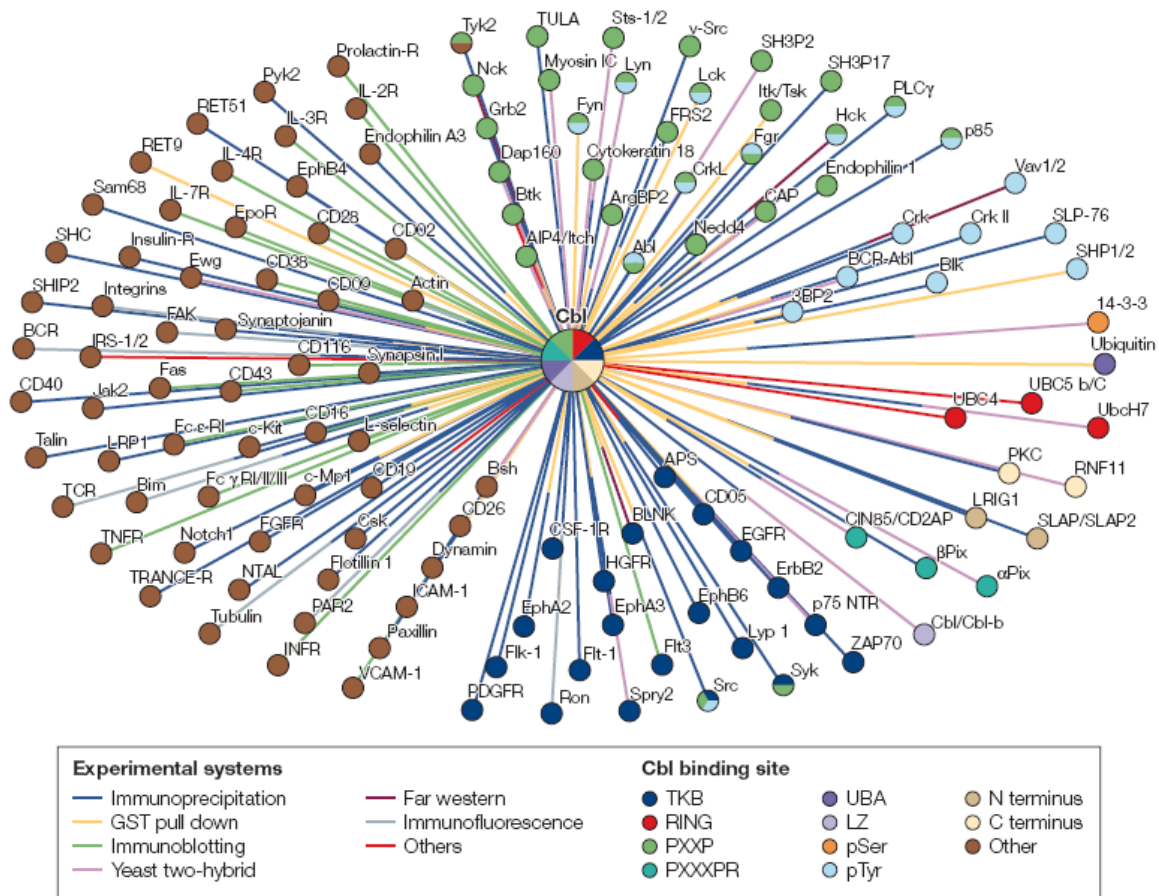
Die Identifikation des Protoonkogens CBL erfolgte erstmals 1989 in mit dem murinen Leukämie-Virus Cas-NS1 infizierten Mäusen, welcher zur Induktion von pro-B-Lymphomen und myeloischen Leukämien führt [55].

CBL, auch Casitas B-lineage lymphoma genannt, ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, 120 kDa groß und hoch konserviert. Als zur CBL-Familie der Säugetiere zugehörig konnten bisher die drei Proteine CBL (c-CBL), CBL-b und CBL-3 charakterisiert werden. CBL gilt unter anderem als Negativregulator, der das Proliferationssignal von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie FLT3 und KIT abschwächt, indem er zum Beispiel deren lysosomalen Abbau und Ubiquitinierung initiiert [56-60].

Das Protein CBL besteht aus einer N-terminalen Tyrosinkinase-Bindungsdomäne (TKB) zur Bindung phosphorylierter Tyrosine von aktivierten RTKs und PTKs [61]. Diese ist gefolgt von der LINKER- und der RING-Finger-Domäne. Die RING-Finger-Domäne ist für die Rekrutierung von E2-Enzymen und die Vermittlung des Ubiquitintransfers auf Zielproteine verantwortlich [62]. Die LINKER-Domäne spielt eine entscheidende Rolle in der Positionierung der TKB-Domäne zur RING-Finger-Domäne und ist entscheidend an der Effektivität des Ubiquitintransfers beteiligt [63]. C-terminal des RING-Fingers folgt eine Prolin-reiche Region (PXXP), C-terminale Phosphorylierungsstellen, die „ubiquitin-assoziierte“ (UBA)-Domäne und eine Leuzin-Zipper (LZ)-Domäne, wodurch CBL als Multi-Adapter-Protein fungiert als auch die Dimerisierung von CBL ermöglicht wird [64-66].

CBL ist als Multi-Adapter-Protein und Ubiquitin-Ligase in eine Vielfalt von zellulären Prozessen involviert. Abbildung 1.3.1 zeigt einen Ausschnitt der Komplexität, mit wie vielen bisher bekannten Proteinen CBL interagiert bzw. wie viele Proteine durch CBL reguliert werden. Eine wichtige Rolle in der Rezeptor-Endozytose spielen beispielsweise die Adaptermoleküle CIN85 und CD2AP [64].



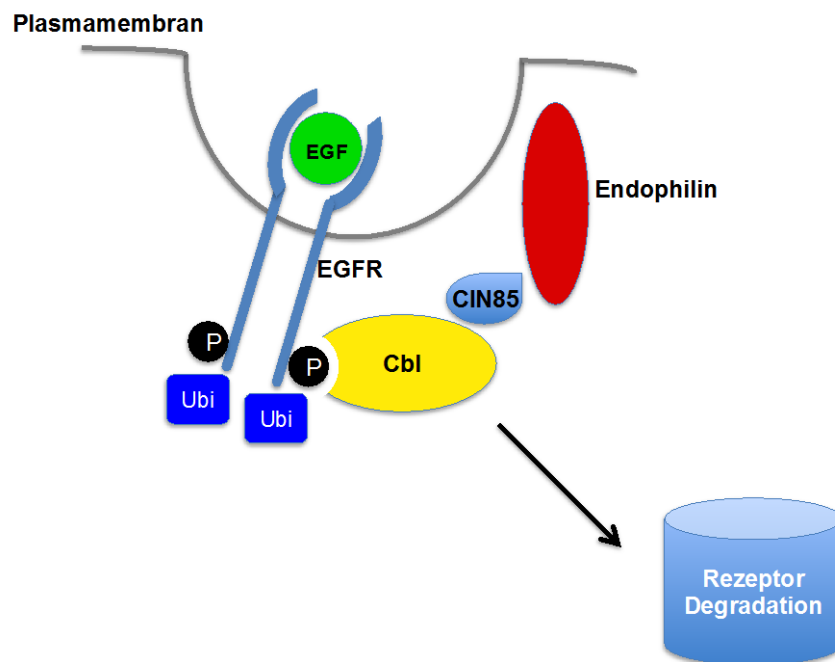


**Abb. 1.3.1: Das CBL-Interaktom.** Die Darstellung des Osprey-Diagramms zeigt die momentan bekannten, mit CBL interagierenden Proteine in einer Übersicht. Die Gruppierung erfolgte entsprechend der CBL-Bindungsstelle mittels farbiger Punkte. Abbildung aus [64].

Bereits Im Jahr 2002 wurde für CBL-b und 2003 für c-CBL eine atypische Poly-Prolin-Arginin-Region (PXXXPR), die spezifisch von den SH3-Domänen von CIN85 erkannt wird, identifiziert [67-69].

CIN85 (CBL-interacting protein of 85kDa), auch als RUK (regulator of ubiquitous kinase), SH3KBP1 (SH3 (Src homology 3)-domain kinase binding protein 1) oder SETA (SH3 domain-containing gene expressed in tumorigenic astrocytes) bekannt, agiert als zytoplasmatisches Multi-Adapter-Protein. Über die C-terminale Region PXXXPR von c-CBL (auch bei CBL-b und einigen anderen Proteinen) erfolgt die Bindung von CIN85 an c-CBL [59, 67-70]. Es entsteht ein CBL-CIN85-Endophilin-Komplex, der mit Induktion einer negativen Membrankurvatur entscheidend für die Invagination der Plasmamembran und somit entscheidend für die frühe Phase der Endozytose und für die Rezeptor-Internalisierung ist [64, 71, 72]. Auch eine Bindung von CIN85 und dessen Homolog CD2AP (CD2-associated protein) an adaptor-

protein-2 (AP-2) als Alternativ-Signalweg zur clathrin-vermittelten Endozytose ist möglich [64]. Die Rolle von CBL und CIN85 am Beispiel der EGFR-Endozytose zeigt Abbildung 1.3.2.



**Abb. 1.3.2: Die Rolle von CBL und CIN85 in der EGFR-Endozytose.** Darstellung der Induktion einer negativen Membrankurvatur und Invagination der Plasmamembran durch die Komplexbildung von EGFR, CBL, CIN85 und die Rekrutierung von Endophilinen. Abbildung nach [73, 74].

CIN85 beeinflusst des Weiteren die Apoptose und ist zudem durch verschiedene Mechanismen in die Negativregulation von CBL-Funktionen involviert. Beispielsweise induziert EGF-Stimulation die Synthese von Sprouty2, welches an der Plasmamembran phosphoryliert wird und die CBL-Bindungsstelle am EGFR imitiert. Die vermehrte Bindung von CBL an Sprouty2 verringert in der Folge die Bindung von CBL am aktivierten EGFR, sodass die Downregulation von EGFR inhibiert wird. Dies ist nur Sprouty-Isoformen möglich, die eine CIN85-Bindedomäne (PXXXPR) besitzen [64, 75].

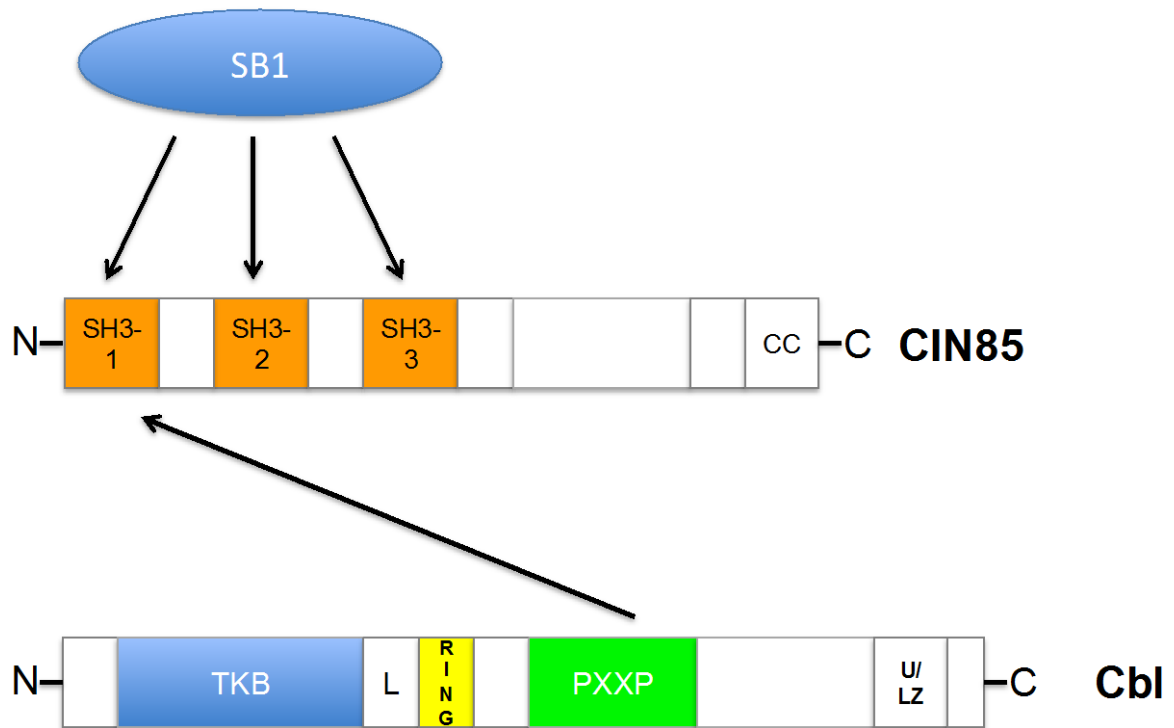
Im Jahr 2010 wurden von J Adélaïde *et al.* 63 MDS-Patienten und 53 CMML-Patienten analysiert. Sowohl bei einem der MDS- (1,6 %) als auch bei einem der CMML-Patienten (1,9 %) wurden mit dem Zugewinn von jeweils genau einer zusätzlichen Kopie des *CIN85*-Gens Alterationen des Gens, das für ein mit CBL interagierendes Protein kodiert, identifiziert. Aufgrund der Tatsache, dass weder bei Mamma- noch bei Kolonkarzinomen eine Amplifikation dieses Gens detektiert werden konnte, spricht diese Alteration für eine Assoziation mit den

Erkrankungen MDS und CMML. Eine ähnliche Rolle wie die von CBL-Mutationen in myeloischen Erkrankungen scheint denkbar [60].

Es sind verschiedene CIN85-Isoformen bekannt; die längste besteht aus drei N-terminalen SH3-Domänen, die die CBL-Bindung vermitteln, gefolgt von einer zentralen Prolin-reichen Domäne und C-terminal einer coiled-coil (CC)-Domäne (siehe Abb. 1.3.3) [73, 76].

Aufgrund der neu gefundenen dritten SH3-Domäne im Jahr 2000 gelang mittels Yeast-two-hybrid-Klonierung die Isolation eines neuen, mit CIN85 assoziierten Gens: *SB1*, auch Seta binding protein 1 oder *SHKBP1* genannt. Wie in Abbildung 1.3.4 dargestellt ist es SB1 *in vitro* möglich, an alle 3 SH3-Domänen von CIN85 zu binden. Außerdem konnte eine starke Interaktion von SB1 mit GRB2 als auch eine schwache Interaktion von CIN85 mit GRB2 nachgewiesen werden, was auf einen möglichen intrazellulären Komplex hinweisen könnte [76]. Eine Überexpression von SHKBP1 zeigt anti-apoptotische Effekte in Zelllinien, was auf eine Rolle als mutmaßliches Protoonkogen schließen lassen könnte [77].

Über Transkriptom-Sequenzierung einer 69jährigen *de-novo*-AML-Patientin, initial bei Erstdiagnose des Knochenmarks und der Remissionskontrolle im peripheren Blut nach Leukozytenregeneration, konnte durch unsere Arbeitsgruppe erstmals eine somatische *SB1*-Mutation beschrieben werden. Die Patientin hatte mit 46, XX[20] einen normalen Karyotyp; eine *FLT3-ITD*, *NPM1*-Mutation als auch partielle Tandem-Duplikation des *MLL*-Gens wurden ausgeschlossen. Die gefundene tumorspezifische Einzelnukleotid-Variante resultierte in der Missense-Mutation in *SB1* (V89I). Aufgrund dieser Identifikation wurde über Kapillarsequenzierung die genomische DNA weiterer 95 zytogenetisch normaler AML-Patienten analysiert. Hierbei konnten zwei weitere Missense-Mutationen von *SB1* (R454Q und R672Q) identifiziert werden, die in Kombination mit *NPM1*- und *FLT3*-Mutationen vorlagen [78].



**Abb. 1.3.3: Die Fähigkeit von SB1, jede der SH3-Domänen von CIN85 zu binden. CIN85 in seiner Funktion als Multi-Adapter-Protein. SB1 bindet an alle drei SH3-Domänen von CIN85. Abbildung nach [76].**

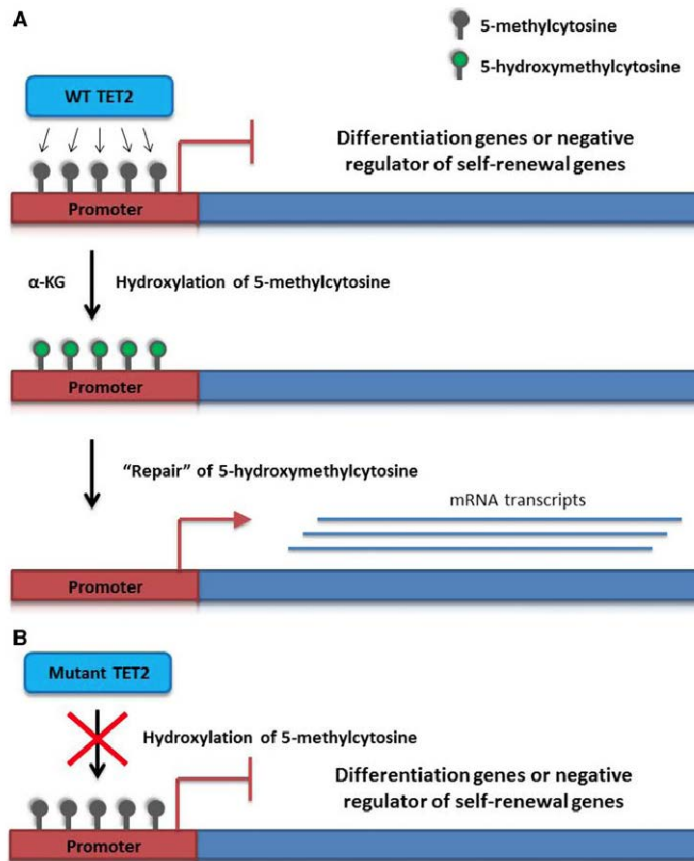
## 1.4 TET2 als epigenetischer Regulator

Die Identifikation von Mutationen in Genen involviert in epigenetische Regulation, wie beispielsweise die des Ten-Eleven Translocation oncogene family member 2 (*TET2*), hat zur deutlichen Erweiterung des Verständnisses der Leukämieentstehung beigetragen.

Das Gen *TET2* - auf Chromosom 4q24 lokalisiert - wurde über SNP-arrays initial eine mögliche Rolle als Tumor-Suppressor-Gen in myeloischen Neoplasien zugewiesen [79, 80]. Mutiertes oder deletiertes *TET2* wurde anschließend in verschiedenen myeloischen Erkrankungen wie in myelodysplastischem Syndrom (MDS), in myeloproliferativen Neoplasien (MPN), in der AML, sekundärer AML und in chronisch myelomonozytärer Leukämie (CMML) beschrieben [79, 81]. Die Gesamtfrequenz der Mutationen beträgt in der AML um die 10-20 %, eine besonders hohe Mutationsfrequenz mit bis zu 50 % wurde in der CMML beschrieben [81]. Aufgrund des Nachweises der Konversion von 5-Methylcytosin (5-mC) zu 5-Hydroxy-Methylcytosin (5-hmC) in DNA durch humanes *TET2* bestätigte sich die Rolle von *TET2* im Rahmen der epigenetischen Expressionskontrolle (siehe Abb. 1.4) [82]. *TET2* katalysiert die Oxidation von 5-mC, was zu einer Demethylierung der DNA führt. Cytosin-Methylierung ermöglicht in Eukaryonten eine epigenetische Regulation, die die Expression des jeweiligen Gens supprimiert (= "Silencing") [83]. Eine eingeschränkte katalytische Aktivität bei *TET2*-Mutationen konnte Ko *et al.* 2010 in Knochenmarksproben von *TET2*-mutierten Patienten nachweisen, die durchweg erniedrigte 5-hmC-Level in genomischer DNA im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben aufwiesen [84].

Kosmider *et al.* beschrieb eine Assoziation von *TET2*-Mutationen mit einem kürzen Gesamtüberleben („overall survival“, OS) bei CMML-Patienten. Andere klinische Studien zeigten entweder keine signifikante Korrelation einer *TET2*-Mutation mit dem Überleben bei AML-Patienten oder längeres OS bei AML-Patienten, sodass die prognostische Relevanz letztlich umstritten bleibt [81, 85-88].

Unumstritten ist die außerordentlich wichtige Rolle von *TET2* in der normalen als auch malignen Hämatopoese sowie seine Rolle in der Entwicklung hämatologischer Neoplasien, die zukünftig mit Sicherheit Fokus weiterer Charakterisierungen sein wird.



**Abb. 1.4: Mechanismen der TET2-induzierten Genexpression.**

A: TET2 fungiert als Katalysator von 5-mC zu 5-hmC in DNA mit  $\alpha$ -KG als essentiellen Kofaktor. 5-hmC ist ein Zwischenprodukt des Demethylierungs-Signalwegs. B: Durch TET2-Mutationen wird 5-mC in geringerem Maße hydroxyliert, wodurch Gene der Negativregulation der Zellselbsterneuerung und Gene der Förderung der Zelldifferenzierung nicht aktiviert werden. Abbildung aus ([89], Referenz verändert).

## 1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

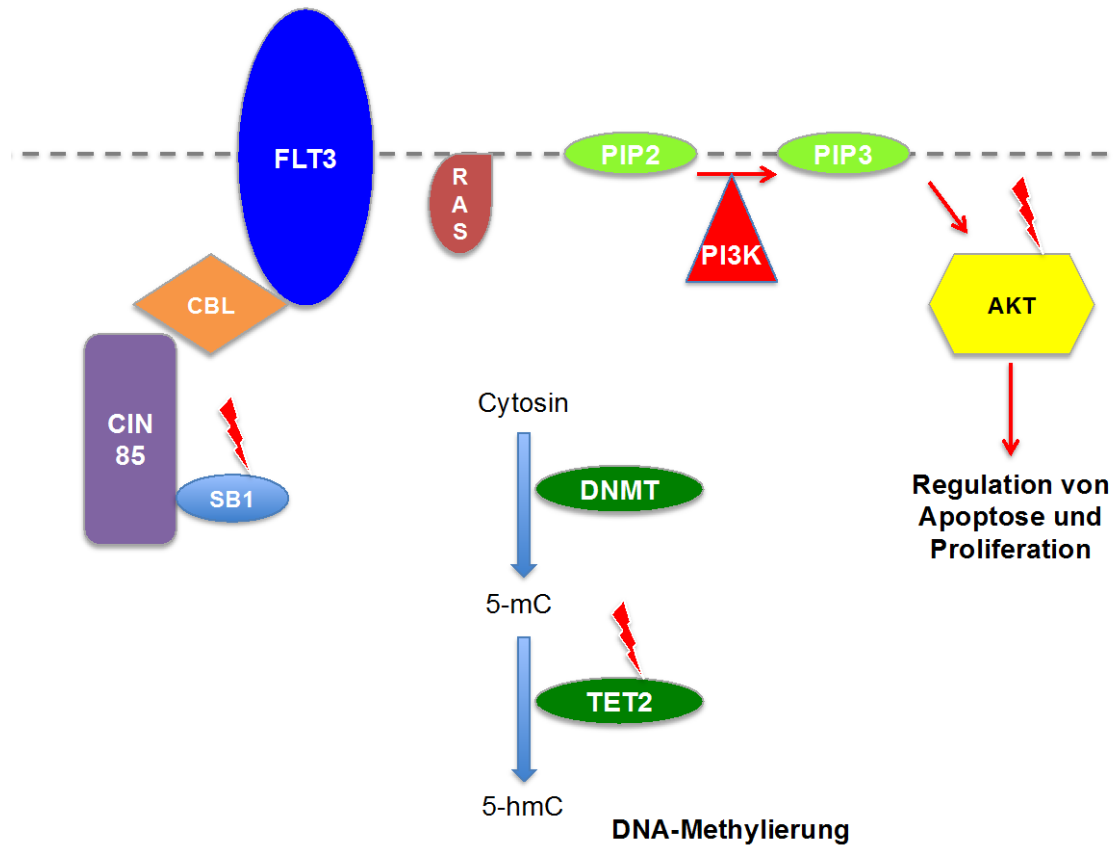
Aufgrund von neuen Sequenzierungsmethoden wie beispielsweise der Transkriptom-Sequenzierung wurden innerhalb der letzten Jahre viele neue Mutationen in Genen identifiziert.

Ein Ziel dieser Dissertation besteht darin, das mutmaßliche onkogene Potential der in AML-Patienten neu gefundenen SB1-Mutationen SB1-V89I, SB1-R454Q und SB1-R672Q funktionell zu charakterisieren und in einem ersten Schritt Effekte auf Proliferation und Apoptose zu untersuchen. Durch die nachgewiesene Bindung von SB1 an die SH3-Domänen von CIN85, welches wiederum mit CBL interagiert, lässt sich auf eine potentielle Rolle von SB1 in der Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen und deren Endozytose, Degradierung und Ubiquitinierung schließen. Des Weiteren zeigte eine Überexpression von SB1 in Zelllinien anti-apoptotische Effekte.

Die zentrale Bedeutung der aktivierenden Mutationen von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie FLT3 in der Leukämieentstehung ist seit Langem bekannt. FLT3 liegt bei rund 30 % der AML-Patienten mutiert vor, speziell FLT3-ITD-Mutationen sind in der AML mit schlechter Prognose und erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert. Des Weiteren sollte in der vorliegenden Dissertation das transformierende Potential der aktivierenden FLT3-ITD-Mutation W51 mit dem der AKT1-E17K-Mutante in Form von Proliferations-, Apoptose- als auch Signaling-Untersuchungen verglichen werden.

Auch die bedeutende Rolle von TET2 als epigenetischer Regulator in der normalen und malignen Hämatopoese wurde innerhalb der letzten Jahre zunehmend besser verstanden. In dieser Dissertation erfolgte das Screening einer CMML-Patientengruppe auf TET2-Mutationen als auch die Isolation von RNA, cDNA und Proteinlysaten aus einer fast vollständig reinen Monozytenpopulation der CMML-Patienten sowie die funktionelle Charakterisierung von hTET2-WT in Ba/F3-Zellen.

Abbildung 1.5 zeigt die in der vorliegenden Doktorarbeit untersuchten Aspekte vereinfacht dargestellt im Überblick.



**Abb. 1.5: Überblick der untersuchten Aspekte der vorliegenden Doktorarbeit.** Die Aktivierung des FLT3-Rezeptors resultiert in einer Vielzahl von Signalkaskaden, welche in die Regulation von Apoptose und Proliferation einer Zelle eingreifen. TET2 ist in die epigenetische Regulation involviert. Abbildung nach [22, 78, 90].



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Inhibitoren, Enzyme, Zytokine und Chemikalien

**Tabelle 2.1.1.1: Inhibitoren**

Inhibitor	Bemerkung	Bezugsquelle
AC220	FLT3-Inhibitor	SYNthesis med chem (Cambridge, UK)
MK2206	AKT-Inhibitor	Selleck Chemicals (Houston, TX, USA)

**Tabelle 2.1.1.2: Enzyme**

Enzym	Bezugsquelle
DyNAzyme-II-DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Herculase-II-Fusion-DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA
Phusion High-Fidelity-DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt; Fermentas, St. Leon-Rot

**Tabelle 2.1.1.3: Zytokine**

Zytokin	Bemerkung	Bezugsquelle
FLT3-Ligand (FL)	rekombinant human	Promocell, Heidelberg; Immunotools, Friesoythe
Interleukin-3 (IL-3)	rekombinant murin	Biosource, Camarillo, CA, USA; Immunotools, Friesoythe

**Tabelle 2.1.1.4: Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	BioRad, München
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagenz	BioRad, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka, Buchs, Schweiz
BM Cyclin	Roche, Mannheim
Coulter Clenz Cleaning Agent	Beckman Coulter, Krefeld
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Krefeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Leiter	Promega, Madison, WI, USA
DNase I	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Detektionsreagenz	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, Schweiz
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Sigma, Taufkirchen
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma, Taufkirchen
High Performance Chemiluminescence Film	Amersham Pharmacia, Freiburg
Leupeptin A	Sigma, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
tetra-Natriumdiphosphatdecahydrat	Sigma, Taufkirchen
Natriumvanadat	Sigma, Taufkirchen
N-Ethylmaleimid	Sigma, Taufkirchen
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
Orthovanadat	Sigma, Taufkirchen

Paraformaldehyd 4 % (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
peqGold Protein Marker VI	Peqlab, Erlangen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau	Sigma, Taufkirchen
Polyfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Polybren	Sigma, Taufkirchen
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Rainbow Marker	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Taufkirchen; AppliChem, Darmstadt
Trypan Blau	Invitrogen, Darmstadt; Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt

## 2.1.2 Software

**Tabelle 2.1.2: Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Illustrator	Adobe Systems, Unterschleißheim
BioEdit 7.0	ISIS Pharmaceutica, Carlsbad, USA
Cellquest 3.3	Beckton Dickinson, Heidelberg
E-capt 15.06	Vilber Lourmat
EndNote 6.0.2	Thompson ISI, Carlsbad, CA, USA
Microsoft Office	Redmond, WA, USA
Sigma Plot 11.0	SPSS Incorporated, Chicago, USA
Vector NTI Advance 10	Invitrogen, Darmstadt
WinMDI 2.9	Joseph Trotter

### 2.1.3 Kits

**Tabelle 2.1.3: Kits**

Bezeichnung	Bezugsquelle
Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I	Beckton Dickinson, Heidelberg
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
InFusion Advantage PCR Cloning Kit	Clontech, CA
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Rockland, ME, USA
Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAspin Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Waldbronn
RevertAid Premium First Strand cDNA	Fermentas, St. Leon-Rot
Rneasy MiniKit Synthesis Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.4 Laborausstattung

**Tabelle 2.1.4: Laborausstattung**

Gerät	Hersteller
Bakterien-Brutschrank	Heraeus, Osterode
Blotting Kammer	BioRad, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder, Tuttlingen
DNA-ThermoCycler	Peqlab, Erlangen
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra, Isernhagen
Entwicklermaschine	Kodak, Stuttgart
Expositionskassetten	Amersham, Pharmacia, Freiburg
FACS Calibur	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACS Sorter	Beckton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
GS Gene Linker UV Chamber	Bio Rad, Kalifornien, USA
Heizblock BT 130-2	Heap Labor Consult, Bovenden
Heiz Drehrad	Innova, Göllheim

Konfokales Mikroskop	TCS-SP2, Leica, Heidelberg
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Carl Zeiss, Jena
Pipettierer Accu Jet	Brand, Wertheim
Proteingelelektrophoresekammer	Invitrogen, Darmstadt
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Sequenzierer, ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Spektrophotometer, Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Sterilbank BDK, Luft und Reinraumtechnik	Bio Flow Technik, Meckenheim
Sysmex = Leukozytenzähler F820	Sysmex Deutschland
Tischzentrifuge	Rotanta Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge	LTF, Labortechnik
Vi-Cell XR, Vi-Cell AS	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer	Cenco, Breda, NL
Wasserbad	Haske, Karlsruhe
Zentrifuge	Eppendorf, Heraeus
Zytozentrifuge MA 1677 E 9810	Shandon, Hettich, Tuttlingen

## 2.1.5 Zelllinien

**Tabelle 2.1.5: Zelllinien**

Zelllinie	Bemerkung
Ba/F3	murine pro-B-Zelllinie, IL-3-abhängig
Eol-1	humane AML-Zelllinie, aus dem peripheren Blut eines 33-jährigen Mannes mit AML FAB M4eo [91]
HEK 293	humane, embryonale Nierenepithel-Zelllinie [92]
HL60	humane AML-Zelllinie, aus peripherem Blut einer 35-jährigen Frau mit AML FAB M2 [93]
Kasumi-1	humane AML-Zelllinie, aus dem peripheren Blut eines 7-jährigen japanischen Jungen mit AML FAB M2 [94]
KG-1a	humane AML-Zelllinie, aus dem Knochenmark eines 59-jährigen Mannes, Variante der KG-1-AML-Zelllinie [95, 96]
MM6	humane MonoMac6-Zelllinie, aus dem peripheren Blut eines 64-jährigen Mannes mit AML FAB M5 [97]

MOLM-13	humane AML-Zelllinie, aus peripherem Blut eines 20-jährigen Mannes mit AML FAB M5a [98]
MV4-11	humane akute monozytäre Leukämie-Zelllinie, aus peripherem Blut eines 10-jährigen Jungen mit AML FAB M5 [99]
NOMO1	humane AML-Zelllinie, aus der Knochenmark einer 31-jährigen Frau mit AML FAB M5a [100]
OCI-AML3	humane AML-Zelllinie, aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen Mannes mit AML FAB M4 [101]
Phoenix Eco	humane, embryonale Nierenepithel-Zelllinie
THP-1	humane AML-Zelllinie, aus dem peripheren Blut eines 1-jährigen Jungen [102]

## 2.1.6 Antikörper

**Tabelle 2.1.6: Antikörper**

Antikörper	Bemerkung	Herkunft
$\alpha$ - $\beta$ -Actin (AC-15) (A5441)	Maus, monoklonal	Sigma (Taufkirchen)
$\alpha$ -AKT (#9272) □	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
CD14-FITC (IgG2a) (A07765)	Maus	Beckman Coulter (Krefeld)
CD14 MicroBeads	human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD135-PE (IgG1) (IM2234U)	Maus	Immunotech (Marseille, FRA)
$\alpha$ -CIN85 clone 179.1.E1 (#05-731)	Maus, monoklonal	Merck Millipore (Darmstadt)
$\alpha$ -FLT3 (S-18) (sc-480)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
$\alpha$ -HA tag (ab9110)	Kaninchen, polyklonal	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
IgG1-PE Isotyp Kontrolle (A07796)	Maus	Immunotech (Marseille, FRA)
IgG1-PE Isotyp Kontrolle (#555749)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, USA)
IgG2a-PE Isotyp Kontrolle (#559319)	Maus	BD Pharmingen (San Diego, USA)
IgG2b-PE Isotyp Kontrolle	Maus	BD Pharmingen

(#555743)		(San Diego, USA)
$\alpha$ -Kaninchen IgG-HRP (GAR)	Ziege	Sigma (Taufkirchen)
$\alpha$ -44/42 MAP-Kinase (#9102)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)
$\alpha$ -Maus IgG-HRP (GAM)	Ziege	Santa Cruz (CA, USA)
$\alpha$ -pAKT (Ser473) (D9E) (#4060S)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
$\alpha$ -Phospho-p44/42-MAPK (Thr202/Tyr204) (#4370)	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
$\alpha$ -pSTAT5 (Tyr694) (#9351)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (NEB, Frankfurt)
$\alpha$ -Rabbit IgG-Cy3 (GAR)	Ziege, polyklonal	Dianova (Hamburg)
$\alpha$ -STAT5 (C-17) (sc-835)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz (CA, USA)

## 2.1.7 Plasmide

**Tabelle 2.1.7. Plasmide**

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pMSCV-IRES-EGFP	retroviraler Expressionsvektor	R.K. Humphries, (Vancouver, CAN)
pMSCV-IRES-EYFP	retroviraler Expressionsvektor	R.K. Humphries, (Vancouver, CAN)
MIG AKT1 WT	retroviraler Expressionsvektor	AG Spierkermann, KKG Leukämie
MIG AKT1 E17K	retroviraler Expressionsvektor	AG Spierkermann, KKG Leukämie
pcDNA6/V5-His CIN85 XNC(123)cc	Expressionsvektor	L. Gibson (Houston, USA)
MIG CIN85 WT	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit
MIY CIN85 WT	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit
MIY FLT3 WT	retroviraler Expressionsvektor	AG Spierkermann, KKG Leukämie
MIY FLT3 W51	retroviraler Expressionsvektor	AG Spierkermann, KKG Leukämie
pCMV-HA SB1 WT	Expressionsvektor	YU-Yang Li (Shanghai, China)

MIG SB1 WT	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit
MIG SB1 V89I	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit
MIG SB1 R454Q	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit
MIG SB1 R672Q	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit
pCMV6-Entry TET2 WT	Expressionsvektor	Jon Licht (Chicago, USA)
MIY TET2 WT	retroviraler Expressionsvektor	diese Arbeit

## 2.1.8 Oligonukleotide

**Tabelle 2.1.8.1: Oligonukleotide zur Sequenzierung von hTET2**

Bezeichnung	Sequenz
Primer Sequenzieren TET2 1F	5'-TGGAGACACCAAGTGGCACTCTTT-3'
Primer Sequenzieren TET2 2F	5'-CACAAAGCTAGCGTCTGGTGAAGA-3'
Primer Sequenzieren TET2 3F	5'-AATCAAGGGCAGTCCCAAGGTACA-3'
Primer Sequenzieren TET2 4F	5'-ACAGGAGCAGAAGTCACAACAAGC-3'
Primer Sequenzieren TET2 5F	5'-AGCAGGTCCTAATGTGGCAGCTAT-3'
Primer Sequenzieren TET2 6F	5'-TGAGTTTGGGAGTGTGGAAGCTCA-3'
Primer Sequenzieren TET2 7F	5'-ATGCAGGGAGATGGTTTCAGCAGT-3'
Primer Sequenzieren TET2 8F mit Vektor	5'-AAGCCCGTGAGAAAGAGGAAGAGT-3'
Primer Sequenzieren TET2 Reverse	5'-ACACACACATGGTGAACCTCCTGGA-3'

**Tabelle 2.1.8.2: Oligonukleotide hTET2 WT PCR**

Bezeichnung	Sequenz
Primer Sequenzieren TET2 1F	5'-TGGAGACACCAAGTGGCACTCTTT-3'
Primer Sequenzieren TET2 Reverse	5'-ACACACACATGGTGAACCTCCTGGA-3'

**Tabelle 2.1.8.3: Oligonukleotide zur Sequenzierung von CIN85 (der Ratte)**

Bezeichnung	Sequenz
Forward Primer 1 (=Seq_rat SH3KBP1 1F)	5'-ACAGATCAACGGCAGGAGAGGTTT-3'
Forward Primer 2 (Seq_rat SH3KBP1 2F)	5'-AGTTACCTCCAGCTACATCAACCC-3'
Forward Primer 3 (Seq_rat SH3KBP1 3F)	5'-CAAAGATTGACTTGGCAGGCAGCA-3'
Reverse Primer (=Seq_rat SH3KBP1 R)	5'-AAAGCTGCTCATCCTGGGAAATGC-3'

**Tabelle 2.1.8.4: Oligonukleotide zur Sequenzierung von hSB1**

Bezeichnung	Sequenz
Forward Primer 1 (=Seq_human SHKBP1 1F)	5'-ACGCATCTCGACGCTGAAAGATGA-3'



Forward Primer 2 (=Seq_human SHKBP1 2F)	5'-AACATGACAAGATGGTGGCAGCAG-3'
Forward Primer 3 (=Seq_human SHKBP1 3F)	5'-AAGATCATGCTGTCCGAGAAGCAC-3'
Forward Primer 4 (=Seq_human SHKBP1 4F)	5'-AGCTGATGGAACAGCTGGAACACT-3'
Reverse Primer (=Seq_human SHKBP1 R)	5'-TGAGCCATAGAAGCTGGGCTTCAT-3'

**Tabelle 2.1.8.5: Oligonukleotide zur Mutagenese von hSB1**

Bezeichnung	Sequenz
SB1 V89I Mutagenese-Primer	Sense 5'-GTTGGATCCCAGGGGTATCCACGGTTCCAG-3' Antisense 5'-CTGGAACCGTGGATACCCCTGGGATCCAAC-3'
SB1 R454Q Mutagenese-Primer	Sense 5'-GACAACAACCACGTGCAGACATGGTCTGTGACT-3' Antisense 5'-AGTCACAGACCATGTCTGCACGTGGTTGTTGTC-3'
SB1 R672Q Mutagenese-Primer	Sense 5'-CAGGAACTGGTGCAGAGTGGGCCAGAC-3' Antisense 5'-GTCTGGCCCACTCTGCACCAGTTCCTG-3'

## 2.1.9 Puffer, Medien, Lösungen

**Tabelle 2.1.9: Puffer, Medien, Lösungen**

Material	Zusammensetzung
Agarosegel 1 %	1g Agarose in 100 ml TAE-Puffer
Calciumchlorid	2 M CaCl <sub>2</sub>
DAPI	1 µg DAPI in 1 ml PBS
G-NET	NET mit 2,5g Gelatine
GTE-Puffer	25 mM Tris/HCl pH8, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8
HBS-Puffer	0,133 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> x2 H <sub>2</sub> O, 5,96 g HEPES, 8,16 g NaCl, ad H <sub>2</sub> O dest. (50ml)
5 x KCM	5 ml 3 M KCl, 4,5 ml 1 M CaCl <sub>2</sub> , 7,5 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> , ad H <sub>2</sub> O dest. (13ml)
Lämmli-Puffer	187.5 mM Tris, 30 % Glycerin, 6 % SDS, Spatelspitze Bromphenolblau
LB-Agar	32 g LB Agar, ad 1000 ml H <sub>2</sub> O dest.
LB-Amp-Platten	LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin
Ligase-Puffer	10fach NEB
Lysispuffer	15 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 200 mM EGTA, 25 ml 1 M Hepes pH 7,5, 100 ml Glycerol 50%, 5 ml Triton X-100, 2,1g NaF, 2,23 g Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> x10 H <sub>2</sub> O (500ml)
MACS-Puffer	PBS, BSA, EDTA, 0.09 % azide, pH 7,2
Natriumazidpuffer	PBS, 0,1 % Natriumazid

10 x NET	438.3 g NaCl, 93.6 g EDTA, 802.9 g Tris, 25 g Triton-X 100, ad 5000 ml, pH 7.7
Ponceau-Lösung	0.5 g Ponceau-S, 1 ml Eisessig, ad 100 ml H <sub>2</sub> O dest.
Stripping-Puffer	0.1 M 2-Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris pH 6.8, 2 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
TAE-Puffer	57,1 ml Essigsäure 100 %, 242 g Tris, 18,61 g EDTA ad H <sub>2</sub> O dest. (5l)
10 x TBS	12,11 g Tris, 87,66 g NaCl, ad H <sub>2</sub> O dest., pH 8,0 (5l)
TBST	0,1 % Tween20 mit 1xTBS
Tris-HCl pH 6,8	908,55 g Tris, ad H <sub>2</sub> O dest., pH 6,8 (5l)
Tris-HCl pH 8,8	908,55 g Tris, ad H <sub>2</sub> O dest., pH 8,8 (5l)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Zellkultur von adhärennten Suspensionszellen

Das Kultivieren der unter 2.1.5 angegebenen Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit sowie in Gegenwart von 5 % CO<sub>2</sub>.

Die murinen Ba/F3-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium unter Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 50 µg/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin als auch 10 % WEHI-3B-konditioniertem Medium als Produzent des murinen IL-3 gehalten. Das Splitten der Zellen erfolgte alle 72 Stunden im Verhältnis 1:20.

Die AML-Zelllinien wurden in RPMI-Medium unter Zugabe von 20 % FKS, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin kultiviert und alle 3 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet.

Die adhärennten Zelllinien HEK-293 und Phoenix-Eco wurden in DMEM-Medium mit 10 % FKS und 50 µg/ml Streptomycin als auch 50 U/ml Penicillin kultiviert. Alle 72 Stunden erfolgte die Verdünnung im Verhältnis 1:5. Lösen der Zellen von ihrer Kulturflasche erfolgte durch einmalige Waschung mit DPBS, anschließend fünfminütiger Inkubation mit Trypsin-EDTA bei 37 °C und Verdünnung mit DMEM-Vollmedium. Nach einmaliger Zentrifugation konnte das Zellpellet erneut in frischem DMEM-Vollmedium aufgenommen und replatiert werden.

### **2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Es wurden  $6 \times 10^6$  Suspensionszellen bzw.  $3 \times 10^6$  adhärenente Zellen in 1 ml Einfriermedium, welches aus 90 % FKS und 10 % DMSO besteht, aufgenommen, in 1,5 ml Einfriergefäße (Nunc-Cryotube) transferiert und in einem speziellen Freezing-Container (Typ Cryo 1 °C, Nalgene, Deutschland) bei -80 °C eingefroren.

Durch Erwärmung der Zellsuspension in den Einfriergefäßen im 37 °C-Wasserbad, Resuspension in Medium, Abzentrifugation und anschließend erneute Resuspension in frischem Medium und Kultivierung konnten die Zellen aufgetaut und nach drei Tagen für Experimente verwendet werden.

### **2.2.1.3 Transiente Transfektion**

Die transiente Transfektion dient der Produktion von Virus enthaltendem Medium (VCM englisch für virus containing medium), welches anschließend für die Transduktion von Ba/F3-Zellen verwendet werden kann. Die adhärenenten Phoenix-Eco- oder HEK293-Zelllinien produzierten über  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Transfektion den gewünschten retroviralen Überstand. Hierzu wurde die cDNA in die multiple cloning site des pMSCV-IRESEGFP/EYFP-Vektors kloniert. An Tag 1 wurden  $6 \times 10^6$  Zellen in einer 10 cm Kulturschale für adhärenente Zellen ausgesät. An Tag 2 bei um die 70-80 %iger Zellkonfluenz erfolgte vier Stunden vor der Transfektion erneut vorsichtiger Mediumwechsel und das Zugabe von 13 µg Plasmid-DNA zu sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  dest. zu einem Gesamtvolumen von 450 µl. Zu den 450 µl wurden 50 µl 2 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugegeben, gemischt und einem HBS-Puffer tröpfchenweise beigegeben. Inkubation bei RT für 3-4 Minuten und anschließend vorsichtiges Tropfen möglichst ohne Irritation auf die zu transfizierenden Zellen. Einige Stunden danach erfolgte erneut vorsichtiger Mediumwechsel. 2-3 Tage nach Transfektion wurde der VCM abgenommen, die Transfektionseffizienz via Fluoreszenzmikroskop überprüft und die Zellen lysiert.

### **2.2.1.4 Stabile Ba/F3-Zell-Transduktion**

Für die stabile Transduktion der Ba/F3-Zelllinien mit dem gewünschten retroviralen Überstand wurden  $1,5 \times 10^6$  Ba/F3-Zellen in 3 ml RPMI-Vollmedium aufgenommen, die Zellsuspension mit einer Polybren-Lösung (Konzentration 8 µg/ml) versetzt und gemischt und mit derselben Menge an VCM versehen. Anschließend wurde die Gesamtsuspension gleichmäßig auf zwei Kammern einer 6-well-Schale verteilt und für 90 Minuten bei 2500 rpm und 32 °C in einer

Tischzentrifuge von Hettich zentrifugiert. Daraufhin erfolgte eine 2,5-stündige Inkubation der Zellen bei 37 °C im Brutschrank und Mediaustausch. Die Zellen wurden expandiert und 4-5 Tage nach Transduktion via YFP- oder GFP-Fluoreszenz im FACS („Fluorescence Activated Cell Sorter“) gesortet. Anschließend erfolgte erneute Expansion der YFP/GFP-positiven Zellen sowie eine zweite Sortierung anhand der Fluoreszenz nach etwa einer Woche, wodurch eine zu über 95 % reine Zellpopulation erhalten wurde.

### **2.2.1.5 Lebendzellzahl-Bestimmung**

Der Trypan-Blau-Exklusions-Test dient der Lebendzellzahl-Bestimmung. Aufgrund von poröser Zellmembran kann bei toten Zellen der Farbstoff Trypan-Blau in die Zellen eindringen, bei lebenden Zellen ist ein Passieren der Zellmembran nicht möglich. Dadurch erscheinen tote Zellen im Lichtmikroskop blau, lebende Zellen sind farblos. Durch den Vi-Cell-Zellzähler von Beckman Coulter konnte so in einem definierten Verhältnis von Zellsuspension und Trypanblau die Lebendzellzahl bestimmt werden.

Für Ba/F3-Proliferationsexperimente wurden  $4 \times 10^4$  Zellen pro ml Medium ausgesät und eine festgelegte Menge an Inhibitoren und Zytokinen zugegeben. Nach 72h erfolgte die Lebendzellzahlbestimmung.

### **2.2.1.6 Apoptosemessung mit Annexin-V-/7-AAD-Färbung**

Zur Bestimmung früh- und spät-apoptotischer Zellen diente das Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I von Beckton Dickinson. Die Zellen werden mit Annexin V-PE (Annexin V konjugiert mit Phycoerythrin) und 7-AAD (7-Amino-actinomycin D) entsprechend dem Herstellerprotokoll doppelgefärbt und via Durchflusszytometrie analysiert. Annexin V detektiert Zellen in frühapoptotischem Stadium, 7-AAD Zellen in spätapoptotischem.

Für Apoptoseexperimente erfolgte das Kultivieren von  $2 \times 10^5$  Ba/F3-Zellen pro ml ohne IL-3 und von  $4 \times 10^4$  Ba/F3-Zellen pro ml mit IL-3 für 72 Stunden, nachdem die Zellen zweimalig gewaschen und in RPMI mit 10 % FKS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin aufgenommen wurden.

### **2.2.1.7 Expressionsanalyse von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie**

Zur Analyse der Expression von Oberflächenantigenen diente ebenfalls die Durchflusszytometrie. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit PBS gewaschen, für 15 min bei RT mit spezifischem Antikörper als auch dessen Isotyp-Kontrolle (z.B. CD135-PE und murines IgG1-PE für FLT3) inkubiert, anschließend erneut zweimal gewaschen und in 250  $\mu$ l FACS-Puffer überführt. Die jeweilige Fluoreszenz der Zellen wurde via FACS-Calibur-Durchflusszytometer detektiert. Daraufhin erfolgte die Auswertung der Expressionsstärke via WinMDI 2.9.

Zur Analyse der Internalisierung des FLT3-Rezeptors wurden pro Ansatz  $3 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS mit 5 % FKS aufgenommen, mit 100 ng FL für die verschiedenen Zeitintervalle von 5, 10 bis zu 30 Minuten inkubiert. Als 0 Minuten-Wert galt ein Ansatz, welcher gar nicht stimuliert wurde. Nach dem jeweiligen Zeitintervall wurde die Internalisierung mittels Zugabe von 1 ml PBS mit 0,1 % Natriumazid gestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit Natriumazidpuffer erfolgte die Aufnahme in 100  $\mu$ l PBS und die Färbung mittels Oberflächenantikörper CD135-PE als auch Analyse via FACS-Calibur und WinMDI 2.9 (siehe oben).

### **2.2.1.8 Hungern der Zellen und Stimulation vor der Zellyse**

Um spezifische phosphorylierte Signalproteine in Signalkaskaden der transduzierten Ba/F3-Zelllinien analysieren zu können, wurden die Zellen vor der Herstellung von Zellysaten gehungert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Hungermedium, d.h. RPMI mit 0,3 % FKS, 50 U/ml Penicillin und 50  $\mu$ g/ml Streptomycin, für 24 h im Inkubator kultiviert.

Zudem erfolgte die Stimulation der Zellen vor der Zellyse mit dem jeweiligen Liganden oder Zytokin, beispielsweise um die Induktion der Signalkaskaden durch Zytokine zu untersuchen.

### **2.2.1.9 Immunfluoreszenz von adhärennten Zellen (Immunostaining)**

Um die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins genauer zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit SB1-WT oder Mutanten transfiziert. Bei rund 80 %iger Konfluenz der Zellen nach in etwa 24-48 h wurden diese mit PBS gewaschen und mit 2 % - 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mittels 0,1 % Triton X in PBS (3 x 5 min) permeabilisiert und daraufhin 3 x 5 min mittels 10 % FKS in PBS blockiert. Es erfolgte die Inkubation im Dunkeln

mit dem ersten Antikörper  $\alpha$ -HA (Abcam) bei 4°C über Nacht. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der Sekundär-Antikörper  $\alpha$ -Cy3 für eine Stunde im Dunkeln bei RT hinzugefügt. Nach erneuten Waschschrritten wurde mit 1  $\mu$ g DAPI in 1 ml PBS für 2 min bei RT zur DNA-Kernfärbung inkubiert. Daraufhin wurden die Deckgläschen auf Objektträgern fixiert und mittels Konfokalem Mikroskop (TCS-SP2, Leica, Heidelberg) analysiert. Die Bilderverarbeitung erfolgte mit Hilfe von Adobe Illustrator.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Proteinlysate**

Um die Expression von zellulären Proteinen zu analysieren, erfolgte die Herstellung von Proteinlysaten. Für die Proteinextraktion wurden  $3 \times 10^7$  Ba/F3-Zellen in kaltem PBS gewaschen und nach Zentrifugation in 500  $\mu$ l Lysispuffer lysiert. Nach Resuspension wurden die Lysate bei 4°C 30 min auf einem Drehrad (9 rpm) inkubiert, die Zelldebris anschließend über Zentrifugation mit 13000 rpm und bei 4°C pelletiert. Der Proteinüberstand wurde bei -20°C gelagert.

### **2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die genaue Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proteinlysaten wurde mittels Methode nach Bradford photometrisch ermittelt [103]. Hierzu wurden 980  $\mu$ l von 1:5 verdünnter Farbstofflösung (Bradford-Reagenz, BioRad, München) mit 20  $\mu$ l von 1:10 verdünntem Proteinlysat gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Im Spektralphotometer erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm gegen die blank-Kontrolle (Bradford-Reagenz mit Zusatz von Wasser). Mittels Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA und deren Messung wurde eine Eichkurve erstellt, um die absolute Konzentration bestimmen zu können.

### **2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierzu wurden Trenngele zwischen 7,5 % und 18 % verwendet, je nach Molekulargewicht der Proteine. Die Trenngele wurden gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit 4 %igem Sammelgel überschichtet, welches durch Einbringen eines Kamms zum Beladen der Taschen mit den Lysaten befähigt. Die Proteinlysate mit gleicher Menge an Protein wurden 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer versetzt und zur Denaturierung 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die präparierten Lysate als auch ein Protein-Größenstandard (Rainbow-Marker) in die Geltaschen pipettiert und bei 80mA in einer mit Elektrophoresepuffer befüllten Gelkammer aufgetrennt.

### **2.2.2.4 Western-Blot**

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels „Semidry-Blot-Verfahren“ [104]. Dies geschah in Transblot-Puffer über 90 Minuten bei 250 mA. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau reversibel angefärbt, um den erfolgreichen Transfer und den äquivalenten Transfer der Proteine grob zu überprüfen. Zur Entfärbung und Blockade unspezifischer Proteinbindestellen wurde die Membran dreimal 20 Minuten mit G-NET blockiert. Über Nacht wurde die Nitrozellulose-Membran mit entsprechend den Herstellerangaben verdünnter Primärantikörper-Lösung bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und daraufhin für 60 Minuten mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Als letzte Schritte wurde erneut dreimal für 10 Minuten mit TBST und kurz mit PBS ausgewaschen und die Proteine mittels Chemolumineszenz-Reagenz (ECL Detektionsreagenz) auf einem Hyperfilm (Amersham, Freiburg) mit unterschiedlicher Expositionszeit detektiert.

### **2.2.2.5 Strippen der Nitrozellulosemembran**

Um die Nitrocellulose-Membran von zuvor verwendeten Antikörpern zu reinigen und zur Detektion eines anderen Proteins verwenden zu können, wird diese durch Strippen der Membran entfernt. Dazu erfolgte die Inkubation der Membran in Stripping-Puffer für 40 min bei 56°C auf einem Drehrad. Anschließend wurde die Membran dreimal 20 min mit TBST ausgewaschen als auch erneut dreimal 20 min mit G-NET blockiert.

## **2.2.3 Bakterienkultur**

### **2.2.3.1 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien**

Für die Bakterien-Transformation wurde ein Aliquot von kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Ein 50 µl-Ansatz aus 5 µl 5xKCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µg Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz wurde mit Aqua dest. auf 25 µl aufgefüllt und 25 µl kompetente Bakterien zugegeben. Das 5xKCM sorgt für kurze Durchlässigkeit der Bakterien-Zellmembran. Anschließend erfolgte die Inkubation für 20 min auf Eis sowie 10 min bei RT, daraufhin die Zugabe von 250 µl LB- oder S.O.C.S.-Medium und das Schütteln über eine Stunde bei 37°C. Nach Ausplattieren von 100 µl dieses Ansatzes auf einer meist Ampicillin-versetzten LB-Agar-Platte erfolgte erneut die Inkubation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag konnte durch Isolation der gewachsenen Einzelkolonien und Präparation von Plasmid-DNA eine weitere Expansion stattfinden.

### **2.2.3.2 Plasmid-DNA-Präparation**

Für die Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet [105].

#### **2.2.3.2.1 Mini-Präparation**

Für die Isolation von Plasmid-DNA in kleinerer Menge (Mini-Präparation) wurden gewachsene Einzelkolonien der transformierten Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, über Nacht bei 37°C mit 2 ml LB-Medium versetzt und unter Zugabe des jeweiligen Antibiotikums bei 225 rpm im Bakterienrührer inkubiert. Die DNA-Präparation erfolgte mittels QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden). Dies erfolgte meist um nachzuweisen, dass mittels Ligation und Transformation eine Integration der Plasmid-DNA stattgefunden hat.

#### **2.2.3.2.2 Maxi-Präparation**

Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA-Mengen wurde eine Einzelkolonie gepickt, in 2 ml Vorkultur für acht Stunden 37°C im Bakterienrührer inkubiert und anschließend in 100ml LB-



Medium mit jeweiligem Antibiotikum überführt und erneut über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnte mittels Endofree-Plasmid-Maxi-Kit oder QIAgen-Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilgen) die Extraktion der Plasmid-DNA nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mittels Spektralphotometer Nanodrop 1000 (Peqlab, Erlangen).

## **2.2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.4.1 DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme**

Durch Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Frankfurt) konnte die Plasmid-DNA, welche durch Mini- oder Maxipräparation erhalten wurde, auf ihre Identität überprüft werden. Hierzu wurden die Bedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Ein analytischer Verdau erfolgte über zwei Stunden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Ein präparativer Verdau erfolgte über drei Stunden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Bei der blunt-end Klonierung erfolgte zudem nach Inaktivierung der Enzyme bei 65°C für 20 min die Zugabe von alkalischer Phosphatase (CIAP), CIAP-Puffer und EDTA und Inkubation für 30 min bei 37, wodurch eine Religation des Vektors durch Dephosphorylierung der Phosphatreste am 5'-Ende des Vektors verhindert wurde. Der jeweilige Restriktionsansatz konnte anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und über Ethidiumbromid oder Syber-Safe detektiert und die DNA ggf. mit Hilfe des „Gel Extraction Kits“ von Qiagen protokollgerecht aufgereinigt und isoliert werden.

### **2.2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten**

Um Insert und Vektor zu ligieren, wurden meist pro Versuch drei Ansätze gewählt: ein Vektor-zu Insert-DNA-Verhältnis von 3:1, 5:1 und 10:1 als auch eine Reaktion ohne Insert als Religationskontrolle. Beide DNA-Fragmente wurden mit Ligasepuffer, T4-Ligase (NEB, Frankfurt am Main) und H<sub>2</sub>O in einem Reaktionsvolumen von 20 µl über Nacht bei einer Temperatur von 16°C ligiert. Vor Transformation in Bakterien erfolgte die Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65°C.

### **2.2.4.3 Isolierung von mRNA**

Die Isolierung von mRNA wurde mit Hilfe des RNeasy MiniKits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Produkt wurde in 20-50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

### **2.2.4.4 Die Synthese von cDNA durch reverse Transkription**

Mittels RevertAid-Premium-First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) erfolgte nach Herstellerangaben durch reverse Transkription der isolierten RNA die Synthese der komplementären DNA (cDNA). Die entstandene cDNA wurde bei -80°C gelagert.

### **2.2.4.5 Extraktion genomischer DNA**

Um genomische DNA aus Zellen zu extrahieren, wurde mittels DNAzol (Invitrogen, Darmstadt) und nach Herstellerangaben aus rund  $2 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz die DNA gewonnen.

### **2.2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

In der Polymerasekettenreaktion (PCR) können über Denaturierung, Annealing und Elongation mittels Polymerase und zweier komplementärer Primer DNA-Menge hochspezifisch amplifiziert werden. Dies eignet sich für eine Vielzahl an Untersuchungen, beispielsweise Expressionsnachweise oder Amplifikation von Mutantenfragmenten für die anschließende Klonierung. Ein Ansatz aus 10 µM 5'Primer, 10 µM 3'Primer, Taq-Polymerase, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM sNTPs, 10x Low Salt Buffer und Matrize wurde auf 25 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt und nach 5-minütiger Denaturierung bei 95°C wie folgt in einem T3 Thermocycler (Biometra) durch 30 Zyklen des folgenden Programms amplifiziert:

30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei der Primer-spezifischen Annealing-Temperatur, 30 Sekunden bis sechs Minuten (30 Sekunden pro 500 bp eines Fragments) bei 72°C. Nach erneuten 5-10 Minuten bei 72°C erfolgte das Abkühlen des Ansatzes als auch Auftragen auf ein Agarosegel.

### **2.2.4.7 Ortsgerichtete Mutagenese**

Das Einfügen der einzelnen Mutanten erfolgte in einem PCR-basiertem Verfahren nach Herstellerangaben mittels QuikChange-II-XL-Site-Directed-Mutagenesis-Kit von Stratagene (Waldbronn). Anschließend wurden 20 µl des PCR-Produkts in Bakterien transformiert und mittels Mini-Präparation isoliert. Die Plasmid-DNA wurde final vollständig durchsequenziert, um die gewünschte Mutation zu detektieren als auch andere ungewollte Mutationen auszuschließen.

### **2.2.4.8 Sequenzierung**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

## **2.2.5 Präparation der Patientenproben**

### **2.2.5.1 Ficoll**

Die CMML-Patientenproben (erhalten aus der Probenbank des Leukämie-Diagnostiklabors des Universitäts-Klinikums München als auch von dem niedergelassenen Hämato-Onkologen Dr. Siegfried Völkl in München und Dr. Ole Maywald, Onkologische Praxis Ingolstadt) wurden in 10-20 ml peripherem EDTA-Blut abgenommen und sofort weiterverarbeitet. Die Trennung und Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut erfolgte mit Hilfe des Ficoll-Gradienten. Hierfür wurden in ein Falcon 15 ml Biocoll Separating Solution gegeben. Das erhaltene Blutprobenröhrchen wurde mehrfach gedreht und anschließend in ein zweites Falcon gegeben und dieses nun auf 30 ml bei bis zu 15 ml Material, auf 50 ml bei über 15 ml Material mit PBS Dulbecco aufgefüllt und erneut mehrmals vorsichtig gedreht. Anschließend wurde der gesamte Inhalt des zweiten Falcons auf die 15 ml Biocoll Separating Solution des ersten Falcons vorsichtig und langsam mittels Accu-Jet aufgeschichtet und bei 2270 rpm für 30 min bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der mononukleäre Zellring abgenommen, in ein neues Falcon gegeben und auf 50 ml mit PBS Dulbecco aufgefüllt. Danach für 10 min bei 1440 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut in 1 ml PBS Dulbecco resuspendiert. Die Zellzahl der Probe wurde mittels Sysmex bestimmt und unmittelbar weiterverarbeitet.

### **2.2.5.2 MACS Zellseparation**

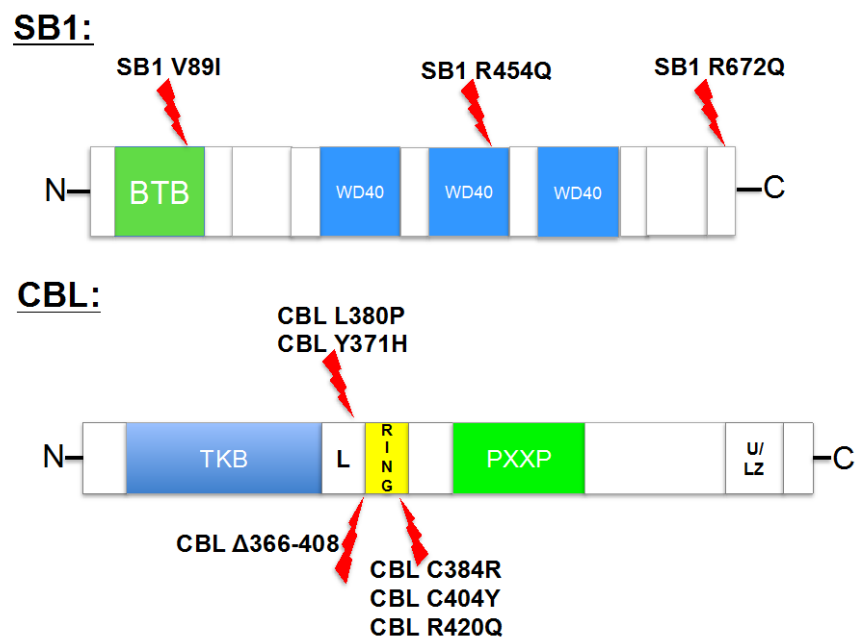
Um nach der Ficoll-Methode aus den mononukleären Zellen eine möglichst reine Monozytenpopulation zu erhalten, erfolgte anschließend die Magnetic Cell Separation, auch Magnetic-Activated Cell Sorting oder MACS genannt, über bestimmte Oberflächenstrukturen der Zellen. Hierfür wurde pro Ansatz  $2,5 \times 10^7$  Zellen in 450  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 50  $\mu$ l CD14 MicroBeads für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Zugabe von 7,5 ml MACS-Puffer und eine fünfminütige Zentrifugation bei RT und 1200 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer neu gelöst. Die MACS Separation Columns wurden in der magnetischen Halterung des QuadroMACS Separators befestigt und jede Säule einmal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Probe nach der Antikörperinkubation auf die Säule pipettiert, nachdem diese durchgelaufen war erfolgte das dreimalige Waschen der Säule mit je 3 ml MACS-Puffer. Dann wurde die Säule aus der magnetischen Halterung genommen, 5 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und mittels mitgeliefertem Stempel in ein Falcon gedrückt. Die Suspension wurde bei 1200 U/min zentrifugiert, 2,5 ml des Überstands verworfen und mit den restlichen 2,5 ml resuspendiert. Mittels Sysmex erfolgte dann die Bestimmung der Zellzahl der über das Zellseparation isolierten Monozyten-Population. Über Durchflusszytometrie wurde der Anteil CD14-positiver Zellen mittels des Antikörpers CD14-FITC vor dem Ficoll, nach dem Ficoll und nach erfolgter Zellseparation mittels MACS bestimmt. Aus der fast vollständig reinen CD14-positiven Zellpopulation wurden RNA, cDNA und Proteinlysate hergestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung von CIN85 und SB1 in rezeptor-exprimierenden Zellen

CIN85 ist ein Multi-Adapter-Protein und in die Internalisierung und in andere regulatorische Prozesse von Rezeptor-Tyrosinkinasen involviert. Auch SB1 ist eines von vielen mit CIN85-interagierenden Proteinen, dessen Überexpression in Zelllinien bereits anti-apoptotische Effekte zeigte, sodass eine Rolle als mögliches Protoonkogen denkbar ist.

Zur Untersuchung des biologischen Phänotyps von SB1-WT und den SB1-Mutanten SB1-V89I, SB1-R454Q sowie SB1-R672Q wurden Ba/F3-Zelllinien hergestellt, die FLT3 als Rezeptor sowie die verschiedenen SB1-Konstrukte exprimieren. Eine schematische Darstellung des SB1- und CBL-Proteins mit Mutationen zeigt Abbildung 3.1. Zusätzlich wurde die endogene Expression von CIN85 untersucht. Bei der Ba/F3-Zelllinie handelt es sich um murine pro-B-Zellen, die aufgrund ihrer Interleukin-3 (IL-3)-Abhängigkeit geeignet ist, um Onkogene im zellulären Kontext zu charakterisieren. Nur die Transduktion transformierender Gene ermöglicht ihnen IL-3-faktorunabhängiges Zellwachstum [106, 107].

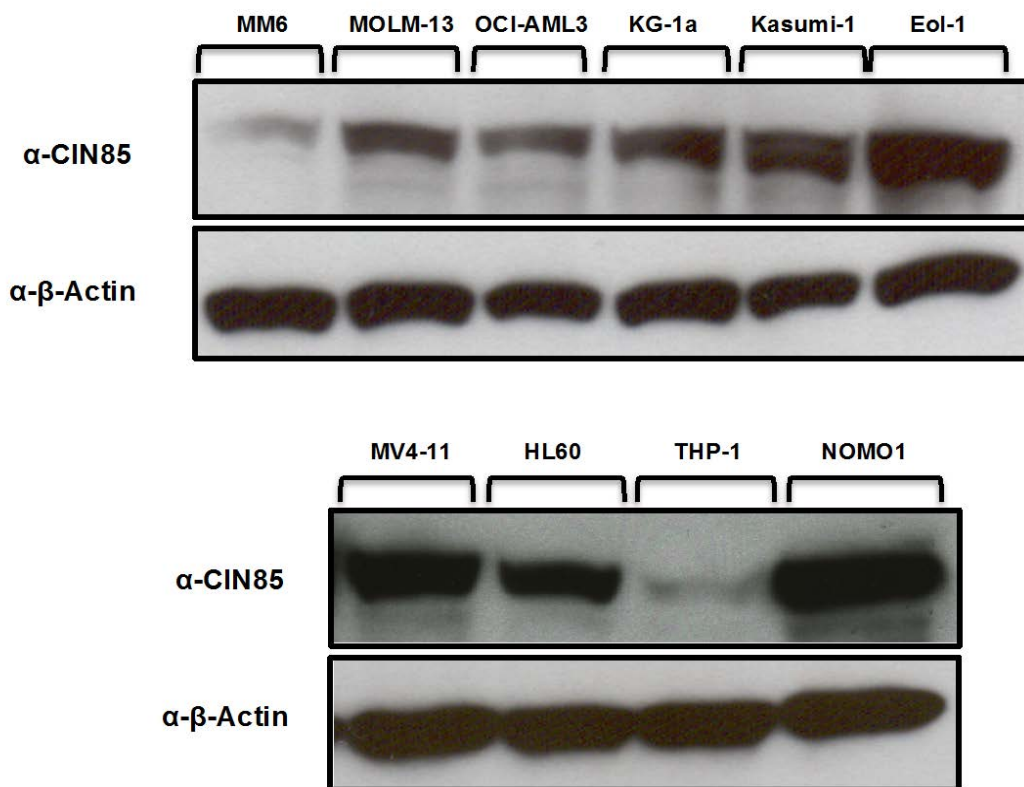


**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung des SB1- und CBL-Proteins mit Mutationen. N-terminal die BR-C, ttk und bab-Domäne (BTB) des SB1-Proteins, gefolgt von drei WD40-

Domänen. Zudem Darstellung der im Folgenden untersuchten SB1-Mutationen SB1-V89I, SB1-R454Q und SB1-R672Q. Das CBL-Protein besteht N-terminal aus der Tyrosinkinasebindungs-Domäne (TKB), gefolgt von der Linker-Region (L), RING-Finger-Region sowie einer Prolin-reichen Region (PXXP). C-terminal die Ubiquitin-assoziierte (U) und Leuzin-zipper Domäne (LZ). Zudem Darstellung der häufigen humanen CBL-Mutationen CBL-L380P, CBL-Y371H, CBL-C384R, CBL-C404Y, CBL-R420Q sowie der Deletionen CBL- $\Delta$ 366-408.

### **3.1.1 Endogene Expression von CIN85 in AML-Zelllinien**

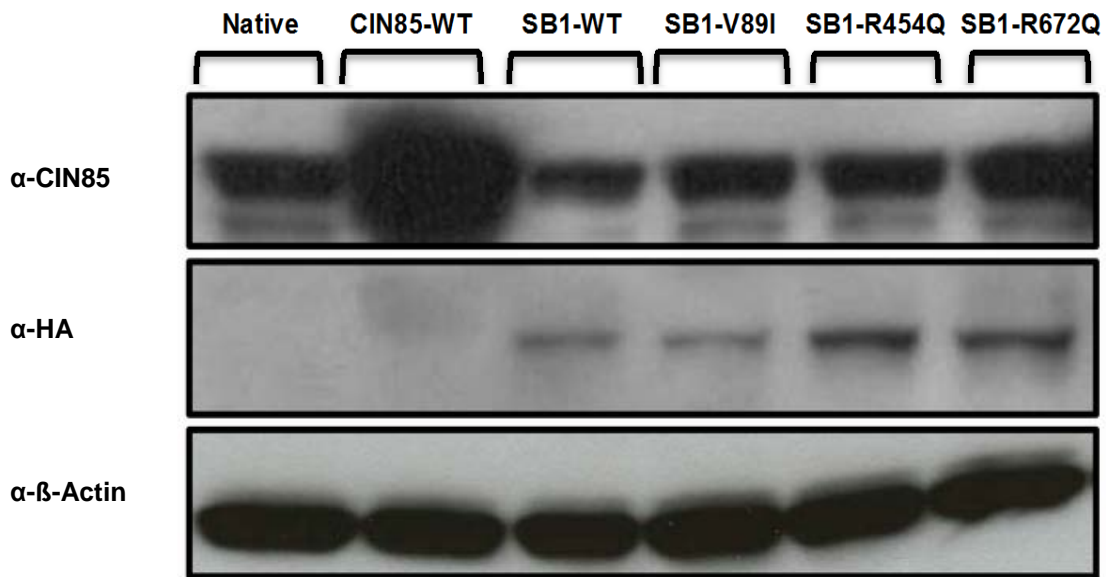
Zunächst wurden Ganzzell-Lysate von den verschiedenen AML-Zelllinien MM6, MOLM-13, OCI-AML3, KG1alpha, Kasumi-1, Eo1-1, MV4-11, HL60, THP-1 und NOMO1 auf ihre endogene Expression von CIN85 untersucht. Dies geschah über Immunoblotting mittels CIN85-spezifischem Antikörper (siehe Abbildung 3.1.1). Die endogene Expression von CIN85 zeigte sich in jeder der aufgeführten Zelllinien, die geringste Expression mit einer nur sehr schwachen Bande wies die Zelllinie THP-1 auf. Zudem zeigte sich eine endogene Expression auch in nativen Ba/F3-Zellen, wohingegen der Rezeptor FLT3 nicht in nativen Ba/F3-Zellen exprimiert wird (s. Abb. 3.1.2.1 und 3.1.2.2). Der Nachweis über die endogene Expression von SB1 gelang mangels fehlender Funktionalität der kommerziellen SB1-Antikörper nicht und konnte daher nicht dargestellt werden.



**Abb. 3.1.1: Endogene Expression von CIN85 in AML-Zelllinien.** In Ganzzell-Lysaten der AML-Zelllinien MM6, MOLM-13, OCI-AML3, KG-1a, Kasumi-1, Eo1-1, MV4-11, HL60, THP-1 und NOMO1 wurde CIN85 mit einem spezifischen CIN85-Antikörper detektiert.  $\beta$ -Actin dient als Ladungskontrolle.

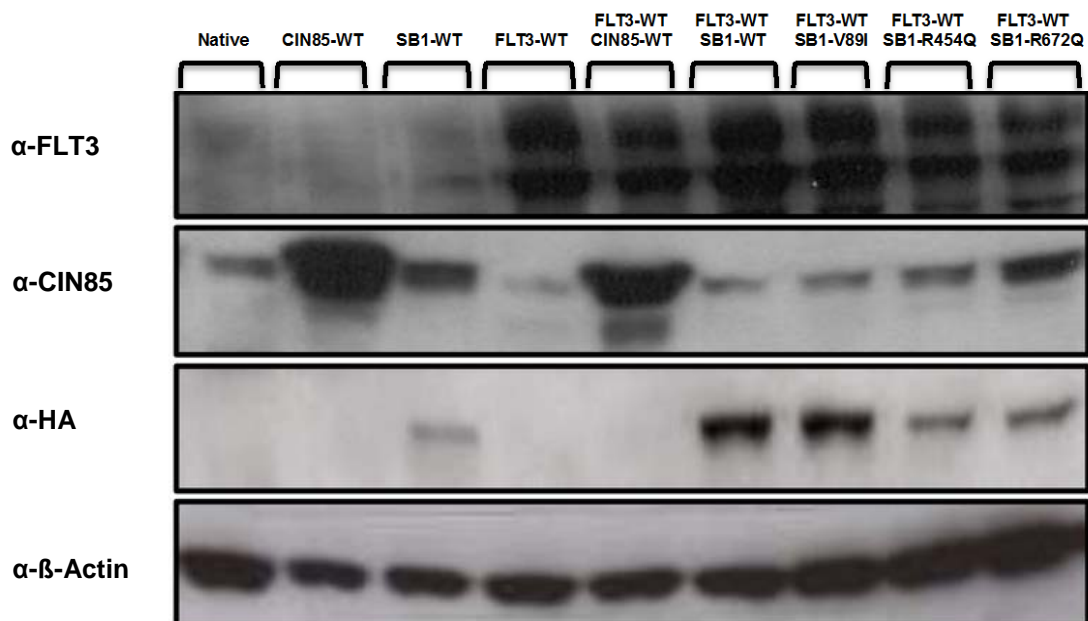
### 3.1.2 Expressionsnachweis von FLT3-WT, CIN85-WT und SB1-WT und Mutanten in einzeln bzw. doppelt-transduzierten Ba/F3-Zelllinien

Es wurden die cDNAs der zu untersuchenden potentiellen Proto-Onkogene CIN85-WT der Ratte und humanes SB1-WT und Mutanten (HA-getagged) in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV-IRES-eYFP-(MIY)- bzw. pMSCV-IRES-eGFP-(MIG)-Vektor kloniert. Nach Kontrolle der vollständigen Nukleotidsequenz wurden die Proteine wie in Abbildung 3.1.2 A und 3.1.2 B zu sehen via Western-Blot nachgewiesen stabil in den Ba/F3-Zellen exprimiert. Es erfolgte die Herstellung von mit dem jeweiligen Protein einzeln transduzierter als auch mit FLT3-WT und dem jeweiligen Protein doppelt-transduzierter Ba/F3-Zelllinien.



**Abb. 3.1.2.1: Expressionsnachweis der einzeln transduzierten Ba/F3-FLT3**

**/CIN85/SB1-Zelllinien.** Untersuchung der Ba/F3-Ganzzell-Lysate auf die Expression der transduzierten Konstrukte. Nachweis von CIN85 mit einem CIN85-spezifischen Antikörper. Detektion der SB1-Konstrukte mittels HA-Tag.  $\beta$ -Actin dient als Ladungskontrolle.

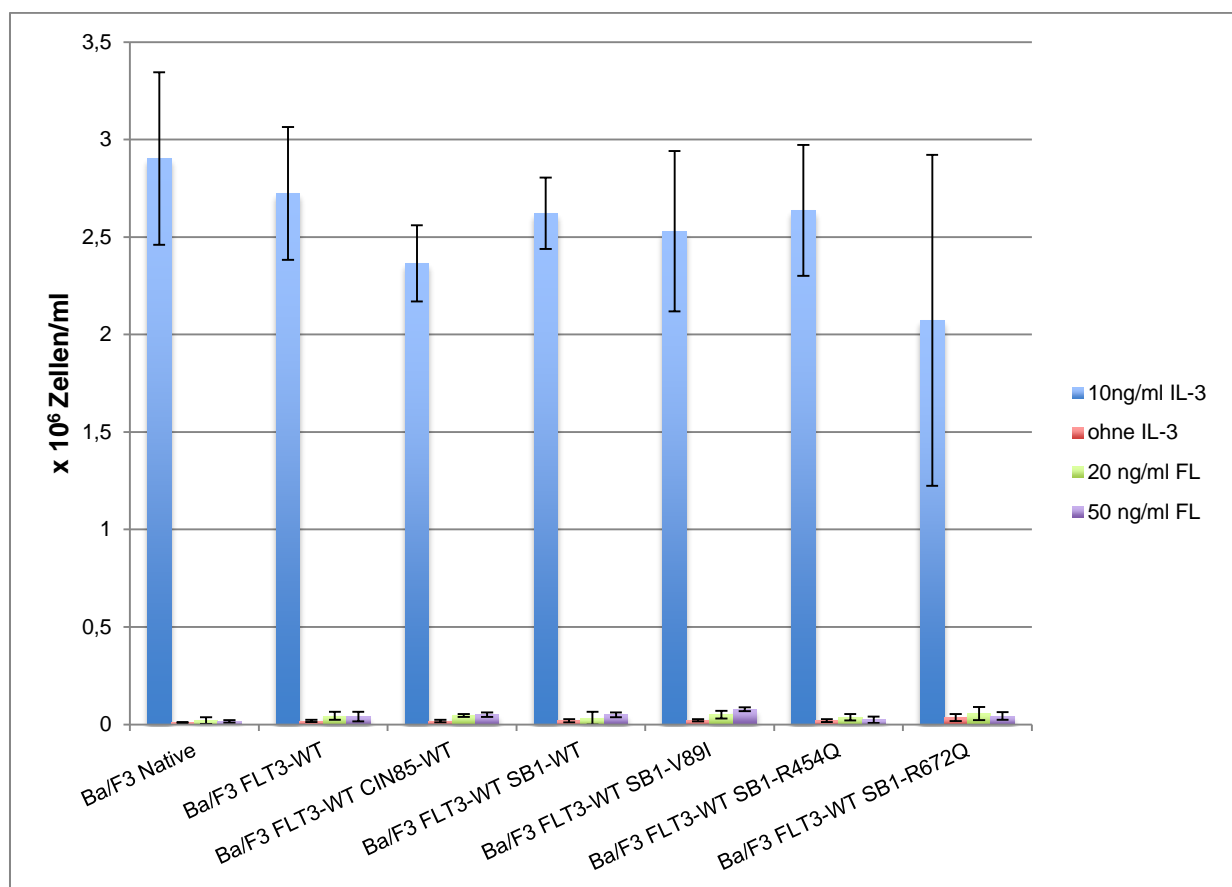


**Abb. 3.1.2.2: Expressionsnachweis der doppelt-transduzierten Ba/F3-FLT3/CIN85/SB1-Zelllinien.** In Ba/F3-Ganzzell-Lysaten der oben beschriebenen Zelllinien erfolgte die Untersuchung auf die Koexpression der transduzierten Konstrukte. Der Nachweis von CIN85 erfolgte mittels CIN85-spezifischem Antikörper. Detektion der SB1-Konstrukte mittels HA-Tag. Nachweis von FLT3 durch spezifischen FLT3-Antikörper.  $\beta$ -Actin dient als Ladungskontrolle.



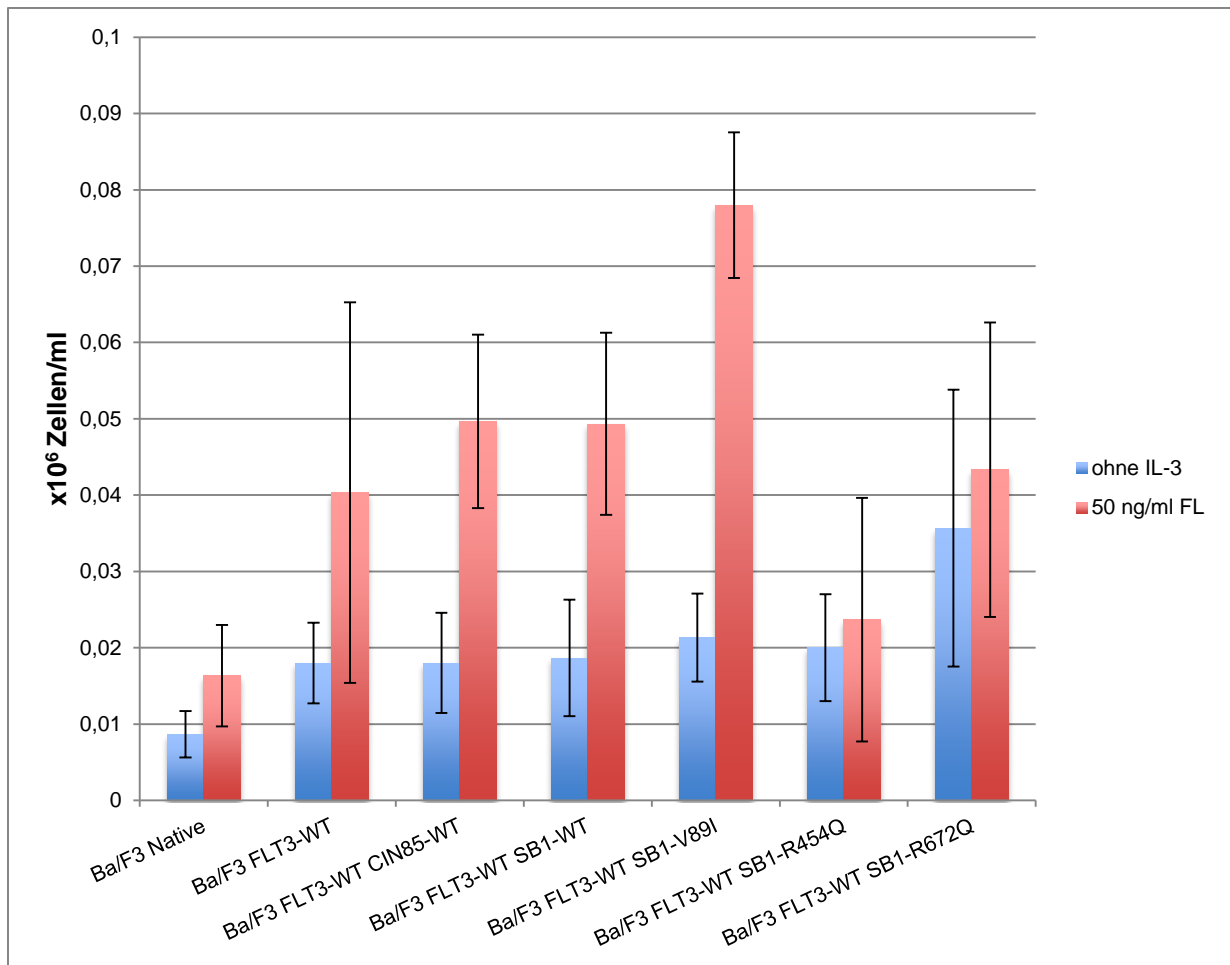
### 3.1.3 Untersuchung einer möglichen Induktion von IL-3-unabhängigem Ba/F3-Zellwachstum durch SB1-Mutanten

Nach stabiler Transduktion der CIN85- und SB1-Konstrukte als auch der Ko-Transduktion mit FLT3-WT wurden die Ba/F3-Zelllinien in ihrem Proliferationsverhalten untersucht, um deren biologischen Phänotypen zu eruieren. Einzig die Koexpression der somatischen Mutante SB1-V89I mit FLT3-WT wies in den Proliferationsversuchen bei Stimulation mit 50ng/ml FL ein leicht erhöhtes FL-induziertes Wachstum auf. SB1-V89I alleine als auch SB1-WT und die restlichen mit FLT3 ko-transduzierten Zelllinien führten nicht zu einem IL-3-unabhängigem Ba/F3-Zellwachstum (siehe Abb 3.1.3.1 bis Abb. 3.1.3.4).

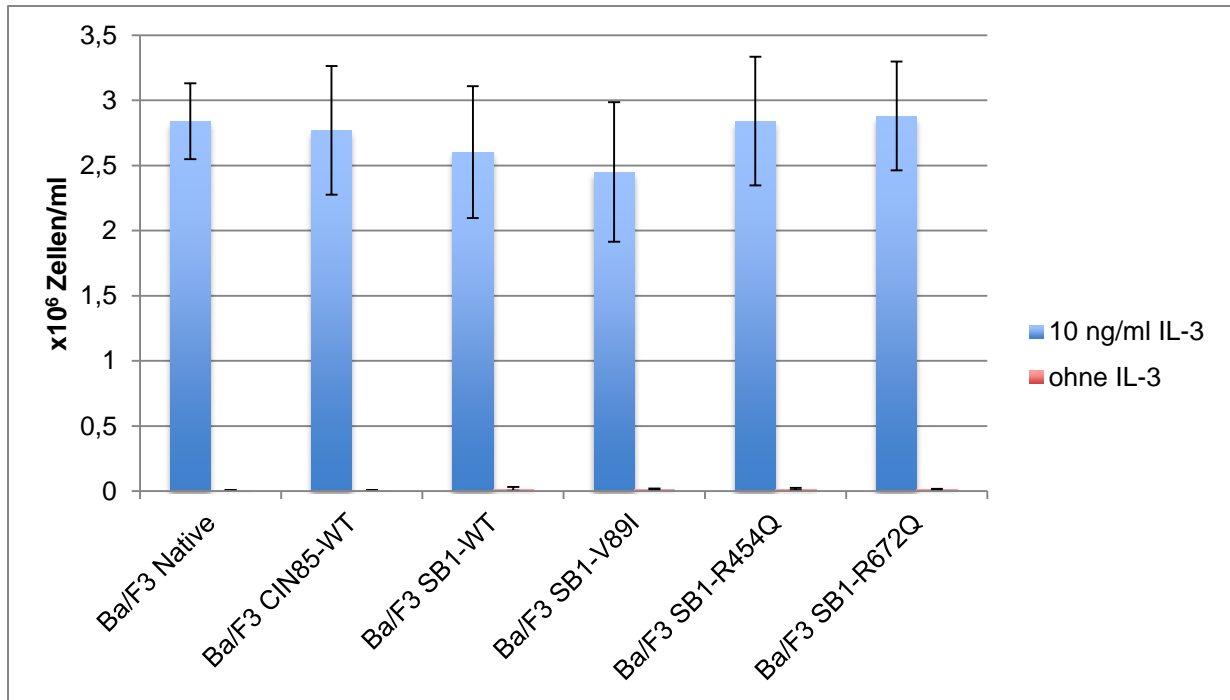


**Abb. 3.1.3.1: Proliferation der doppelt-transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten mit Koexpression von FLT3-WT.**

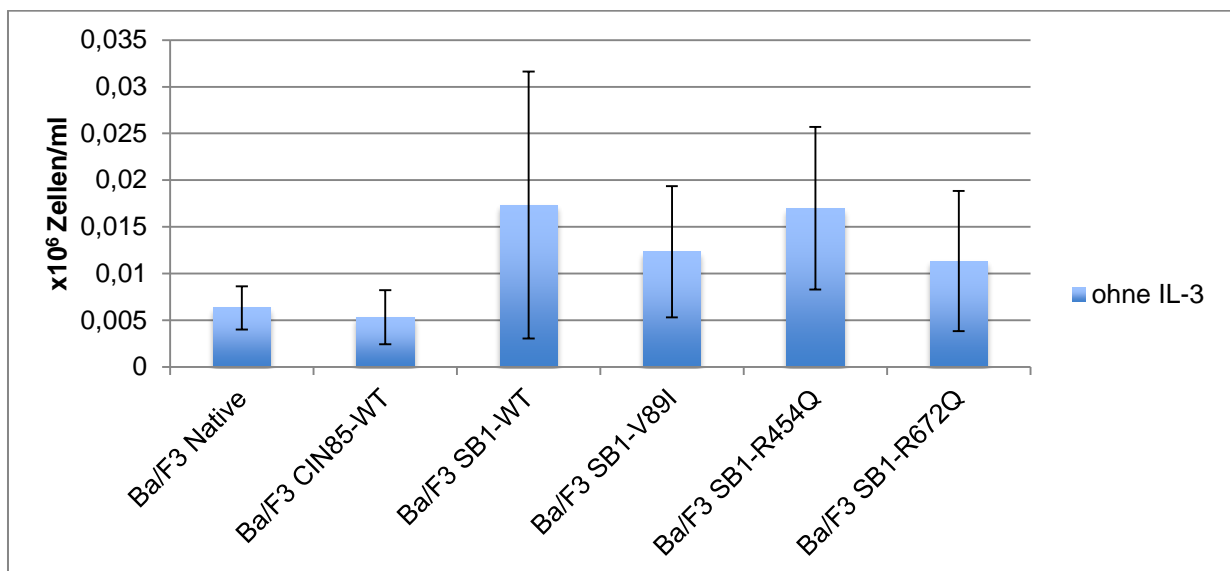
FLT3-WT-exprimierende Zellen wurden mit CIN85-WT und den verschiedenen SB1-Konstrukten (SB1-WT, SB1-V89I, SB1-R454Q, SB1-R672Q) ko-transduziert, für 72 Stunden mit bis zu 50ng/ml FL und 10ng/ml IL-3 inkubiert. Kontrolle native Ba/F3-Zellen. Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl  $\times 10^6$  Zellen/ml.



**Abb. 3.1.3.2: Detailliertere Ansicht von Abb. 3.1.3.1 (geänderte Y-Skalierung): Proliferation der doppelt-transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten mit Koexpression von FLT3-WT, nur Darstellung der Stimulation mit 50ng/ml FL bzw. ohne 10 ng/ml IL-3 stimuliert.** FLT3-WT-exprimierende Zellen wurden mit CIN85-WT und den verschiedenen SB1-Konstrukten (SB1-WT, SB1-V89I, SB1-R454Q, SB1-R672Q) ko-transduziert, für 72 Stunden mit bis 50ng/ml FL bzw. ohne 10ng/ml IL-3 inkubiert. Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl x 10<sup>6</sup> Zellen/ml.



**Abb. 3.1.3.3: Proliferation der einzeln transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten.** Ba/F3-Zellen, die CIN85-WT, SB1-WT bzw. Mutanten exprimieren, wurden für 72 Stunden mit bzw. ohne 10ng/ml IL-3 inkubiert. Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl x 10<sup>6</sup> Zellen/ml.



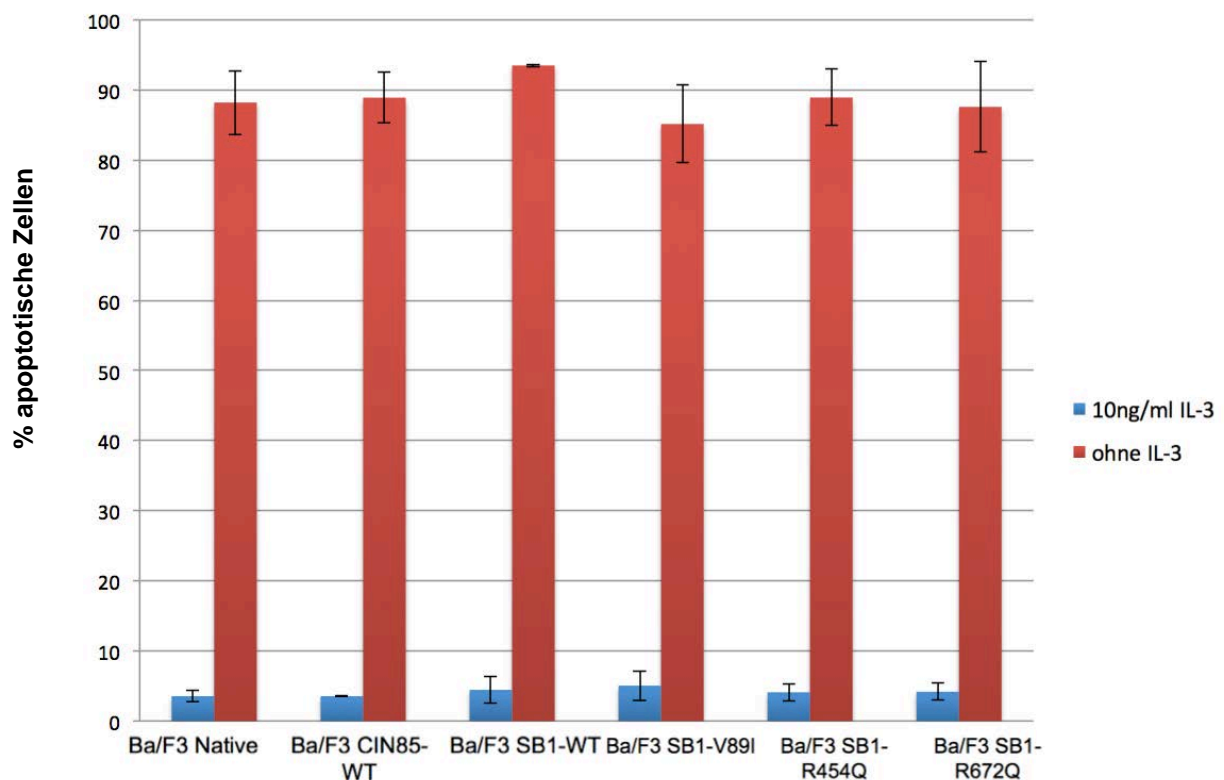
**Abb. 3.1.3.4: Detailliertere Ansicht der Abb. 3.1.3.3 (geänderte Y-Skalierung): Proliferation der einzeln transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten, nur Darstellung der ohne 10ng/ml IL-3-stimulierten Zellen.** Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl x 10<sup>6</sup> Zellen/ml.

### 3.1.4 Untersuchung einer möglichen Apoptoseresistenz nach Zytokinentzug durch SB1-Mutanten

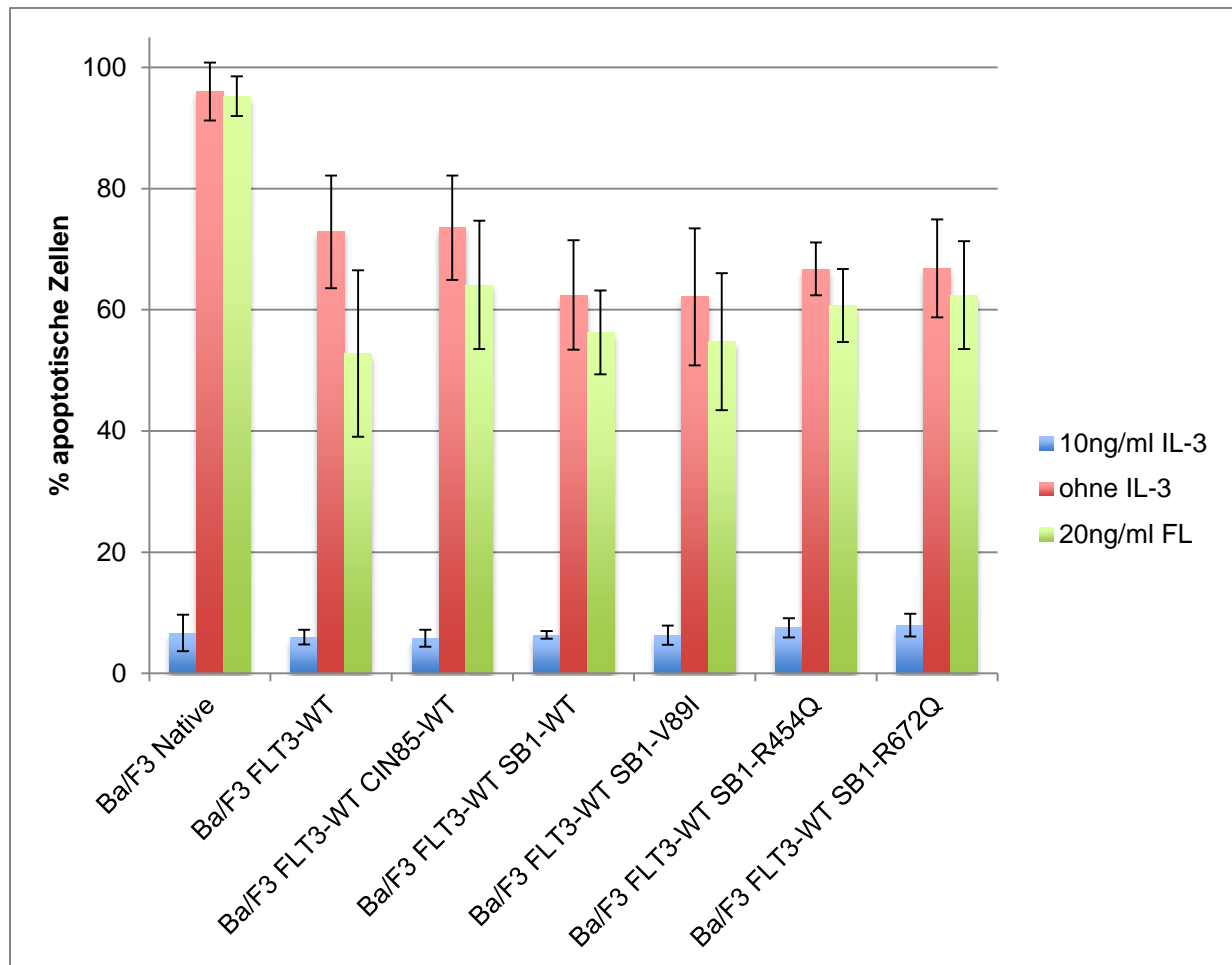
Ein weiterer möglicher Phänotyp von Onkogenen ist die Beeinflussung der Apoptoserate, sodass im Folgenden eine mögliche Apoptoseresistenz der SB1-Konstrukte untersucht wurde. Hierfür erfolgte nach Inkubation der etablierten Zelllinien für 72 Stunden ohne Zytokinzusatz bzw. mit 10ng/ml IL-3 bzw. mit 20ng/ml FL eine Färbung mit 7-AAD und Annexin-V und die Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie. FLT3-WT-Zellen zeigten keine Apoptoseresistenz und unterlagen nach Zytokinentzug schnell der Apoptose [108].

Wie in den Abbildungen 3.1.4.1 und 3.1.4.2 zu sehen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate der einzeln als auch doppelt-transduzierten Zellen.

Auch durch Überexpression von SB1-WT war kein anti-apoptotischer Effekt zu detektieren.



**Abb. 3.1.4.1: Apoptose der einzeln transduzierten Ba/F3-Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten.** Inkubation von mit CIN85-WT bzw. SB1-WT oder Mutanten-transduzierten Zellen ohne Zytokinzusatz bzw. mit 10 ng/ml IL-3 für 72 Stunden. Über 7-AAD- und Annexin-V-Färbung Bestimmung der apoptotischen Zellen via Durchflusszytometrie. Y-Achse: % apoptotische Zellen.

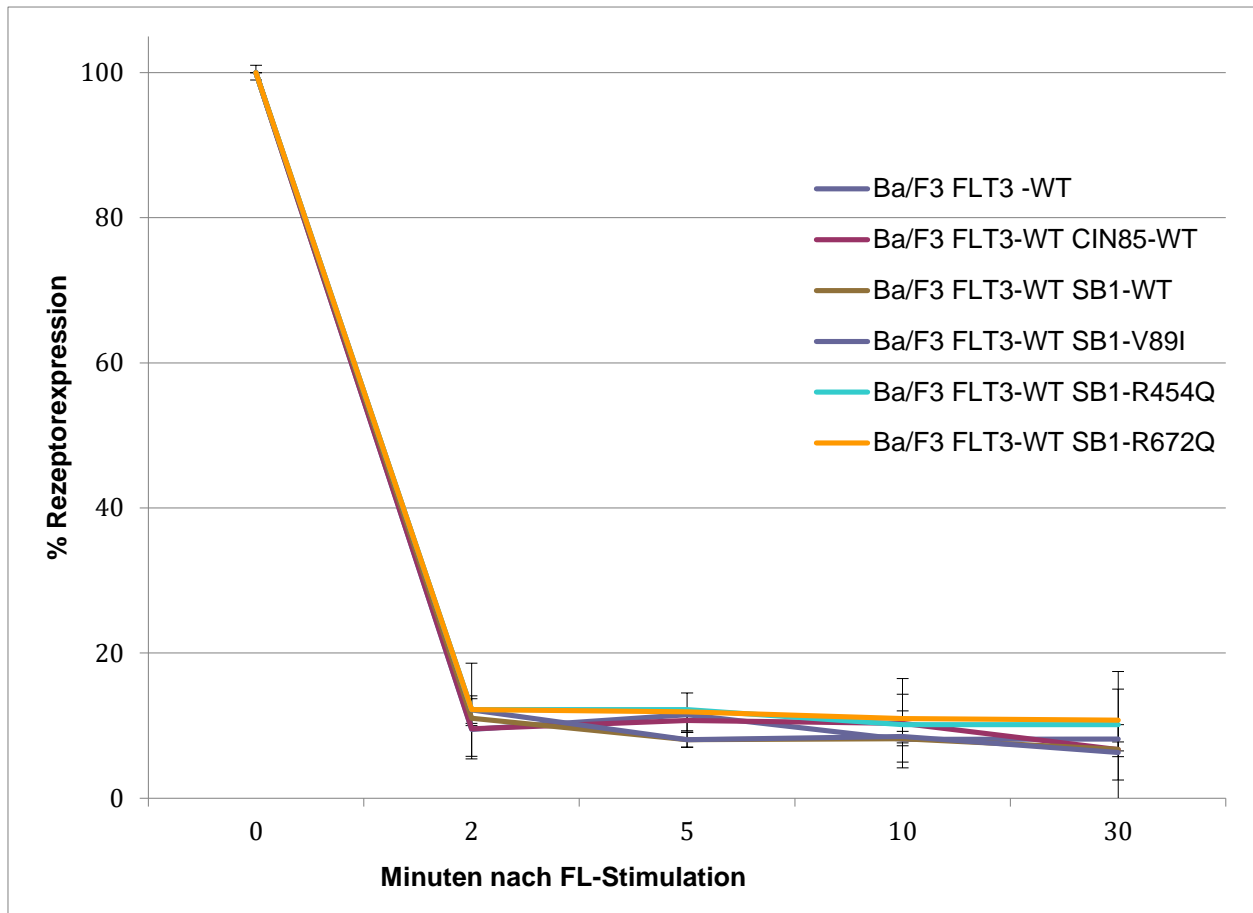


**Abb. 3.1.4.2: Apoptose der doppelt-transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten mit Koexpression von FLT3-WT.** Inkubation von mit CIN85-WT bzw. SB1-WT oder Mutanten-transduzierten und FLT3-koexprimierenden Zellen ohne Zytokinzusatz bzw. mit 20ng/ml FL bzw. mit 10 ng/ml IL-3 für 72 Stunden. Über 7-AAD- und Annexin-V-Färbung Bestimmung der apoptotischen Zellen via Durchflusszytometrie. Y-Achse: % apoptotische Zellen.

### 3.1.5 Die Internalisierung des FLT3-Rezeptors wird durch die Koexpression der CIN85 bzw. SB1-Konstrukte nicht beeinflusst

CIN85 und SB1 über CIN85 interagieren mit dem CBL-Protein, welchem eine entscheidende Rolle in der liganden-abhängigen Endozytose von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen zukommt. Durch SB1-Mutationen könnte es zu einer verlangsamten oder verringerten Internalisierung des Rezeptors kommen. Im Folgenden wurde der mögliche Einfluss der CIN85 bzw. SB1-Konstrukte auf die Internalisierung des FLT3-Rezeptors untersucht. In Ba/F3-FLT3-WT-Zellen erfolgte nach 10-20 Minuten die fast vollständige Internalisierung des FLT3-

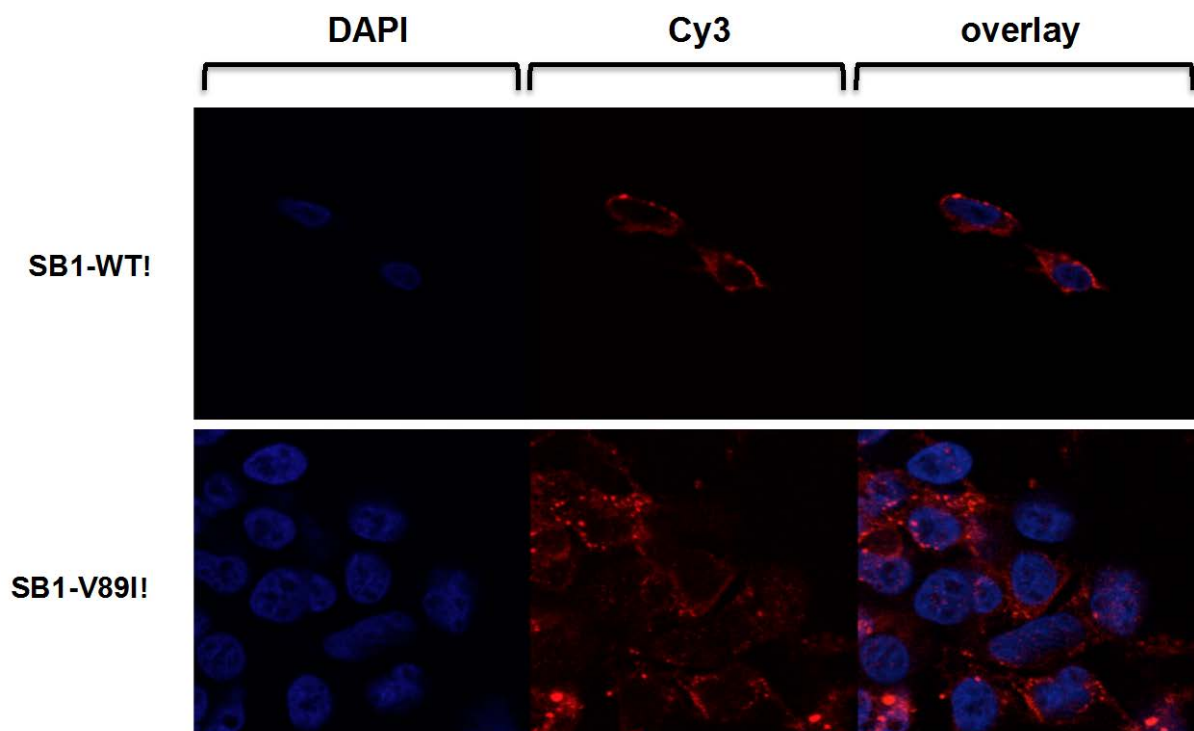
WT-Rezeptors. Wie in Abbildung 1.3.5 zu sehen zeigte sich kein Einfluss der Rate und Geschwindigkeit der Rezeptor-Internalisierung durch die Koexpression der CIN85- bzw. SB1-Konstrukte.

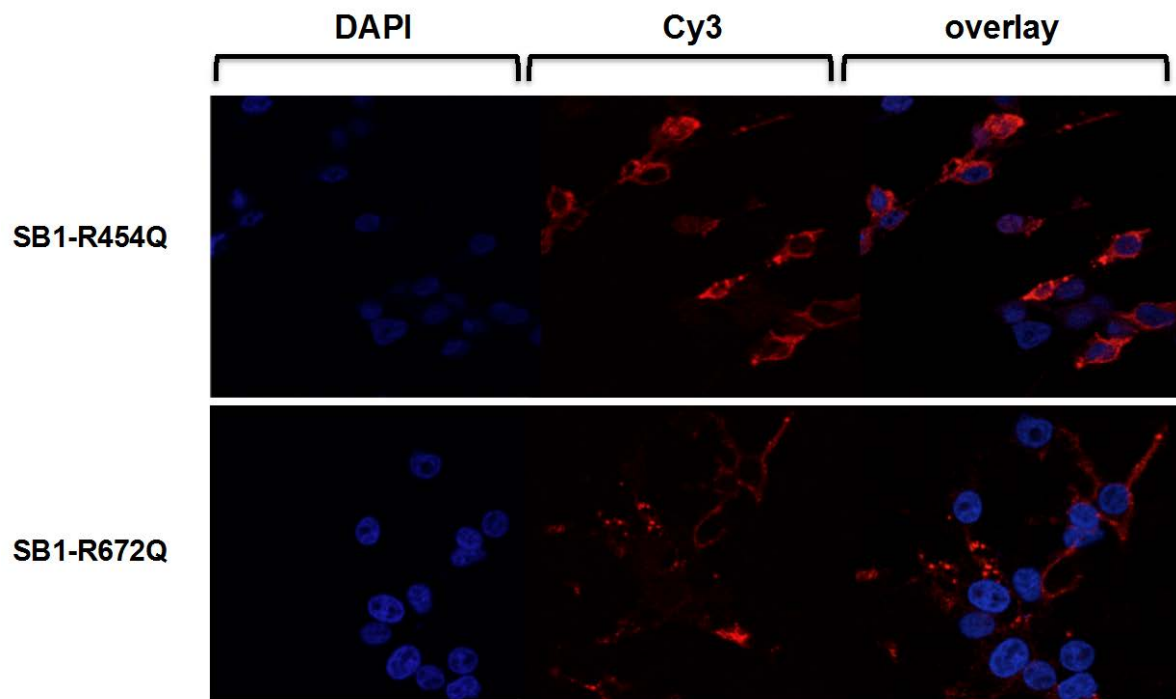


**Abb. 3.1.5: Die Rate und Geschwindigkeit der Internalisierung des FLT3-Rezeptors ist in FLT3-WT- und in FLT3-WT/CIN85-WT bzw. SB1-WT bzw. Mutanten-exprimierenden Zellen gleich.** Die mit FLT3- und den verschiedenen Konstrukten CIN85-WT, SB1-WT, SB1-V89I, R454Q, R672Q kotransduzierten Zellen wurden für 0, 2, 5, 10 bzw. 30 Minuten mit 100 ng/ml FL stimuliert. Anschließend wurde die Rezeptorinternalisierung mit Natriumazid-Puffer gestoppt und die Messung der Rezeptorexpression via Durchflusszytometrie nach Färbung mit FLT3-spezifischem Oberflächenantikörper durchgeführt.

### 3.1.6 Detektion der Lokalisation von SB1-WT und SB1-Mutanten mittels Immunostaining

Durch Kopplung eines sekundären Antikörpers an einen fluoreszierenden Farbstoff und Fluoreszenz-Mikroskopie kann in der Immunfluoreszenz die Lokalisation eines Proteins und mögliche Veränderungen dieser durch Mutationen untersucht werden. Dies ist im Folgenden für SB1-WT und die unterschiedlichen Mutanten aufgeführt. Wie in Abbildung 3.1.6 zu sehen zeigte sich die SB1-WT-Expression hauptsächlich um den Nukleus, sie war aber auch im gesamten Zytoplasma zu finden. Die Expression von SB1-V89I und SB1-R454Q zeigte sich hauptsächlich im Zytoplasma, schwache Expression auch im Nukleus. SB1-R672Q-Expression ebenfalls im Zytoplasma, jedoch kein Nachweis im Nukleus.





**Abb. 3.1.6.: Immunfluoreszenzbilder der Expression von SB1-WT und SB1-Mutanten in HEK 293-Zellen.** Immunfluoreszenz von SB1-WT und den Mutanten SB1-V89I, SB1-R454Q und SB1-R672Q in HEK 293-Zellen, benutzt wurde anti-HA- und Cy3-sekundär-Antikörper. Links DAPI, in der Mitte anti-Cy3-Antikörper, rechts der Overlay.



### **3.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von CIN85 und SB1 in Rezeptor-exprimierenden Zellen**

Nach Darstellung der endogenen Expression von CIN85 in AML-Zelllinien sowie Nachweis einer stabilen Expression der transduzierten Konstrukte der einzeln bzw. doppelt-transduzierten Ba/F3-FLT3/CIN85/SB1-Zelllinien konnte durch die Koexpression der somatischen Mutante SB1-V89I mit FLT3-WT in den Proliferationsversuchen bei Stimulation mit 50ng/ml FL ein leicht erhöhtes FL-induziertes Wachstum detektiert werden. SB1-V89I alleine als auch SB1-WT und die restlichen mit FLT3 ko-transduzierten Zelllinien führten nicht zu einem IL-3-unabhängigem Ba/F3-Zellwachstum. In der Untersuchung einer möglichen Apoptoseresistenz nach Zytokinentzug durch SB1-Mutanten wiesen weder die einzeln transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten noch die doppelt-transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten mit Koexpression von FLT3-WT einen anti-apoptotischen Effekt auf. Ebenso zeigte sich kein Einfluss auf die Rate und Geschwindigkeit der FLT3-Rezeptor-Internalisierung durch die Koexpression der CIN85 bzw. SB1-Konstrukte. In der Fluoreszenz-Mikroskopie konnte die SB1-WT-Expression hauptsächlich um den Nukleus, ebenso schwach im Zytoplasma detektiert werden. Dieses Verhältnis verschob sich bei den SB1-Mutanten SB1-V89I und SB1-R454Q zugunsten des Zytoplasmas, außerdem zeigte sich eine schwache Expression auch im Nukleus. Für die SB1-Mutane R672Q konnte keine Expression im Nukleus detektiert werden.

### **3.2 Vergleich des transformierenden Potentials der AKT1-E17K-Mutante in FLT3-exprimierenden Zellen mit der FLT3-ITD-Mutante W51**

FLT3-ITD-Mutationen sind in der AML mit Leukozytose sowie schlechter Prognose als auch erhöhter Rezidivrate assoziiert und bewirken eine konstitutive Autophosphorylierung und damit Aktivierung des Rezeptors [31, 33, 109, 110].

Als wichtige Komponenten der Signaltransduktion sind die dem FLT3-Rezeptor nachgeordneten MAPK-, AKT- und STAT5-Signalwege bekannt. Vor allem das Signalprotein STAT5, aber auch die Aktivierung des AKT- und MAPK-Signalwegs spielt eine entscheidende Rolle in der Transformation durch FLT3-ITD-Mutationen und damit in der AML-Entstehung [111, 112].

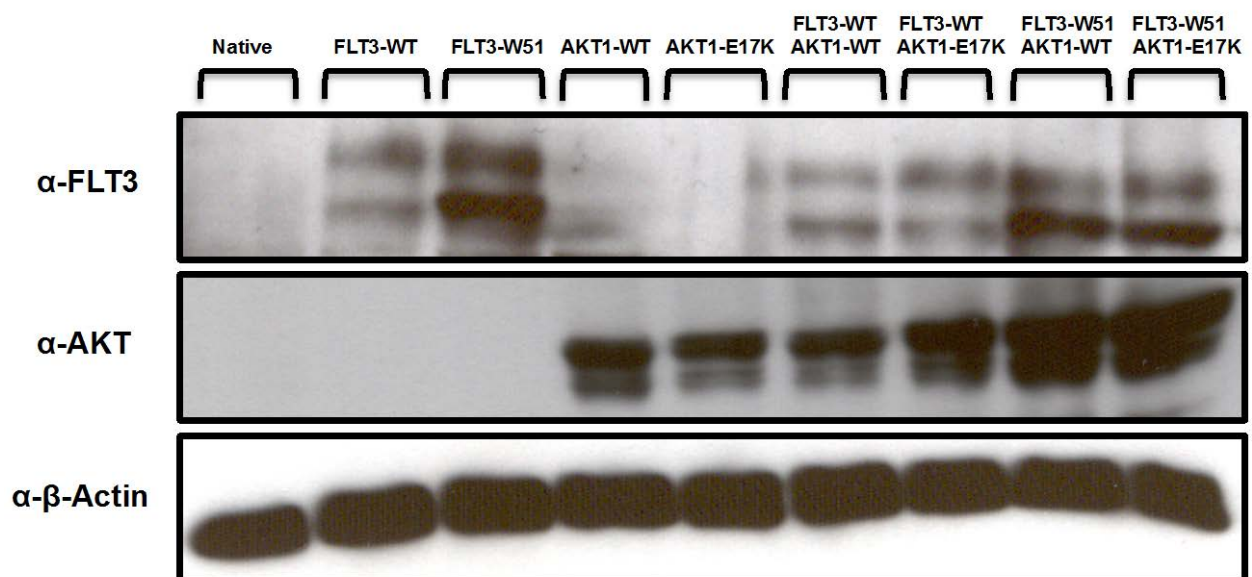
Es wurden im Folgenden die Aktivierung dieser drei Signalproteine durch Phosphorylierung

als auch Proliferation, Inhibition und Apoptose für FLT3-exprimierende Zellen mit der AKT1-E17K-Mutante im Vergleich zu der FLT3-ITD-Mutante W51 untersucht.

### 3.2.1 Stabile Expression der FLT3- und AKT1-Konstrukte in den Ba/F3-Zelllinien

Um das transformierende Potential des AKT-Signalwegs zu zeigen und dieses mit dem der FLT3-ITD-Mutante zu vergleichen, erfolgte die Kotransduktion von AKT1-WT und der konstitutiv aktivierten AKT1-E17K-Mutante mit jeweils FLT3-WT bzw. der FLT3-ITD-Mutante W51. Die Mutation AKT1-E17K konnte in der T-ALL sowie in soliden Tumoren beispielsweise des Harntrakts, der Brust oder der Haut detektiert werden, Mausmodelle wiesen einen leukämischen Phänotyp auf [113, 114].

In der Abbildung 3.2.1 sind die Expressionsnachweise der transduzierten Zelllinien mit den jeweiligen FLT3- und AKT1-Konstrukten, die eine deutliche Überexpression aufweisen, zu sehen.



**Abbildung 3.2.1: Expressionsnachweis der Ba/F3-FLT3/AKT1-Zelllinien.** Untersuchung der Ba/F3-Ganzzell-Lysate auf die Expression der transduzierten Konstrukte. Nachweis des FLT3-Rezeptors mit einem FLT3-spezifischen Antikörper. Detektion der AKT1-Konstrukte mittels spezifischem AKT-Antikörper.  $\beta$ -Actin dient als Ladungskontrolle.

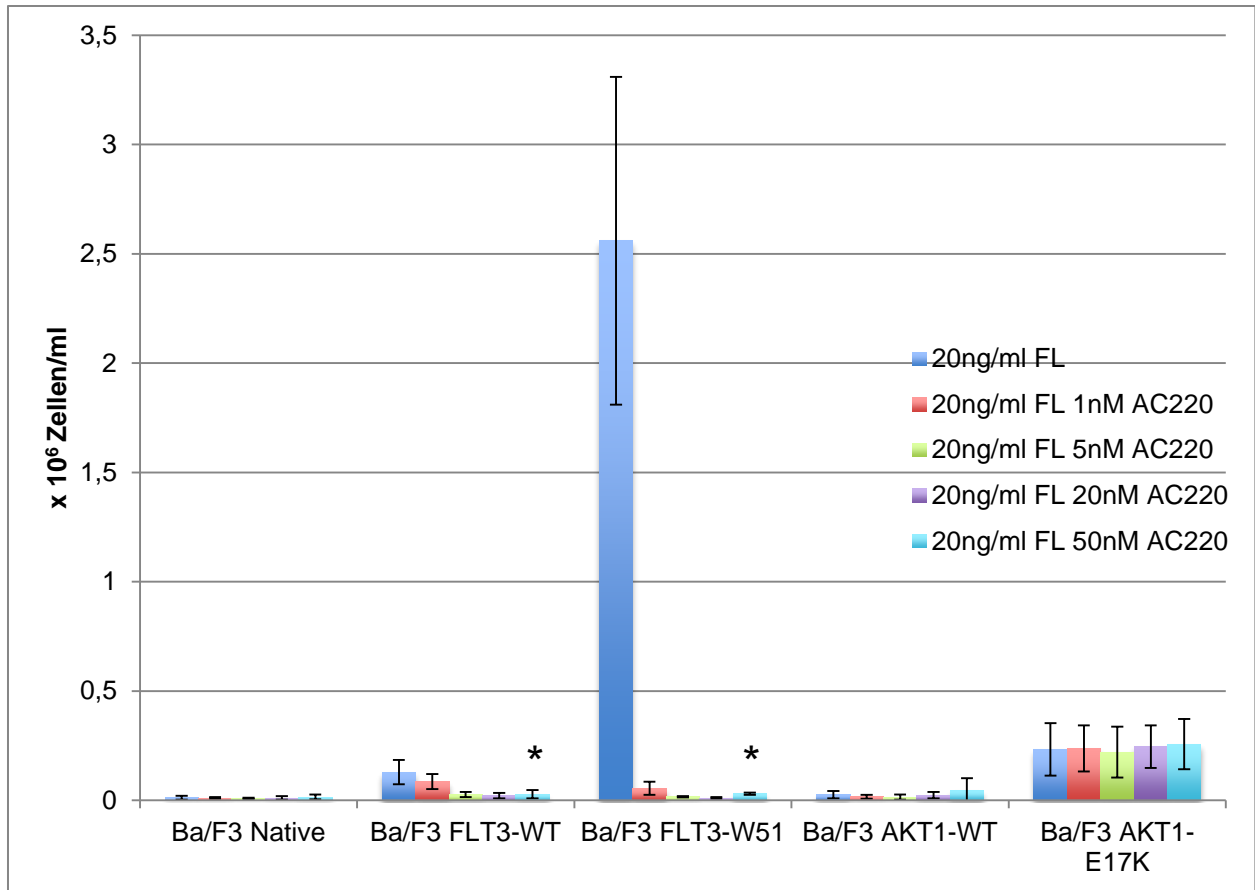
### **3.2.2 Vergleich des pro-proliferativen Phänotyps der AKT1-E17K-Mutante und FLT3-ITD-Mutante W51 in den Ba/F3-Zelllinien und Inhibition des AKT1-E17K-induzierten proliferativen Phänotyps mittels AKT- und FLT3-Inhibitoren**

Um den biologischen Phänotyp der AKT1-E17K-Mutante zu analysieren und mit dem der FLT3-ITD-Mutante W51 vergleichen zu können, wurde die Proliferation mit und ohne Inhibitoren als auch die Apoptoserate der verschiedenen Zellreihen untersucht.

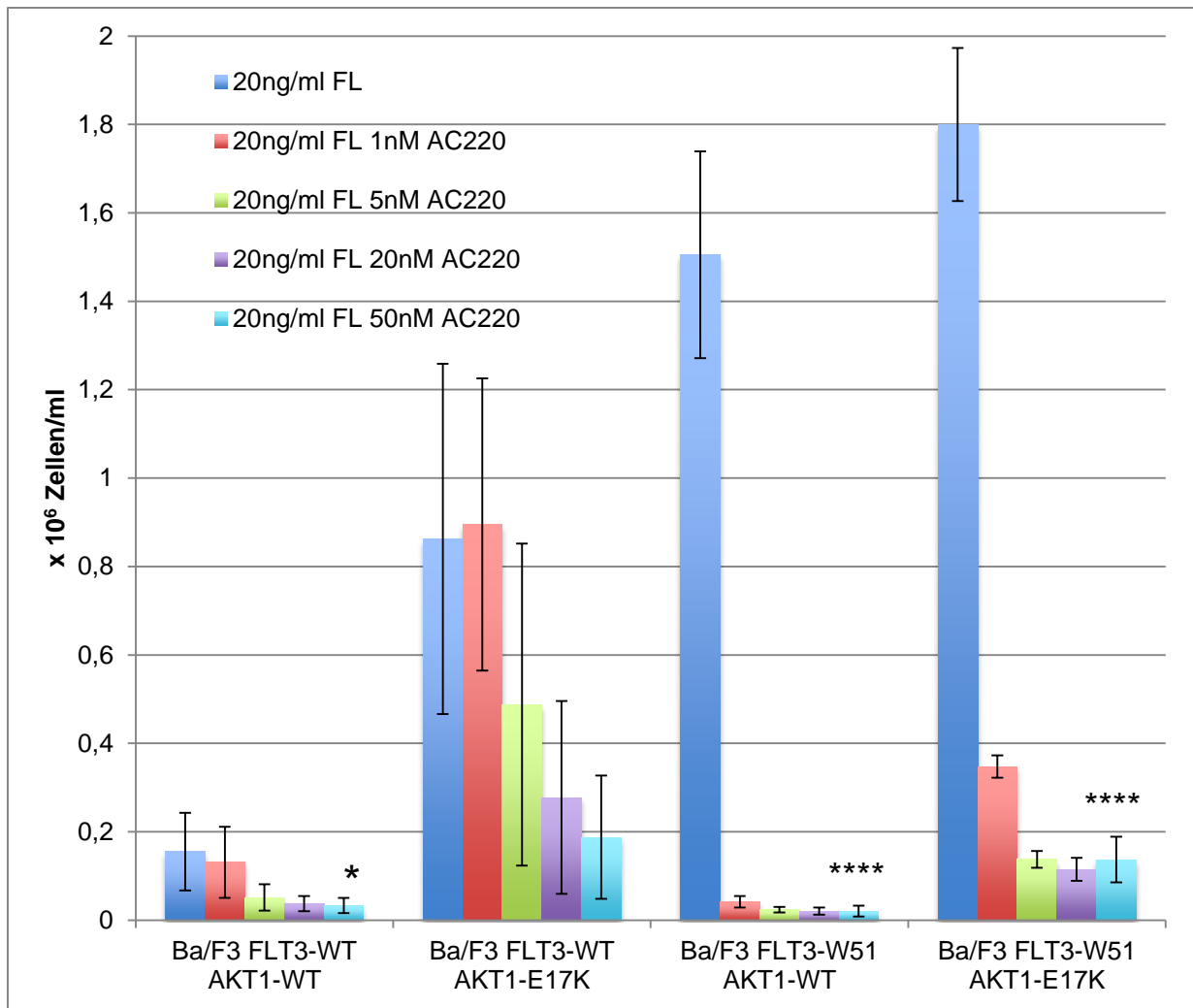
In der Abbildung 3.2.2.1 ist zu sehen, dass sowohl die alleinige Expression von FLT3-W51 als auch die alleinige Expression von AKT1-E17K in den Ba/F3-Zellen im Vergleich zu den FLT3-WT- als auch AKT1-WT-Zellen zu bereits deutlich erhöhtem Zellwachstum führte. Eine Annäherung des pro-proliferativen Phänotyps von AKT1-E17K zu den FLT3-W51-Zellen zeigte sich durch dessen Koexpression mit dem FLT3-Wildtyp-Rezeptor (siehe Abbildung 3.2.2.2). Eine leicht erhöhte Proliferation zeigte sich ebenso in der doppelt-transduzierten Zelllinie FLT3-WT/AKT1-WT im Vergleich zu den nur FLT3-WT-exprimierenden Ba/F3-Zellen.

Wie gleichzeitig in den Abbildungen 3.2.2.1, 3.2.2.2 und 3.2.2.3 zu sehen erfolgte die Hemmung der Zelllinien mittels spezifischer Inhibitoren gegen PI3K/AKT (MK2206) und FLT3 (AC220) in verschiedenen Konzentrationen und in Gegenwart von 20 ng/ml FL. Hier zeigte sich die vollständige Hemmung der Ba/F3-FLT3-W51- und Ba/F3-FLT3-W51/AKT1-WT-Zelllinien durch den FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitor (FLT3-TKI) AC220. Auch die FLT3-W51/AKT1-E17K-Zellen ließen sich durch AC220 auf das Proliferationsniveau der alleinigen Expression der AKT1-E17K-Mutante hemmen. Der PI3K/AKT-Inhibitor MK2206 hingegen hemmte das Wachstum aller drei FLT3-W51-exprimierenden Zelllinien nicht, was auf die Unabhängigkeit des pro-proliferativen Phänotyps der FLT3-ITD-Mutation W51 von dem AKT-Signalweg und auf die größere Bedeutung des STAT5-Signalwegs hindeutet.

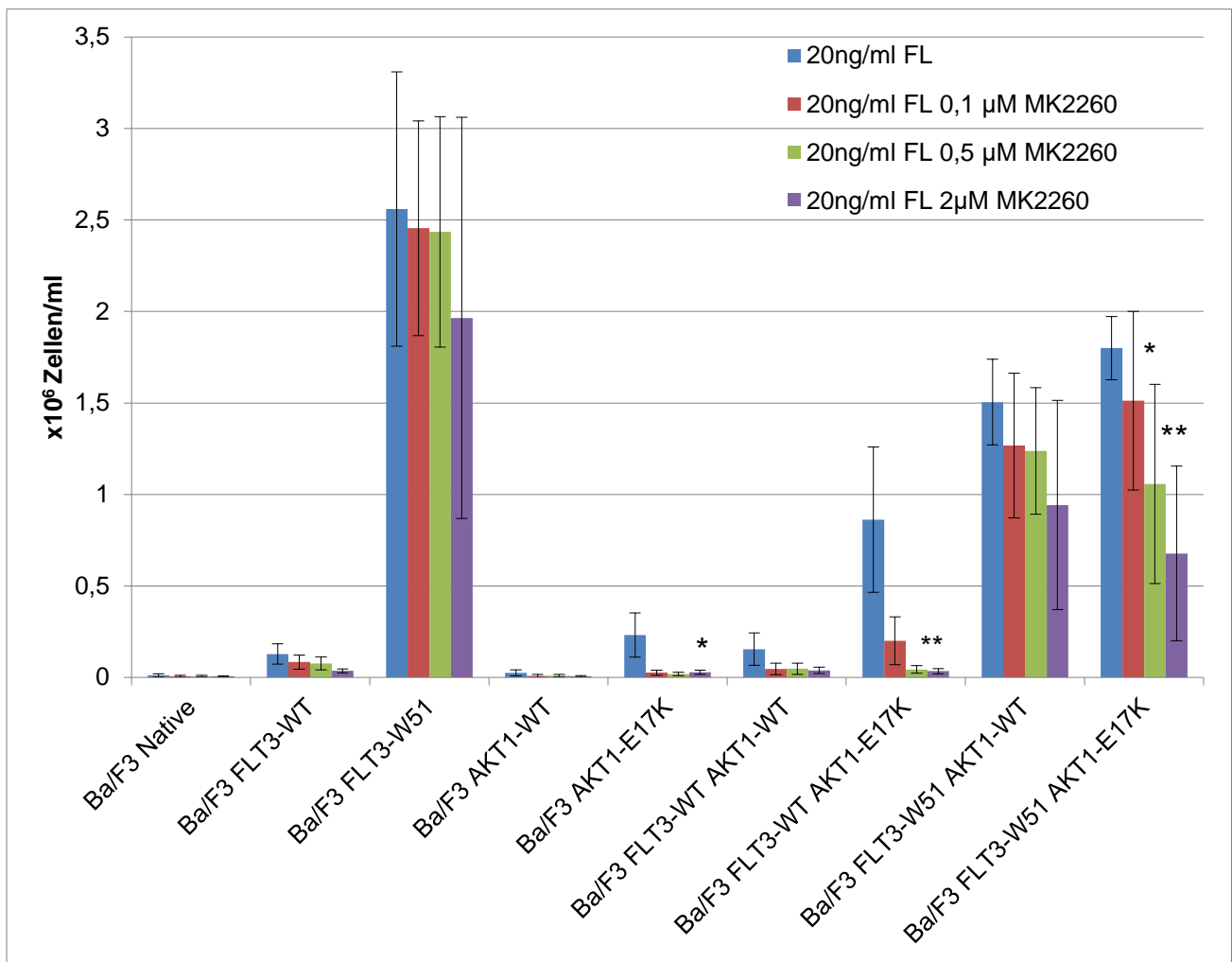
Die Zelllinie FLT3-WT mit Koexpression der AKT1-E17K-Mutante als auch die Zelllinie mit der alleinigen Expression von AKT1-E17K ließ sich durch MK2206 vollständig inhibieren, was die Abhängigkeit des proliferativen Phänotyps von dem AKT-Signalweg bestätigt. Mittels AC220 war keine Inhibition des Ba/F3-AKT1-E17K-Zellwachstums zu verzeichnen.



**Abbildung 3.2.2.1: Proliferation und pharmakologische Inhibition mit AC220 der Ba/F3-FLT3/AKT1-einzeln transduzierten Zelllinien.** Die Zellen wurden für 72 h mit 20 ng/ml FL (dunkelblau) bzw. in Anwesenheit von 20 ng/ml FL mit FLT3-Inhibitor AC220 (1-50 nM) inkubiert, anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung. Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl x 10<sup>6</sup> Zellen/ml. (\*p<0,05, t-Test, bezogen auf die alleinige Stimulation mit 20 ng/ml FL der jeweiligen Zelllinie)



**Abbildung 3.2.2.2: Proliferation und pharmakologische Inhibition mit AC220 der Ba/F3-FLT3/AKT1-doppelt-transduzierten Zelllinien.** Die Zellen wurden für 72 h mit 20 ng/ml FL (dunkelblau) bzw. in Anwesenheit von 20 ng/ml FL mit FLT3-Inhibitor AC220 (1-50 nM) inkubiert, anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung. Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl x 10<sup>6</sup> Zellen/ml. (\*p<0,05, \*\*\*\*p<0,0001, t-Test, bezogen auf die alleinige Stimulation mit 20 ng/ml FL der jeweiligen Zelllinie)

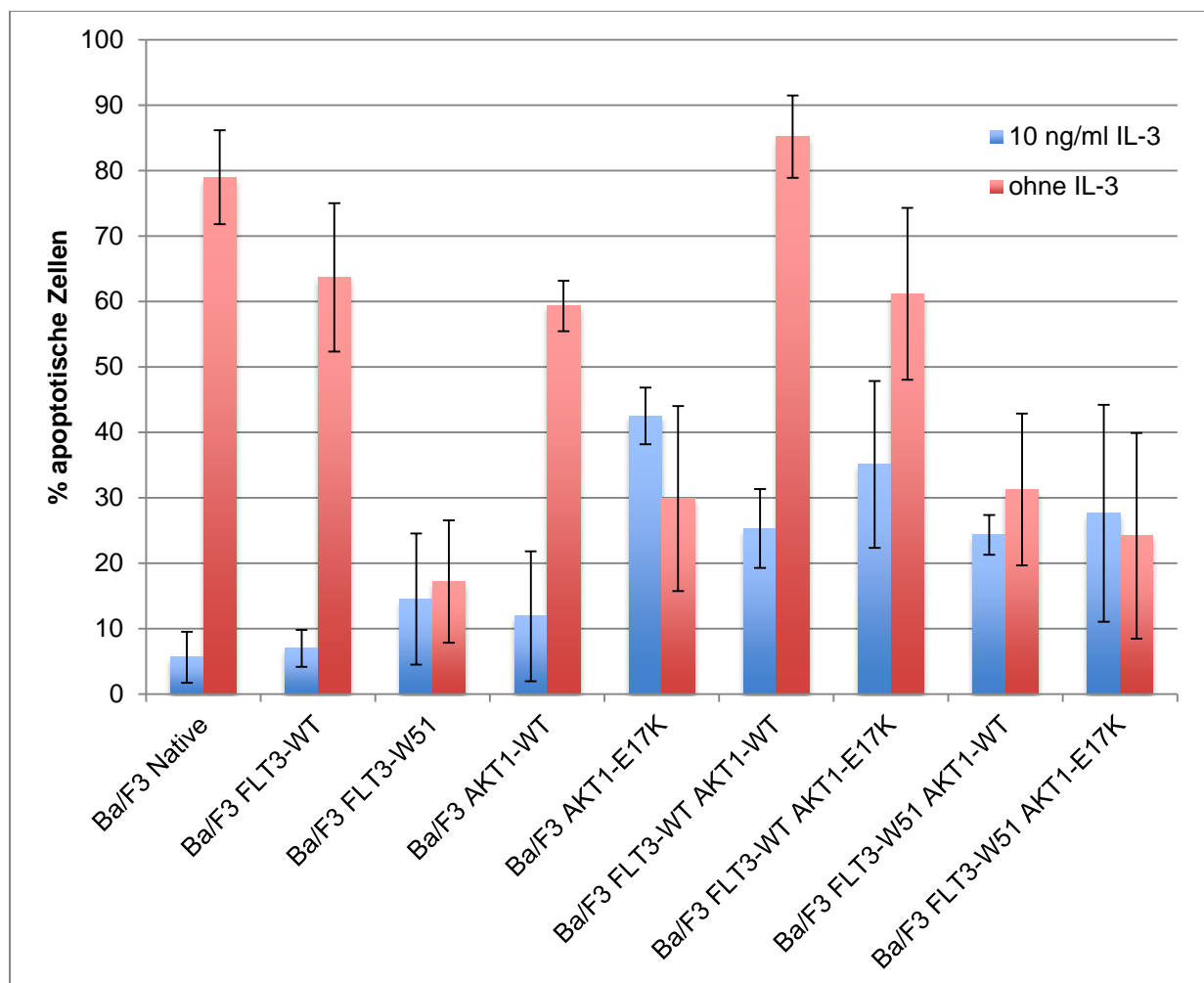


**Abbildung 3.2.2.3: Pharmakologische Inhibition mit MK2206 der Ba/F3-FLT3/AKT1-Zelllinien.** Die Zellen wurden für 72 h mit 20 ng/ml FL (blau) bzw. in Anwesenheit von 20 ng/ml FL dem AKT-Inhibitor MK2206 (0,1-2 µM) inkubiert, anschließend Zellzahlbestimmung. Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl  $\times 10^6$  Zellen/ml. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test, bezogen auf die alleinige Stimulation mit 20 ng/ml FL der jeweiligen Zelllinie)

### 3.2.3 Einfluss der AKT1-E17K-Mutante auf die Apoptose nach IL-3-Entzug

Um den biologischen Phänotyp der AKT1-E17K-exprimierenden Ba/F3-Zellen in Hinsicht auf mögliche Apoptoseresistenz zu charakterisieren, wurden im Folgenden die Apoptoseraten der FLT3/AKT1-Ba/F3-Zelllinien nach IL-3-Entzug untersucht. Wie in Abbildung 3.2.3 zu sehen gab es keinen Unterschied der Apoptoserate für Ba/F3-FLT3-W51-Zellen mit und ohne Zytokinzusatz, Ba/F3-FLT3-W51-Zellen sind vollständig vor Apoptose geschützt. Im Vergleich zu den einzeln transduzierten Ba/F3-FLT3-W51-Zellen wiesen die Ba/F3-FLT3-W51-Zellen in

Koexpression mit AKT1-WT oder AKT1-E17K-Mutante tendenziell mit als auch ohne Zytokinzusatz leicht erhöhte Apoptoseraten auf. Dies könnte im Kontext der AKT1-E17K-Mutante möglicherweise auf ihre veränderte Lokalisation der an der Plasmamembran zurückzuführen sein. Für die einzeln transduzierte AKT1-E17K-Zelllinie war ebenfalls ein deutlicher Apoptoseschutz zu detektieren. Außerdem deuteten sich für die gesamten mit AKT1-WT/E17K-doppelt-transduzierten Zelllinien als auch für die einzeln transduzierte Ba/F3-AKT1-E17K-Zelllinie unter Zusatz von 10 ng/ml IL-3 erhöhte Apoptoseraten an.



**Abbildung 3.2.3: Apoptose der Ba/F3-FLT3/AKT1-Zelllinien.** Inkubation der Ba/F3-FLT3/AKT1-Zelllinien ohne Zytokinzusatz bzw. mit 10 ng/ml IL-3 für 72 Stunden. Über 7-AAD- und Annexin-V-Färbung Bestimmung der apoptotischen Zellen via Durchflusszytometrie. Y-Achse: % apoptotische Zellen.

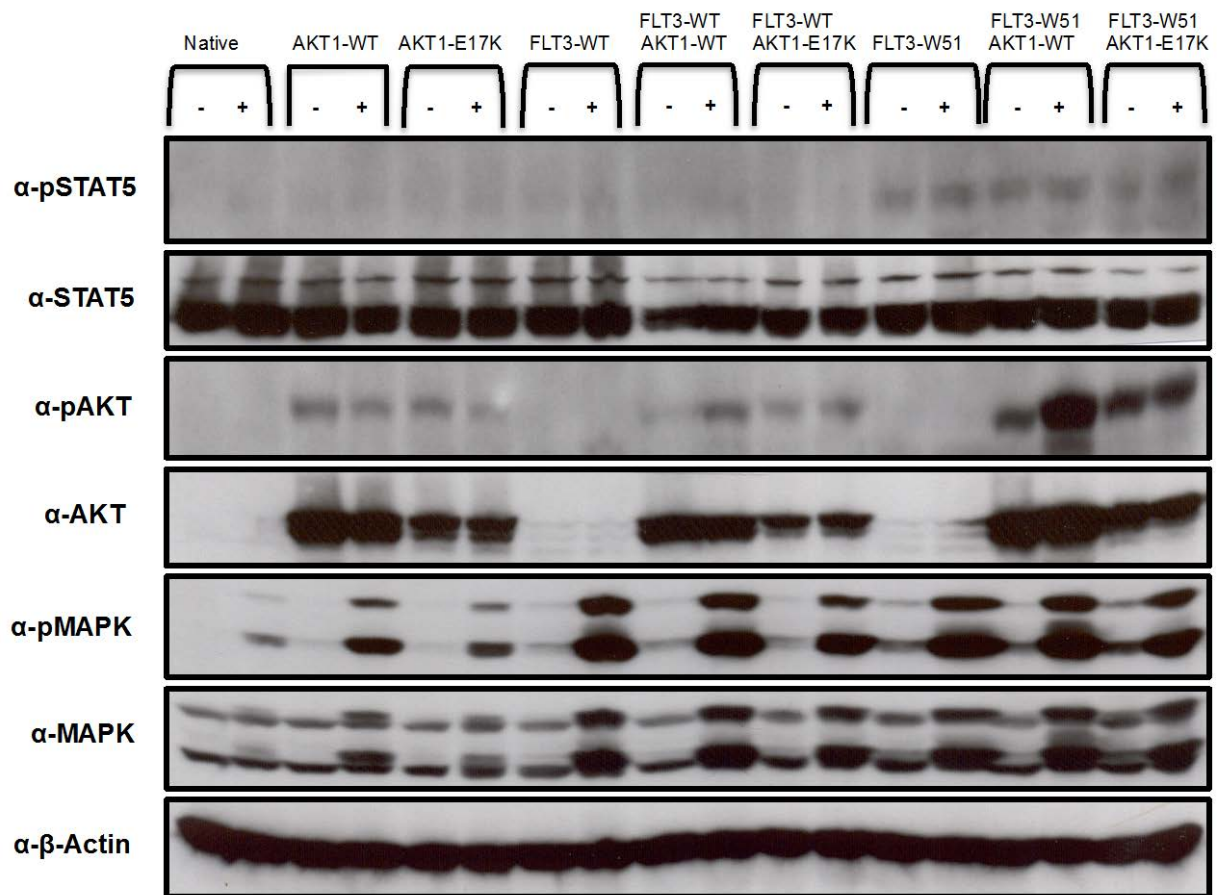
### **3.2.4 Untersuchung der Signalwege STAT5, AKT und MAPK in den Ba/F3-FLT3/AKT-Zelllinien**

Die drei wichtigsten von FLT3 aktivierten Signalkaskaden sind der STAT5-, AKT- und MAPK-Signalweg, welche in FLT3-ITDs konstitutiv aktiviert sind. Im Folgenden wurde die Aktivierung durch Phosphorylierung dieser Signalproteine mittels phosphospezifischer Antikörper in FLT3-exprimierenden Zellen mit der AKT1-E17K-Mutante im Vergleich zu der FLT3-ITD-Mutante W51 untersucht. Wie in der Abbildung 3.2.4 zu sehen zeigte pSTAT5 in allen drei FLT3-W51-Zelllinien einen deutlich erhöhten Grad der Aktivierung sowohl in stimulierten als auch unstimulierten Zellen. Es zeigte sich ein gleichbleibend erhöhter Aktivierungsgrad für die FLT3-W51-Zellen unabhängig von der Koexpression mit AKT1-WT oder AKT1-E17K.

Für AKT zeigte sich eine konstitutive Aktivierung in AKT1-WT- und AKT1-E17K-exprimierenden Zellen mit teilweise leichter Verstärkung durch FL-Stimulation in FLT3-WT-koexprimierenden Zellen. Wie in der Abbildung 3.2.4 zu sehen fand eine starke AKT-Phosphorylierung nur in Anwesenheit der FLT3-ITD-Mutante statt. Diese erhöhte AKT-Aktivierung war in den BA/F3-FLT3-W51-doppelt-transduzierten Zelllinien sowohl mit als auch ohne Stimulation deutlich verstärkt. Ein Unterschied der Aktivierung war eher zugunsten der Ba/F3-FLT3-W51-AKT1-WT-Zelllinie festzustellen.

Die MAPK war in allen drei AKT1-WT-exprimierenden Zelllinien stärker aktiviert als in der AKT1-E17K-Mutante. In den FLT3-WT/W51-Zelllinien zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Aktivierung der MAPK zwischen den jeweils nur rezeptor-exprimierenden oder AKT1-WT-koexprimierenden Zellen.





**Abbildung 3.2.4: Western-Blot-Analyse der durch FLT3-aktivierten Signalkaskaden STAT5, AKT und MAPK.** Hungern der Ba/F3-FLT3/AKT-Zelllinien in 0,3 % FKS-Medium für 24 h, anschließend Lyse der Zellen entweder unbehandelt (-) oder nach 10minütiger Stimulation mit 100 ng/ml FL (+) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Analyse der Ganzzelllysate über Western-Blot mittels phosphospezifischen und nicht-phosphospezifischen STAT5, AKT und MAPK-Antikörpern. β-Actin dient als Ladungskontrolle.

### **3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des biologischen Phänotyps von AKT1-E17K und FLT3-ITD im Vergleich**

Nach Sicherstellung der stabilen Expression der transduzierten Konstrukte der einzeln bzw. doppelt-transduzierten Ba/F3-FLT3/AKT1-Zelllinien erfolgte die Analyse des Phänotyps der AKT1-E17K-Mutante im Vergleich zu FLT3-ITD in Proliferations- und Apoptose-Untersuchungen. Die alleinige Expression von FLT3-W51 als auch die alleinige Expression von AKT1-E17K im Vergleich zu den FLT3-WT- als auch AKT1-WT-Zellen führte bereits zu deutlich erhöhtem, IL-3-unabhängigem Zellwachstum. Eine Annäherung des pro-proliferativen Phänotyps von AKT1-E17K zu den FLT3-W51-Zellen zeigte sich durch dessen Koexpression mit dem FLT3-Wildtyp-Rezeptor. Durch den FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitor AC220 wurde eine vollständige Hemmung der ligand-induzierten Proliferation der Ba/F3-FLT3-W51- und Ba/F3-FLT3-W51/AKT1-WT-Zelllinien gezeigt. Auch die FLT3-W51/AKT1-E17K-Zellen ließen sich durch AC220 hemmen, allerdings nur auf das Proliferationsniveau der alleinigen Expression der AKT1-E17K-Mutante. Mittels AC220 war keine Inhibition des Ba/F3-AKT1-E17K-Zellwachstums zu verzeichnen.

Durch Inhibition mit dem PI3K/AKT-Inhibitor MK2206 hingegen konnte das Wachstum der Zelllinie mit der alleinigen Expression von AKT1-E17K als auch der Zelllinie FLT3-WT mit Koexpression der AKT1-E17K-Mutante vollständig gehemmt werden.

In der Untersuchung einer möglichen Apoptoseresistenz nach 72 h Zytokin-Entzug wies die AKT1-E17K-Zelllinie als auch die Ba/F3-FLT3-W51-Zelllinie einen hohen Apoptoseschutz auf. Hinsichtlich der Signalübertragung wurde für pSTAT5 in allen drei FLT3-W51-Zelllinien ein deutlich erhöhter Grad der Aktivierung sowohl in stimulierten als auch unstimulierten Zellen deutlich. Es zeigte sich ein gleichbleibend erhöhter Aktivierungsgrad für die FLT3-W51-Zellen unabhängig von der Koexpression mit AKT1-WT oder AKT1-E17K. AKT zeigte in AKT1-WT- und AKT1-E17K-exprimierenden Zellen mit teilweise leichter Verstärkung durch FL-Stimulation in FLT3-WT-koexprimierenden Zellen eine konstitutive Aktivierung. Eine starke AKT-Phosphorylierung fand nur in Anwesenheit der FLT3-ITD-Mutante statt.

MAPK wurde nach Stimulation in allen drei AKT1-WT-exprimierenden Zelllinien stärker aktiviert als in der AKT1-E17K-Mutante.

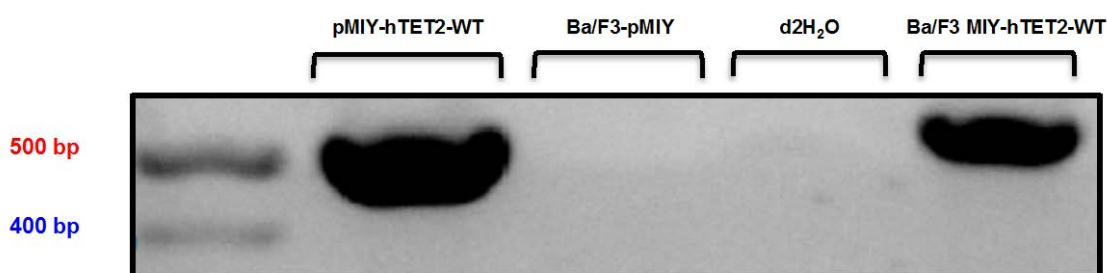
### 3.3 Der epigenetische Regulator TET2

TET2 spielt als epigenetischer Regulator eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und Entstehung von hämatologischen Neoplasien. Neben Mutationen in SB1 wurden innerhalb der letzten Jahre viele TET2-Mutationen in Leukämien identifiziert. In der Literatur ist eine besonders hohe TET2-Mutationsrate von ca. 50% in der CMML beschrieben, aber auch in der AML wurde mutiertes oder deletiertes TET2 mit einer Gesamtfrequenz von um die 10-20% detektiert [79, 81]. Ein Ziel dieses Teilprojekts der vorliegenden Doktorarbeit ist es, weitere CMML-Patienten auf Rate und Art von TET2-Mutationen zu untersuchen. Des Weiteren sollte hTET2 in der murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3 funktionell charakterisiert werden.

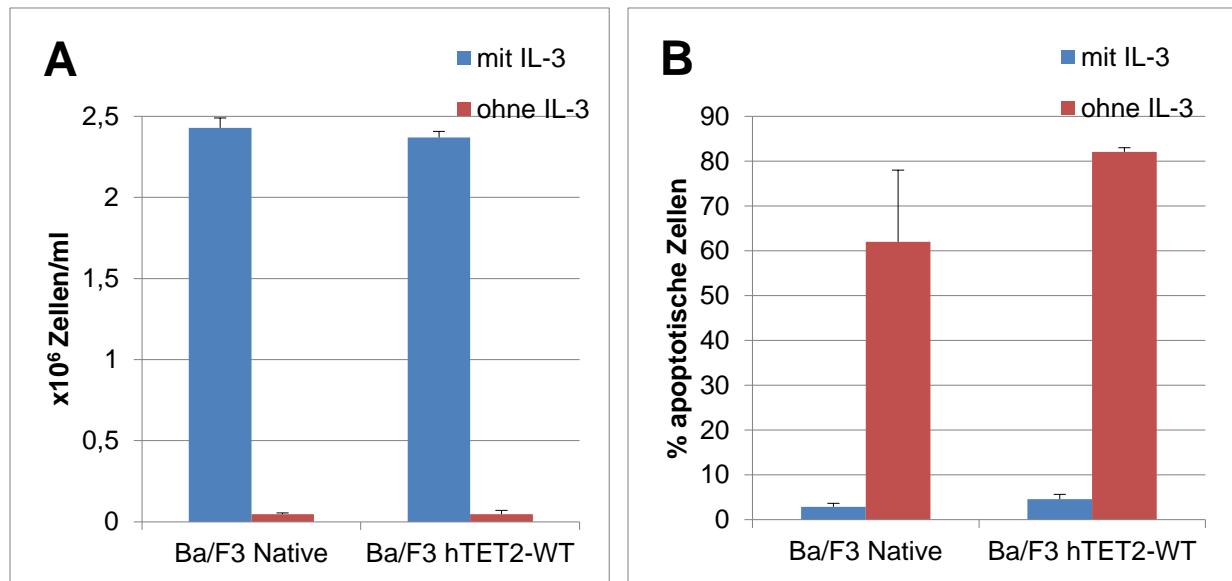
#### 3.3.1 Funktionelle Charakterisierung von hTET2-WT in Ba/F3-Zellen

Es erfolgte im Folgenden die Klonierung der cDNA von humanem TET2-WT in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV-IRES-eYFP (MIY). Durch vollständige Sequenzierung wurde die hTET2-WT-Nukleotidsequenz verifiziert. Das Konstrukt wurde anschließend stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert (siehe Abbildung 3.3.1.1).

Außerdem wurden Proliferations- als auch Apoptose-Assays von Ba/F3-hTET2-WT durchgeführt, in denen kein pro-proliferativer oder anti-apoptotischer Phänotyp von hTET2-WT zu sehen war (siehe Abbildung 3.3.1.2).



**Abbildung 3.3.1.1: Expressionskontrolle von hTET2-WT in Ba/F3-Zellen.** PCR mit hTET2-spezifischen Primern aus der cDNA der Zelllinien Ba/F3-pMIY (als Negativkontrolle), Ba/F3 MIY-hTET2-WT, außerdem pMIY-hTET2-WT (als Positivkontrolle) als auch d2H<sub>2</sub>O zur Kontrolle der Expression von hTET2-WT. Zu erwartende Größe der Bande: 534 bp. Mangels fehlender Funktionalität der kommerziellen TET2-Antikörper erfolgte die TET2-Expressionskontrolle mittels Detektion von RNA-Expression.



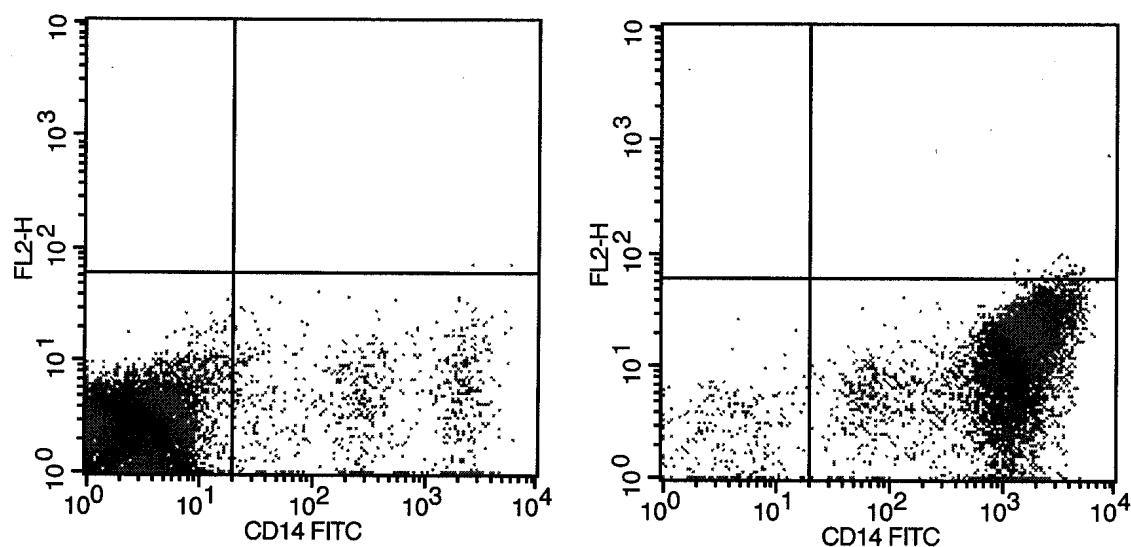
**Abb. 3.3.1.2: Proliferation und Apoptose der Zelllinie Ba/F3 hTET2-WT.** (A) Die nativen Ba/F3-Zellen und Ba/F3 hTET2-WT wurden für 72h mit bzw. ohne 10ng/ml IL-3 inkubiert. Y-Achse: angegeben ist die absolute Zellzahl x 10<sup>6</sup> Zellen/ml. (B) Inkubation der nativen Ba/F3-Zellen und Ba/F3 hTET2-WT ohne Zytokinzusatz bzw. mit 10 ng/ml IL-3 für 72 Stunden. Über 7-AAD- und Annexin-V-Färbung Bestimmung der apoptotischen Zellen via Durchflusszytometrie. Y-Achse: % apoptotische Zellen.

### 3.3.2 Screening von CMML-Patienten auf TET2-Mutationen

Es wurde beschrieben, dass vor allem Patienten mit chronisch myelomonozytärer Leukämie die höchsten Raten an TET2-Mutationen aufweisen. Aufgrund dieser Tatsache wurde im Folgenden aus dem peripheren Blut von 8 anonymisierten CMML-Patienten (erhalten aus der Probenbank des Leukämie-Diagnostiklabors des Universitäts-Klinikums München als auch von dem niedergelassenen Hämato-Onkologen Dr. Siegfried Völkl in München und Dr. Maywald, Onkologische Praxis Ingolstadt) die Monozytenpopulation via Ficoll und MACS-Sortierung isoliert. Eine Kontrolle des Vorhandenseins einer fast vollständig CD14-positiven Zellpopulation erfolgte mittels Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 3.3.2). Die Isolierung der Monozyten erfolgte, um reine, aus der erkrankten Zellpopulation stammende Untersuchungen durchführen zu können. Aus dieser CD14-positiven Zellpopulation wurden RNA, cDNA und Proteinlysate hergestellt. Weitere Untersuchungen neben der Sequenzierung stehen aktuell noch aus.

Des Weiteren erfolgte in einer Kooperation mit der AG K. Metzler aus der cDNA der via Ficoll und MACS-Sortierung isolierten Monozyten der 8 CMML-Patienten über „*targeted amplicon sequencing*“ die Amplifikation des *TET2*-Gens und ihre anschließende Sequenzierung. Hierbei wurden die kodierenden Exone, genau die Exone 4A, 4C, 5-11, des längsten bekannten *TET2*-Transkripts über PCR amplifiziert und über direkte DNA-Sequenzanalyse auf Mutationen untersucht [86].

Patient 1 wies die „nonsense“-Mutation R1216X auf, welche in einem Stopp der Translation resultiert. Die Mutation *TET2* Q1139fs, die in Patient 2 nachgewiesen wurde, führt zu einem frameshift. Patient 3 hatte die Punktmutante R1359C und die ebenfalls zu einem frameshift führende Mutation S1775fs. Die Patientenprobe 4 wies die Punktmutante I1873T als auch eine Deletion von K680 auf. Insgesamt konnte in den 8 Patientenproben somit eine Mutationsfrequenz von 50 Prozent detektiert und die aus der Literatur bekannten Mutationsraten in der CMML bestätigt werden. Alle nachgewiesenen Mutationen sind bereits beschrieben.



**Abbildung 3.3.2: Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut der CMML-Patienten. FACS-Analyse der magnetischen Separation mit dem monoklonalen Antikörper CD14-FITC. Links: Kontrolle der CD14-positiven Zellpopulation nach erfolgtem Ficoll, also Isolation mononukleärer Zellen. Rechts: Kontrolle der CD14-positiven Zellpopulation nach erfolgter MACS-Sortierung, also Isolation von Monozyten durch CD14-MircoBeads.**

### 3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des epigenetischen Regulators TET2

Nach erfolgreichem Nachweis einer stabilen Expression von hTET2-WT in Ba/F3-Zellen erfolgten sowohl Proliferations- als auch Apoptose-Assays von Ba/F3-hTET2-WT, in denen kein pro-proliferativer oder anti-apoptotischer Phänotyp von hTET2-WT zu sehen war. Zudem wurde von 8 anonymisierten CMML-Patienten die Monozytenpopulation isoliert, aus dieser CD14-positiven Zellpopulation wurden RNA, cDNA und Proteinlysate hergestellt. Des Weiteren fand über „*targeted amplicon sequencing*“ die Amplifikation der Exone 4A, 4C, 5-11 des *TET2*-Gens aus der cDNA der 8 CMML-Patienten und ihre anschließende Sequenzierung statt. Hierbei konnten die bereits beschriebenen Mutationen TET2 R1216X, TET2 Q1139fs, TET2 R1359C, TET2 S1775fs, TET2 I1873T und TET2 K680del nachgewiesen und eine Mutationsfrequenz von 50% detektiert werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der neu detektierten Punktmutationen in SB1

Durch neue Sequenzierungsmethoden wie beispielsweise der Transkriptom-Sequenzierung konnten innerhalb der letzten Jahre eine Vielzahl von neuen Genmutationen in Tumoren identifiziert werden. Diese neu entdeckten Mutationen untermauern die Komplexität und Vielfalt der zellulären Prozesse, die eine Rolle in der Initiation und Propagation der Leukämie spielen können. Um den Einfluss der neu identifizierten Mutationen auf die maligne Transformation oder Tumorentstehung zu verstehen, müssen diese funktionell untersucht werden. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die ebenfalls über Transkriptom-Sequenzierung neu detektierten Punktmutationen in SB1, nämlich SB1-V89I, SB1-R454Q und SB1-R672Q, funktionell zu charakterisieren.

Nach der Identifikation des Gens *SB1*, auch Seta binding protein 1 oder *SHKBP1* genannt, im Jahr 2000 von Borinstein *et al.* konnte im Jahr 2011 durch unsere Arbeitsgruppe erstmals eine somatische *SB1*-Mutation SB1-V89I in der AML beschrieben werden [76, 78]. Zudem gelang über Kapillarsequenzierung genomischer DNA weiterer AML-Patienten die Identifikation zwei weiterer Missense-Mutationen von *SB1* (R454Q und R672Q). Wie der Name bereits impliziert bindet SB1 an Seta (=CIN85), welches als Multi-Adapter-Protein fungiert und unter anderem über CBL in die Internalisierung und Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen und in die Apoptose involviert ist [64, 75]. Zudem wurden anti-apoptotische Effekte in Zelllinien mit einer Überexpression von SB1 gezeigt, was darauf hindeutet, dass es sich bei SB1 um ein Protoonkogen handelt [77]. Außerdem wird *SHKBP1* aufgrund seiner Zugehörigkeit zu einem Netzwerk von Inflammations-Proteinen eine potentielle prognostische Rolle nach einem Herzinfarkt zugesprochen [115].

Um den biologischen Phänotyp von SB1 genauer charakterisieren zu können, erfolgten Proliferations-, Apoptose-, Internalisierungs- als auch Immunfärbungs-Untersuchungen von SB1-WT und SB1-Mutanten. Hierfür wurde das Ba/F3-Zellmodell, eine murine, IL-3-abhängige pro-B-Zelllinie, verwendet. In unterschiedlichen AML-Zelllinien als auch den Ba/F3-Zellen konnte eine endogene Expression von CIN85 unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden, was ein ubiquitäres Vorhandensein von CIN85 vermuten lässt. Mangels fehlender Funktionalität der kommerziellen SB1-Antikörper konnte die endogene Expression für SB1 nicht dargestellt werden. Aufgrund der IRES-Sequenz des retroviralen Vektors pMSCV-IRES-

EGFP - in welchen die Klonierung der SB1-Konstrukte erfolgte - wird gewährleistet, dass sich das EGFP und das jeweilige Insert auf derselben mRNA befinden, was somit gleichzeitig eine hohe Wahrscheinlichkeit auf die stabile Expression der SB1-Inserts sicherstellt. Zudem wurde für weitere Expressionsuntersuchungen mittels HA-Tag der SB1-Konstrukte der Expressionsnachweis gewährleistet. Aufgrund der endogenen Expression von CBL als auch CIN85 in unserem Zellmodell konnte nach Doppelt-Transduktion der Ba/F3-Zellen mit dem FLT3-Rezeptor als auch mit den unterschiedlichen SB1-Konstrukten (SB1-WT und SB1-Mutanten) von der Vollständigkeit der Signalkaskade FLT3-CBL-CIN85-SB1 ausgegangen werden.

Die Bindung von CIN85 an c-CBL spielt in der Endozytose von Rezeptor-Tyrosinkinasen sowie deren Degradation eine entscheidende Rolle. Die Interaktion findet zwischen dem Prolin-Arginin-Motiv (PXXXPR) von CBL und den SH3-Domänen von CIN85 statt. Die Isoform von CIN85 mit drei SH3-Domänen häuft über die verschiedenen SH3-Domänen mehrere CBL-Moleküle an, was einen kritischen Schritt für eine effiziente Degradation von RTKs darstellt. CIN85 interagiert als Multi-Adapter-Protein neben CBL mit einer Vielzahl von weiteren Proteinen wie beispielweise GRB2 oder dem in der vorliegenden Doktorarbeit näher untersuchten SB1. Die Formation eines solchen Protein-Netzwerks ist in die Kontrolle von Rezeptor-Tyrosinkinasen entscheidend miteingebunden [69]. Wie in dem Paper von Borinstein *et al.* gezeigt wurde, ist SB1 *in vitro* in der Lage jede der drei SH3-Domänen von CIN85 zu binden, wobei die stärkste Bindung in der SH3-1-Domäne detektiert wurde (siehe Abbildung 1.3.3). Das Paper von Feng *et al.* zeigt, dass CBL und SB1 um die Bindung an CIN85 konkurrieren und dass SB1 die Formierung des CBL-CIN85-Komplexes beeinflusst. Des Weiteren wurde gezeigt, dass SB1 die Degradation des EGF-Rezeptors (engl. für Epidermal Growth Factor Receptor) verzögert und dessen Signalwege verstärken kann [116].

Aufgrund dieser Daten sollte in der vorliegenden Doktorarbeit der Einfluss der in der AML neu detektierten SB1-Mutanten untersucht sowie der Effekt der alleinigen Überexpression von SB1-WT in unserem Zellmodell überprüft werden.

In unseren durchgeführten Untersuchungen zeigte die Koexpression von FLT3-WT mit CIN85- bzw. den unterschiedlichen SB1-Konstrukten keinen Einfluss auf die FLT3-Internalisierung. Der FLT3-Rezeptor wurde durch die Koexpression von CIN85-WT oder SB1-WT bzw. SB1-Mutanten weder in der Geschwindigkeit noch bzgl. der Rate signifikant abweichend internalisiert. Es wurde eine ubiquitäre endogene Expression der in der Signalkaskade involvierten Proteine CBL und CIN85 in unserer Arbeitsgruppe sichergestellt. Durch Ko-Transduktion des nicht endogen exprimierten Konstrukts FLT3-WT sowie der zu untersuchenden SB1-WT- und SB1-Mutanten-Konstrukte wurde die Vollständigkeit des FLT3-CBL-CIN85-SB1-Signalwegs sichergestellt. Dennoch könnten andere, in unserem Zellmodell möglicherweise fehlende Proteine für den Signalweg eine wichtige Rolle spielen. Zudem



scheint auch die Verwendung von Konstrukten unterschiedlicher Spezies als möglicher Störfaktor der Interaktion der verschiedenen Proteine denkbar.

In Hinblick auf einen möglichen Einfluss der Überexpression von SB1-WT oder Mutanten auf die Zellproliferation oder –apoptose durch Beeinflussung der FLT3-CBL-CIN85-SB1-Signalkaskade folgten weiterführende in-vitro-Ansätze. Nach stabiler Expression der unterschiedlichen Konstrukte in den Ba/F3-Zelllinien zeigte sich bezüglich eines möglichen IL-3-unabhängigen Zellwachstums der SB1-Mutanten kein pro-proliferativer Phänotyp. Einzig die Koexpression der somatischen Mutante SB1-V89I mit FLT3-WT wies bei Stimulation mit 50ng/ml FL ein minimal erhöhtes FL-induziertes Wachstum auf.

Auch in den Apoptoseexperimenten konnte keine Apoptoseresistenz der Ba/F3-Zelllinien durch SB1-Mutanten, ebenso wenig durch die alleinige Überexpression von hSB1-WT wie durch das Paper Liu *et al.* beschrieben gezeigt werden. In der Studie von Liu *et al.* zeigte sich ein vermindertes TNF-induziertes Apoptoselevel durch Überexpression von humanem SB1 in der ovariellen Zelllinie OV-90 [77].

Bei der Immunfärbung zeigte sich die SB1-WT-Expression hauptsächlich um den Nukleolus und deutlich schwächer im Zytoplasma, was sich bei SB1-V89I und SB1-R454Q leicht und bei SB1-R672Q gänzlich zugunsten des Zytoplasmas verschob.

In den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ließ sich kein transformierender Phänotyp der neu identifizierten SB1-Mutanten detektieren. Auch die alleinige Überexpression von SB1-WT zeigte in unserem verwendeten Zellmodell keinen Phänotyp. Es bleibt offen, ob das Verwenden eines anderen Zellmodells wie beispielsweise lentivirale Transduktion der verschiedenen SB1-Konstrukte in AML-Zelllinien möglicherweise eine Relevanz für die Detektion eines Phänotyps haben könnte. Zudem wurde in dem murinen Ba/F3-Zellmodell mit dem CIN85-Konstrukt der Ratte und humanen SB1-Konstrukten gearbeitet. CIN85 der Ratte zeichnet sich zwar durch eine hohe Homologie der Sequenzen und vor allem einer hohen Homologie innerhalb der SH3-Domänen zu humanem CIN85 aus, trotzdem könnte dies ein möglicher Störfaktor für die Interaktionskette FLT3-CBL-CIN85-SB1 darstellen. Des Weiteren könnten die Ergebnisse dieses Teilprojekts dafür sprechen, dass es sich bei den über Transkriptom-Sequenzierung neu detektierten SB1-Mutationen SB1-V89I, SB1-R454Q und SB1-R672Q um Passenger- und nicht um Driver-Mutationen handelt, welche keine funktionelle Konsequenz haben, oft während der Zellteilung auftreten und somit weder einen Wachstumsvorteil aufweisen noch zur Krebsentstehung beitragen [117]. SB1-Mutationen wurden inzwischen in einer Vielzahl von Krebserkrankungen verschiedenster Gewebe wie beispielsweise der Speiseröhre, der Schilddrüse, der Haut, der Niere, der Leber und der Lunge - um nur einige zu nennen – nachgewiesen. Ihre Rolle in der Krebsentstehung bleibt aktuell weiterhin unklar.

## 4.2 Der biologische Phänotyp von AKT1-E17K und FLT3-ITD im Vergleich

Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 hat eine entscheidende Rolle in der normalen als auch malignen Hämatopoese und ist als eines der am häufigsten mutierten Gene in der AML bekannt [16]. Vor allem die aktivierenden FLT3-ITD-Mutationen, welche zu 20 - 30 % in der AML detektiert werden, sind mit einer schlechteren Prognose, mit erniedrigtem Gesamtüberleben und erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert [16, 32-34]. Die aberrant aktivierte FLT3-Kinase stellt einen attraktiven Angriffspunkt von zielgerichteten Therapien dar, allerdings zeigt sich bei mehreren FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren in präklinischen und klinischen Studien in AML-Patienten entweder eingeschränkte oder nicht anhaltende Effektivität sowie Resistenzentwicklung gegenüber den TKIs [52-54]. Auch die Induktion von maligner Transformation durch konstitutive Aktivierung nachgeschalteter Signalwege von RTKs wie beispielsweise die der STAT5- oder PI3K/AKT-Signalübertragung spielt sowohl in der AML als auch in anderen humanen Tumorerkrankungen eine entscheidende Rolle [43, 44].

Der PI3K/AKT-Signalweg ist in viele biologische Prozesse wie beispielsweise der Regulation der Apoptose, des Zellzyklus, der Proliferation und der Differenzierung involviert. Eine Deregulation und aktivierende Mutationen in diesem Signalweg sind häufig in humanen Tumorerkrankungen vorhanden, womit dem AKT-Signalweg eine kritische Rolle in der Entstehung von malignen Grunderkrankungen zugesprochen wird [118-120]. Eine dieser aktivierenden Mutationen ist die der AKT1-Kinase AKT1-E17K [121]. Im Gegensatz zu der häufigen FLT3-ITD-Mutation wird diese in hämatologischen Erkrankungen nur selten detektiert [120, 122], der AKT-Signalweg allerdings liegt in mehr als der Hälfte der Blasten von AML-Patienten als konstitutiv aktiviert, d.h. phosphoryliert, vor [43, 123, 124]. Die Mutation AKT1-E17K weist in in-vivo-Mausmodellen einen leukämischen Phänotyp auf und konnte in der T-ALL sowie hauptsächlich in soliden Tumoren, beispielsweise des Harntrakts oder des Endometriums, detektiert werden [113, 114]. In hämatologischen Neoplasien wie zum Beispiel der Myelofibrose oder dem Multiplen Myelom wurden weitere AKT1-Mutationen wie AKT1-M306T oder AKT1-R376C nachgewiesen [125, 126]. In Zusammenschau dieser Daten könnten AKT-Mutationen oder die konstitutive Aktivierung des AKT-Signalwegs eine entscheidende Rolle nicht nur in der Induktion von maligner Transformation, sondern auch in der Pharmakoresistenz gegenüber zielgerichteter Therapie auch in der akuten myeloischen Leukämie spielen. Um dieses transformierende Potential nachzuweisen, wurde die AKT1-E17K-Mutante verwendet, welche konstitutiv aktiv ist.

AKT1-E17K ist eine Punktmutation in der Pleckstrin-Homologie-Domäne, die zu einer verstärkten Affinität zu den Membranlipiden PIP2 und PIP3 führt. Daraus resultiert sowohl die konstitutive Aktivierung der mutierten Kinase als auch eine veränderte, nämlich stärkere Lokalisation der AKT1-Mutante an der Plasmamembran [113, 121].

Eine Fragestellung dieses Teilprojekts der vorliegenden Doktorarbeit war, ob ein aktivierter AKT-Signalweg die Pharmakoresistenz gegenüber FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren in Patienten erklären kann. Hierzu wurde der biologische Phänotyp der häufig in der AML detektierten FLT3-ITD-Mutante mit dem der konstitutiv aktiven AKT1-E17K-Mutante im FLT3-WT-Hintergrund dargestellt, verglichen und mit spezifischen Inhibition wie dem FLT3-Inhibitor AC220 sowie einem PI3K/AKT-Inhibitor MK2206 behandelt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Western-Blot-Analyse der Signalweg-Aktivierung bestätigte die deutliche Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT5 aller mit FLT3-ITD (W51)-transduzierten Zelllinien sowohl im FL-stimulierten als auch im unstimulierten Zustand. In den anderen, nicht FLT3-ITD transduzierten Zelllinien konnte kein verstärktes pSTAT5-Signal festgestellt werden. Dies untermauert die große Bedeutung und Abhängigkeit des transformierenden Potentials der FLT3-ITD von dem STAT5-Signalweg. Die Aktivierung des STAT5-Signalwegs durch FLT3-ITD-Mutationen wurde bereits in vielen Studien beschrieben [107, 108, 112, 127, 128]. Zudem zeigte sich ebenfalls einzig in den mit FLT3-W51- und den unterschiedlichen AKT1-Konstrukten doppelt-transduzierten Zelllinien eine starke AKT-Aktivierung – auch in unstimuliertem Zustand. In AKT1-WT- und AKT1-E17K-einzeln-transduzierten als auch mit FLT3-WT-doppelt-transduzierten Zellen stellte sich nur ein schwaches pAKT-Signal dar. Die Anwesenheit von FLT3-ITD im Kontext einer Überexpression von AKT1 oder der aktivierenden Mutante AKT1-E17K scheint deren Phosphorylierung und damit Aktivierung sowohl mit als auch ohne FL-Stimulation deutlich zu verstärken. Die MAPK-Aktivierung war in der AKT1-E17K-Mutanten-Zelllinie weniger stark als in den AKT1-WT-exprimierenden Zelllinien, was möglicherweise auf einem sogenannten „Crosstalk“, also einer Interaktion, zwischen dem Raf-AKT-Signalweg beruhen könnte [129].

In Proliferationsversuchen wuchsen Ba/F3-Zellen, die mit der AKT1-E17K-Mutante transduziert waren, IL-3-unabhängig. Dies zeigt die deutliche Potenz von AKT in der Induktion einer malignen Transformation einer Zelle. Auch die Überexpression von AKT1-WT in FLT3-WT-koexprimierenden Zellen führte zu leicht erhöhten Proliferationsraten. Durch Kotransduktion der AKT1-E17K-Mutante mit dem FLT3-WT-Rezeptor zeigten die Ba/F3-Zellen eine weitere Annäherung des pro-proliferativen Phänotyps an den der FLT3-W51-Zellen, welche das deutlichste IL-3-unabhängige Wachstum aufwiesen.

Der FLT3-Inhibitor AC220 erzielte die vollständige Hemmung der Ba/F3-FLT3-W51- und Ba/F3-FLT3-W51/AKT1-WT-Zelllinien. Die Ba/F3-Zellen, kotransduziert mit FLT3-W51 und der AKT-Mutante, konnten durch die Zugabe des FLT3-Inhibitors nur auf das Proliferationsniveau

der mit AKT1-E17K-transduzierten Zellen gehemmt werden und wuchsen weiterhin IL-3-unabhängig. Dies könnte eine mögliche Erklärung für Resistenzen gegenüber FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren in AML-Patienten darstellen.

Der PI3K/AKT-Inhibitor MK2206 hingegen war in der Lage, den pro-proliferativen Phänotyp der Zelllinie FLT3-WT mit Koexpression der AKT1-E17K-Mutante als auch die Zelllinie mit der alleinigen Expression von AKT1-E17K vollständig zu inhibieren, was die alleinige Abhängigkeit dieses Phänotyps vom AKT-Signalweg demonstriert. Die FLT3-W51-exprimierenden Zellen dagegen wurden durch MK2206 nicht inhibiert, was die Unabhängigkeit dieses pro-proliferativen Phänotyps vom AKT-Signalweg erneut untermauert.

Auch in der Untersuchung der Apoptoseraten nach IL-3-Entzug zeigte die einzeln-transduzierte Zelllinie AKT1-E17K einen deutlichen Apoptoseschutz, wodurch das onkogene Potential erneut bekräftigt wurde. Unter IL-3-Zusatz deuteten sich für alle mit AKT1-WT bzw. AKT1-E17K-doppelt-transduzierten Zelllinien erhöhte Apoptoseraten an. Die angedeutete, allerdings nicht immer signifikant erniedrigte Apoptoserate von mit AKT1-WT-einzeln- oder doppelt-transduzierten Zelllinien unter IL-3-Zugabe im Vergleich zu den mit AKT1-E17K-einzeln- oder doppelt-transduzierten Zelllinien könnte auf die veränderte, nämlich stärkere Lokalisation der AKT1-Mutante an der Plasmamembran zurückzuführen sein [113, 121].

Die verschiedenen Untersuchungen zu Proliferation, Apoptose und Signalwegen verdeutlichen ein starkes transformierendes Potential des AKT-Signalwegs hier dargestellt anhand der AKT1-E17K-Mutante im FLT3-WT-Hintergrund. Das transformierende Potential scheint annähernd so potent wie das einer FLT3-ITD-Mutation. Der aktivierte AKT-Signalweg kooperiert mit FLT3-WT in der AML. Ba/F3-Zellen, welche mit der AKT1-E17K-Mutante und FLT3-WT kotransduziert wurden, wuchsen IL-3-unabhängig. Einzeln transduziert wiesen die AKT1-E17K-Zellen einen deutlichen Apoptoseschutz und ebenfalls IL-3-unabhängiges Wachstum auf, was die Rolle von AKT als Schlüsselprotein erneut verdeutlicht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Deregulation des AKT-Signalwegs durch eine konstitutive Aktivierung von AKT in FLT3-WT exprimierenden Zellen ein starkes transformierendes Potential vermittelt, allerdings schwächer als in FLT3-ITD exprimierenden Zellen vermittelt durch STAT5. Es wurde des Weiteren nachgewiesen, dass die Mutation AKT1-E17K zu einer partiellen Resistenz gegenüber FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren führt. Eine Kombination aus einem FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitor mit einem PI3K/AKT-Inhibitor könnte eine solche Resistenzbildung überkommen. Gezielte Inhibition von Signalproteinen des PI3K/AKT-Signalwegs könnte vielversprechend für therapeutische Ansätze sein. AKT bleibt aufgrund seiner vielfältigen Funktionen und aufgrund der Tatsache, dass der PI3K/AKT-Signalweg einer der am häufigsten aberrant regulierten Signalwege in humanen Tumoren ist, ein sehr interessantes Forschungsthema und möglicher therapeutischer Angriffspunkt [130].

### 4.3 Mutationen des epigenetischen Regulators TET2 in CMML-Patienten

2009 wurden erstmals TET2-Mutationen oder -Deletionen in hämatologischen Erkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS), den myeloproliferativen Neoplasien (MPN), der akuten myeloischen Leukämie (AML), der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) und der sekundären AML detektiert [79]. Es wurde gezeigt, dass TET2-Mutationen bereits in den primitiven CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen nachweisbar sind [79]. Die DNA-Methylierung hat entscheidende Konsequenzen in der Regulierung von Genexpression, die Methylierung von Cytosin in der Promotorregion eines Gens resultiert in seiner Inaktivierung (= "Silencing"). Der Nachweis der Konversion von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxy-Methylcytosin in der DNA über Oxidation durch TET2, was zu einer Demethylierung der DNA und somit zu einer Aktivierung führt, machte dessen entscheidende Rolle in der epigenetischen Regulation deutlich [82]. 2011 wurde des Weiteren demonstriert, dass die TET-Proteinfamilie, d.h. TET1, TET2 und TET3, auch in der Lage ist, die weitere Oxidierung von 5-hmC zu 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxylcytosin (5-caC) zu katalysieren [131, 132]. Inzwischen wurde TET2 in einer Reihe von hämatologischen Erkrankungen beschrieben und erlaubt, wie beispielsweise in der AML in einigen der durchgeführten klinischen Studien, eine prognostische Einordnung. TET2 hat damit eine wichtige Funktion in der normalen und malignen Hämatopoese [133].

Bereits 2010 konnte Ko *et al.* eine eingeschränkte katalytische Aktivität in Knochenmarksproben von TET2-mutierten Patienten nachweisen, welche im Vergleich zu gesunden Kontrollproben analog erniedrigte 5-hmC-Level in genomischer DNA aufwiesen [84]. Diese erniedrigten 5-hmC-Level in TET2-mutierten Patienten mit hämatologischen Erkrankungen wurden unmittelbar nach Entdeckung der enzymatischen Funktion von TET2 bzw. der TET-Familie durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt. Außerdem konnte in mutierten AML-Patienten eine erhöhte Promotor-Methylierung nachgewiesen werden [134].

Die genaue Rolle von TET2 in der Pathogenese von hämatologischen Erkrankungen ist allerdings noch nicht verstanden und die Literatur hierzu teilweise widersprüchlich. Generell scheint ein Funktionsverlust von TET2, beispielsweise durch eine TET2-Mutation, zu erniedrigten 5-hmC-Leveln und demzufolge zu Akkumulation von 5-mC zu führen, welches mit Genregression assoziiert ist [135].

In vivo-Studien weisen TET2 als einen kritischen Regulator sowohl der Differenzierung als auch der Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) aus. Bei TET2/TET2<sup>-</sup>-Mäusen konnte nach ca. 10 Wochen eine deutlich erhöhte Zellzahl im Knochenmark nachgewiesen werden. Zudem wurde eine erhöhte Anzahl von lineage-negativen (lin<sup>-</sup>), c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> (LSK) - Zellen als auch Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> (LK) - Zellen detektiert, was eine regressive

Funktion von TET2 in der Entwicklung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen impliziert [82]. Durch Figueroa *et al.* wurde zudem gezeigt, dass eine Reduktion der TET2-Expression zu einer Inhibition der normalen myeloischen Differenzierung führt [134]. Mehrere Mausmodelle zeigen, dass genetische Deletion von TET2 in zunehmender HSC-Selbsterneuerung, deutlicher Ausweitung des hämatopoetischen Stamm- und Progenitor-Kompartments sowie Entwicklung einer proliferativen hämatologischen Erkrankung ähnlich der CMML resultiert [136-138]. 2015 zeigte Rasmussen *et al.* in einem TET2-abhängigen leukämischen Mausmodell einen Hypermethylierungs-Phänotyp von Enhancern, welcher in AML-Patienten mit TET2-Mutation bestätigt wurde und für eine Induktion der Leukämogenese durch Verlust der TET2-Funktion spricht [139]. Das Mausmodell von Shih *et al.* zeigt, dass Mutationen in TET2 und FLT3 gemeinschaftlich die Propagation zur Induktion einer AML durch DNA-Hypermethylierung sowie Genexpressionsveränderungen bewirken [140].

Aufgrund der hohen TET2-Mutationsfrequenz von bis zu 50 % in Patienten mit chronisch myelomonozytärer Leukämie erfolgte in der vorliegenden Doktorarbeit aus dem peripheren Blut von 8 anonymisierten CMML-Patienten die Isolation der Monozytenpopulation. Mittels „*targeted amplicon sequencing*“ wurde anschließend die Amplifikation und Sequenzierung der Exone 4A, 4C, 5-11 des *TET2*-Gens aus der cDNA der 8 CMML-Patienten durchgeführt. Hierbei konnte in unserem CMML-Patientenkollektiv ebenfalls eine Mutationsfrequenz von 50 % detektiert werden. Diese Daten bestätigen somit die in der Literatur bisher bereits beschriebene Mutationsrate von TET2 in der CMML [81]. Die von uns in den Patienten detektierten Mutationen sind TET2 R1216X, TET2 Q1139fs, TET2 R1359C, TET2 S1775fs, TET2 I1873T und TET2 K680del. Die Hälfte der vier TET2-mutierten Patienten wiesen zwei TET2-Mutationen auf. Die gefundenen Mutationen sind alle bereits beschrieben und führen beispielsweise zu Deletion, frameshift oder Stopp der Translation. Weitere Investigationen aus dieser CD14-positiven Zellpopulation, aus der zudem RNA, cDNA und Proteinlysate hergestellt wurden, stehen aktuell noch aus.

Durch unsere Sequenzierung konnten keine neuen Mutationen detektiert werden, das Ergebnis untermauert jedoch die hohe Mutationsfrequenz und den Stellenwert von TET2 in myeloischen Erkrankungen. Durch Erhöhung der Patientenzahl wie beispielsweise durch Erweiterung des Patientenkollektivs hätten möglicherweise neue, noch nicht beschriebene Mutationen nachgewiesen werden können. Jedoch ist für keine andere Erkrankung neben der CMML in der Literatur eine so hohe Mutationsfrequenz von TET2 beschrieben. Die CMML ist mit 1-3 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100 000 Einwohner eine sehr seltene Erkrankung, was die Rekrutierung von Patientenproben erschwert und limitiert hat.

In diesem Teilprojekt der vorliegenden Doktorarbeit wurden außerdem Apoptose- und Proliferationsversuche der Ba/F3-hTET2-WT-Zellen durchgeführt. In dem Ba/F3-Zellmodell

war kein pro-proliferativer oder anti-apoptotischer Phänotyp festzustellen. Möglicherweise wäre ein Phänotyp nicht durch alleinige Überexpression von TET2-WT, sondern durch Klonierung und Transduktion von TET2-Mutanten zu detektieren gewesen. Auch die Verwendung eines anderen Zellmodells wie beispielsweise AML-Zelllinien und lentivirales Einbringen unterschiedlicher TET2-Konstrukte könnte von Nöten sein, um Effekte nachweisen zu können.

Umfassende Projekte beschäftigten sich seit der Erstbeschreibung von TET2 mit dessen Funktion, prognostischer Relevanz und klinischer Korrelation [81-89]. Trotz deutlichen Erkenntniszugewinns bleiben viele Fragen offen, die Wichtigkeit weiterführender Investigationen in TET2 wird durch unsere Ergebnisse untermauert.

## 5 Zusammenfassung

Die AML ist eine heterogene Erkrankung, bei der durch die Kombination aus Immunphänotypisierung, Zytogenetik sowie Molekulargenetik eine immer präzisere Diagnosestellung als auch Prognoseeinschätzung gelingt. Zytogenetische als auch molekulargenetische Aberrationen führen zu Fehlregulationen der Zelle, was in konstitutiver Aktivierung von onkogenen Signalwegen resultieren kann. Neue Sequenzierungsmethoden identifizierten innerhalb der letzten Jahre eine Vielzahl von neuen Mutationen in Genen, deren Rolle in der Initiation und Propagation der AML es einzuordnen gilt.

In dieser Doktorarbeit erfolgte die funktionelle Charakterisierung der im Jahr 2011 in der AML durch Transkriptom-Sequenzierung detektierten Punktmutationen in *SB1*. *SB1* (=Seta binding protein1) bindet an Seta (=CIN85), das als Multi-Adapter-Protein u.a. über CBL in die Internalisierung von RTKs sowie deren Degradation als auch in die Apoptose involviert ist. Um zu klären, ob die identifizierte *SB1*-Mutation einen Phänotyp induziert, haben wir diese funktionell charakterisiert. Nach Nachweis einer ubiquitären CIN85-Expression konnte in den mit den unterschiedlichen *SB1*-Konstrukten transduzierten Ba/F3-Zelllinien eine stabile Expression der Konstrukte nachgewiesen werden, sodass von der Vollständigkeit der Signalkaskade FLT3-CBL-CIN85-*SB1* ausgegangen werden konnte. Der FLT3-Rezeptor wurde durch die Koexpression von *SB1*-WT bzw. *SB1*-Mutanten weder in der Geschwindigkeit noch Rate signifikant abweichend internalisiert. Die Überexpression von *SB1*-WT oder Mutanten zeigte weder einen pro-proliferativer Phänotyp noch eine Apoptoseresistenz. In der Immunfärbung wurde *SB1*-WT vorwiegend um den Nukleolus exprimiert, was sich bei *SB1*-V89I bzw. -R454Q minimal und bei *SB1*-R672Q gänzlich zugunsten des Zytoplasmas verschob. Es konnte kein transformierender Phänotyp der neu identifizierten *SB1*-Mutanten detektiert werden, wofür das Verwenden von Konstrukten unterschiedlicher Spezies trotz hoher Sequenzhomologie einen möglichen Störfaktor der Interaktionskette FLT3-CBL-CIN85-*SB1* darstellen oder aber das Zellmodell an sich eine Rolle spielen könnte. Die neu detektierten *SB1*-Mutationen könnten außerdem lediglich Passenger-Mutationen darstellen.

Des Weiteren wurde der transformierende Phänotyp der prognostisch entscheidenden FLT3-ITD-Mutation mit der konstitutiv aktivierenden Mutation der AKT-Kinase AKT1-E17K verglichen. Der FLT3-Rezeptor ist eines der am häufigsten mutierten Gene der AML, die ITD-Mutationen stellen einen attraktiven, allerdings aktuell nur eingeschränkt wirksamen Angriffspunkt zielgerichteter Therapien dar. Auch die konstitutive Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie der PI3K/AKT-Signalweg spielt in der AML eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl AKT1-E17K als auch FLT3-ITD-exprimierende Ba/F3-Zellen ein deutlich erhöhtes IL-3-unabhängiges Wachstum aufwiesen



sowie nach IL-3-Entzug vor Apoptose geschützt waren. Eine deutlich stärkere AKT-Phosphorylierung war einzig in allen mit FLT3-ITD- und den unterschiedlichen AKT1-Konstrukten doppelt-transduzierten Zelllinien feststellbar. Die pharmakologische Inhibition verdeutlichte AKT als kritischen Mediator maligner Transformation. Durch AC220 ließen sich die Ba/F3-Zellen, kotransduziert mit FLT3-W51 und der AKT-Mutante, nur auf das Proliferationsniveau der mit AKT1-E17K-transduzierten Zellen hemmen. Der PI3K/AKT-Inhibitor MK2206 hingegen war in der Lage, die Zelllinie FLT3-WT mit Koexpression der AKT1-E17K-Mutante als auch mit der alleinigen Expression von AKT1-E17K vollständig zu inhibieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AKT-Aktivierung zu partieller Apoptoseresistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren in AML-Patienten führen könnte sowie der PI3K/AKT-Signalweg als einer der am häufigsten aberrant regulierten Signalwege in humanen Tumoren einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt darstellt.

Im dritten Teil der Doktorarbeit wurden CMML-Patientenproben nach Isolation der CD14-positiven Zellpopulation auf TET2-Mutationen untersucht. Der Nachweis der Konversion von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxy-Methylcytosin in der DNA über Oxidation durch TET2 verdeutlichte dessen entscheidende Rolle als epigenetischer Expressionsregulator. Die in der Literatur beschriebene Mutationsfrequenz von bis zu 50% mit Nachweis der bekannten TET2-Mutationen TET2 R1216X, TET2 Q1139fs, TET2 R1359C, TET2 S1775fs, TET2 I1873T und TET2 K680del konnte bestätigt werden. Die Ba/F3-hTET2-WT-Zellen zeigten keinen proliferativen oder anti-apoptotischen Phänotyp. Weitere Untersuchungen mit der hergestellten RNA, cDNA und Proteinlysaten stehen aktuell noch aus.

Individuelle und somit zielgerichtete Therapieansätze rücken zunehmend in den Fokus moderner Medizin. Die Identifikation und genaue Charakterisierung von möglichen Zielmolekülen innerhalb einer Erkrankung bleibt dabei unerlässlich und weiterhin eine große Herausforderung.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Berger DP, D.J., Engelhardt M, Engelhardt R, Henß H, Mertelsmann R, *Hämatologische Neoplasien in Das Rote Buch, Hämatologie und internistische Onkologie*. Ecomed Medizin, 5. Überarbeitete Auflage, 2014: p. 636-645.
2. Siegenthaler W, B.H., *Akute Leukämien in Klinische Pathophysiologie*. New York, Thieme Verlag, 9. Auflage, 2006: p. 463-65.
3. Löwenberg B, D.J., Burnett A., *Acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **341(14)**: p. 1051–62.
4. Zenhäusern R, Z.C., Solenthaler M, Fey MF, Tobler A, *Akute Leukämie beim Erwachsenen*. Curriculum, Inselspital Bern, Schweiz Med Forum, 2003. **Nr. 29/30**.
5. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. Blood, 2009. **114(5)**: p. 937-51.
6. D., G., *Impact of cytogenetics on clinical outcome in AML*. Acute Myelogenous Leukemia, Contemporary Hematology, 2007: p. 177-192.
7. Grimwade D, H.R., *Independent prognostic factors for AML outcome*. Hematology, 2009: p. 385-95.
8. Mrózek K, M.G., Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD., *Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?* Blood, 2007. **109(2)**: p. 431-448.
9. Plattner H, H.J., *Signale von außen an den Zellkern in Zellbiologie*. Thieme, 4. Auflage, 2010: p. 427-29.
10. T, H., *The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease*. The Croonian Lecture, 1997: p. 583-585.
11. Blume-Jensen, P.a.T.H., *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411(6835)**: p. 355-65.
12. Lemmon MA, S.J., *Cell signaling by receptor-tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141(7)**: p. 1117–1134.
13. Mathews W, J.C., Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR, *A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations*. Cell, 1991. **65**: p. 1143-1152.
14. Rosnet O, M.S., deLapeyriere O, Birnbaum D, *Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family*. Oncogene, 1991. **6**: p. 1641-1650.
15. Rosnet O, M.M., Marchetto S, Birnbaum D, *Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene*. Genomics, 1991. **9**: p. 380-385.
16. Gilliland DG, G.J., *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood, 2002. **100**: p. 1532-42.
17. Lyman, S., et al., *Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptorlike tyrosine kinase gene*. Oncogene, 1993. **8(4)**: p. 815-22.
18. Kikushige, Y., et al., *Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival*. J Immunol, 2008. **180(11)**: p. 7358-67.
19. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. Leukemia, 1996. **10(2)**: p. 238-48.

20. Hannum, C., et al., *Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs*. Nature, 1994. **368(6472)**: p. 643-8.
21. Toffalini, F., et al., *New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases*. Blood, 2010. **116(14)**: p. 2429-2437.
22. Meshinchi S, A.F., *Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia*. Clin Cancer Res, 2009. **15(13)**: p. 4263-69.
23. Wagener C, M.O., *Signalwege der Tumorentstehung in Molekulare Onkologie, Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. Thieme, 3.Auflage: p. 207-18.
24. Dosil M, W.S., Lemischka IR, *Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells*. Mol Cell Biol, 1993. **13(10)**: p. 6572-85.
25. Zhang S, B.H., *Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277(1)**: p. 195-9.
26. Marchetto S, F.E., Beslu N, et al., *SHC and SHIP phosphorylation and interaction in response to activation of the FLT3 receptor*. Leukemia, 1999. **13(9)**: p. 1374-82.
27. Lavagna-Sévenier C, M.S., Birnbaum D, Rosnet O, *FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates*. Leukemia, 1998. **12(3)**: p. 301-10.
28. Parcels BW, I.A., Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM, *FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia*. Stem Cells, 2006. **24(5)**: p. 1174-84.
29. Birg F, C.M., Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D, *Blood Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages*, 1992. **80(10)**: p. 2584-93.
30. Nakao M, Y.S., Iwai T, et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 1996. **10(12)**: p. 1911-1918.
31. Vempati, S., et al., *Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential*. Blood, 2007. **110(2)**: p. 686-94.
32. Thiede C, S.C., Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T, *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood 2002. **99(12)**: p. 4326-35.
33. Kiyoi H, T.M., Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T, *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product*. Leukemia, 1998. **12(9)**: p. 1333-37.
34. Kottaridis PD, G.R., Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC, *The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials*. Blood, 2001. **98(6)**: p. 1752-59.
35. Abu-Duhier, F., et al., *Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult*

- acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **113(4)**: p. 983-8.
36. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97(8)**: p. 2434-9.
  37. Mead AJ, L.D., Hills RK, Wheatley K, Burnett AK and Gale RE, *FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2007. **110(4)**: p. 1262-70.
  38. Reindl C, B.K., Vempati S, Schnittger S, Ellwart J, et al., *Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML*. Blood, 2006. **107**: p. 3700-07.
  39. Kindler T, B.F., Kasper S, Estey E, Giles F, et al., *Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2005. **105(1)**: p. 335-340.
  40. Schittenhelm MM, Y.K., Tyner JW, McGreevey L, Haley AD, et al., *FLT3 K663Q is a novel AML-associated oncogenic kinase: Determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248)*. Leukemia, 2006. **20**: p. 2008-14.
  41. Jiang J, P.J., Lee JC, Bo R, Stone RM, et al., *Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML*. Blood, 2004. **104(6)**: p. 1855-8.
  42. Spiekermann K, B.K., Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, et al., *A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. **100(9)**: p. 3423-5.
  43. Martelli AM, T.P., Evangelisti C, Chiarini F, Blalock WL, Billi AM, Manzoli L, McCubrey JA, Cocco L, *Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside*. Curr Med Chem, 2007. **14(19)**: p. 2009-23.
  44. Martelli AM, E.C., Chiarini F, McCubrey JA, *The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients*. Oncotarget, 2010. **1(2)**: p. 89-103.
  45. Martelli AM, N.M., Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C and Cocco L, *Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2006. **20(6)**: p. 911-28.
  46. Ni Y, S.-S.J., Young SH, Rozengurt E, *PKD1 Mediates Negative Feedback of PI3K/Akt Activation in Response to G Protein-Coupled Receptors*. PLoS One, 2013. **8(9)**: p. e73149.
  47. Engelman, J., Luo J, Cantley LC, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. **7(8)**: p. 606-19.
  48. Altman JA, S.A., Plataniias LC, *Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions*. Oncotarget, 2011. **2(6)**: p. 510-7.
  49. Coffey PJ, K.L., de Groot RP, *The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia*. Oncogene, 2000. **19(21)**: p. 2511-22.
  50. Bar-Natan M, N.E., Xiang M, Frank DA, *STAT signaling in the pathogenesis and treatment of myeloid malignancies*. JAKSTAT, 2012. **1(2)**: p. 55-64.
  51. Choudhary C, B.C., Schwable J, Tickenbrock L, Sargin B, Ueker A, Böhmer FD, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H., *Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD*. Blood, 2007. **110(1)**: p. 370-4.
  52. Pratz KW, L.M., *Bench to bedside targeting of FLT3 in acute leukemia*. Curr

- Drug Targets, 2010. **11(7)**: p. 781-9.
53. Kayser S, L.M., *FLT3 tyrosine kinase inhibitors in acute myeloid leukemia: clinical implications and limitations*. Leuk Lymphoma, 2014. **55(2)**: p. 243-55.
  54. Fischer, T., et al., *Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3*. J Clin Oncol, 2010. **28(28)**: p. 4339-45.
  55. Langdon, W.Y., et al., *v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86(4)**: p. 1168-72.
  56. Keane, M., et al., *Cloning and characterization of cbl-b: a SH3 binding protein with homology to the c-cbl proto-oncogene*. Oncogene, 1995. **10(12)**: p. 2367-77.
  57. Keane, M., et al., *cbl-3: a new mammalian cbl family protein*. Oncogene, 1999. **18(22)**: p. 3365-75.
  58. Rao, N., et al., *Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99(6)**: p. 3794-9.
  59. Swaminathan G, T.A., *The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling*. J Cell Physiol, 2006. **209(1)**: p. 21-43.
  60. Adélaïde, J., et al., *Gain of CBL-interacting protein, a possible alternative to CBL mutations in myeloid malignancies*. Leukemia, 2010. **24**: p. 1539–1541.
  61. Bonita, D., et al., *Phosphotyrosine binding domain-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor receptor alpha signaling cascade by transforming mutants of Cbl: implications for Cbl's function and oncogenicity*. Mol Cell Biol, 1997. **17(8)**: p. 4597-610.
  62. Joazeiro, C.A., et al., *The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase*. Science, 1999. **286(5438)**: p. 309-12.
  63. Zheng, N., et al., *Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases*. Cell, 2000: p. 533-9.
  64. Schmidt, M., Dikic, I, *The Cbl interactome and its functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6(12)**: p. 907-18.
  65. Blake, T., et al., *The sequences of the human and mouse c-cbl proto-oncogenes show v-cbl was generated by a large truncation encompassing a proline-rich domain and a leucine zipper-like motif*. Oncogene, 1991: p. 653-7.
  66. Bartkiewicz M, H.A., Baron R, *Leucine zipper-mediated homodimerization of the adaptor protein c-Cbl. A role in c-Cbl's tyrosine phosphorylation and its association with epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 1999. **274(43)**: p. 30887-95.
  67. Szymkiewicz I, K.K., Soubeyran P, Dinarina A, Lipkowitz S, Dikic I., *CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases*. J Biol Chem, 2000. **277(42)**: p. 39666–39672.
  68. Kurakin AV, W.S., Bredesen DE, *Atypical recognition consensus of CIN85/SETA/Ruk SH3 domains revealed by target-assisted iterative screening*. J Biol Chem, 2003. **278(36)**: p. 34102–34109.
  69. Kowanetz K, S.I., Haglund K, Kowanetz M, Husnjak K, Taylor JD, Soubeyran P, Engstrom U, Ladbury JE, Dikic I, *Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors*. J Biol Chem, 2003. **278(41)**: p. 39735–39746.
  70. Take H, W.S., Takeda K, Yu ZX, Iwata N, Kajigaya S, *Cloning and*

- characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **268(2)**: p. 321–328.
71. Petrelli, A., et al., *The endophilin–CIN85–Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met.* Nature, 2002. **416**: p. 187–190.
  72. Soubeyran P, K., K, Szymkiewicz, I, Langdon, WY, Dikic, I, *Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors.* Nature, 2002. **416**: p. 183–187.
  73. Dikic, I., *Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation.* Biochem Soc Trans, 2003. **31**: p. 1178-81.
  74. Oved S, Y.Y., *Signal transduction: molecular ticket to enter cells.* Nature, 2002. **416(6877)**: p. 133-6.
  75. Haglund K, S.M., Wong ES, Guy GR, Dikic I, *Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation.* EMBO Rep, 2005. **6(7)**: p. 635–641.
  76. Borinstein, S., et al., *SETA is a multifunctional adapter protein with three SH3 domains that binds Grb2, Cbl, and the novel SB1 proteins.* Cellular Signalling, 2000. **12(11-12)**: p. 769-79.
  77. Liu JP, L.N., Yuan HY, Guo Q, Lu H, Li YY, *Human homologue of SETA binding protein 1 interacts with cathepsin B and participates in TNF-Induced apoptosis in ovarian cancer cells.* Mol Cell Biochem, 2006. **292(1-2)**: p. 189-195.
  78. Greif, P., et al., *Identification of recurring tumor-specific somatic mutations in acute myeloid leukemia by transcriptome sequencing.* Leukemia, 2011. **25(5)**: p. 821-7.
  79. Delhommeau F, D.S., Della Valle V, et al, *Mutation in TET2 in myeloid cancers.* N Engl J Med, 2009. **360**: p. 2289-2301.
  80. Langemeijer SM, K.R., Berends M, et al, *Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes.* Nat Genet, 2009. **41**: p. 838- 842.
  81. Kosmider O, G.-B.V., Ciudad M, Racœur C, Jooste V, Vey N, et al., *TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia.* Haematologica, 2009. **94**: p. 1676–81.
  82. Ko M, B.H., An J, et al., *Ten - Eleven - Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108(35)**: p. 14566–14571.
  83. Law, J., Jacobsen, SE, *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.* Nat Rev Genet, 2010. **11(3)**: p. 204–220.
  84. Ko M, H.Y., Jankowska AM, et al., *Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.* Nature, 2010. **468**: p. 839-843.
  85. Chou WC, C.S., Liu CY, et al., *TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate - risk cytogenetics.* Blood, 2011. **118(14)**: p. 3803–3810.
  86. Metzeler KH, M.K., Radmacher MD, et al., *TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study.* J Clin Oncol, 2011. **29(10)**: p. 1373–1381.
  87. Nibourel O, K.O., Cheok M, et al., *Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission.* Blood, 2010. **116**: p. 1132-1135.
  88. Kosmider O, G.-B.V., Cheok M, et al., *TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs).* Blood, 2009. **114**: p. 3285-3291.
  89. Chan, S., et al., *Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic*

- stem cells in acute myeloid leukemia*. Int J Hematol, 2013. **98**: p. 648–657.
90. Vainchenker, W., et al., *New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms*. Blood, 2011. **118(7)**: p. 1723-35.
  91. Saito, H., et al., *Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line*. Blood, 1985. **66(6)**: p. 1233-40.
  92. Graham, F., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36(1)**: p. 59-74.
  93. Collins SJ, G.R., Gallagher, RE, *Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture*. Nature, 1977. **270(5635)**: p. 347-9.
  94. Asou, H., et al., *Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation*. Blood, 1991. **77(9)**: p. 2031-36.
  95. Koefler HP, G.D., *Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity*. Science, 1978. **200**: p. 1153-1154.
  96. Koefler, H., et al., *An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1)*. Blood, 1980. **56**: p. 265-273.
  97. Ziegler-Heitbrock, H., et al., *Establishment of an human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*. International journal of cancer, 1988. **41(3)**: p. 456-61.
  98. Matsuo, Y., et al., *Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)*. Leukemia, 1997. **11(9)**: p. 1469-77.
  99. Lange, B., et al., *Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines*. Blood, 1987. **70(1)**: p. 192-9.
  100. Kato, Y., et al., *Establishment of peroxidase positive, human monocytic leukemia cell line (NOMO-1) and its characteristics*. Acta Haematol, 1986. **49**: p. 277.
  101. Wang, C., et al., *Expression of a retinoic acid receptor gene in myeloid leukemia cells*. Leukemia, 1989. **3(4)**: p. 264-69.
  102. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. International journal of cancer, 1980. **26(2)**: p. 171-76.
  103. Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
  104. Towbin, H., et al., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76(9)**: p. 4350-4.
  105. Birnboim, H., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 243-55.
  106. Palacios, R., et al., *Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro*. Nature, 1984. **309(5964)**: p. 126-31.
  107. Hayakawa, F., et al., *Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines*. Oncogene, 2000. **19(5)**: p. 624-31. .
  108. Mizuki, M., et al., *Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways*. Blood, 2000. **96**: p. 3907-14.
  109. Gale, R., et al., *Relationship between FLT3 mutation status, biologic*

- characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia.* Blood, 2005. **106(12)**: p. 3768-76. .
110. Gale, R., et al., *No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials.* Blood, 2005. **106(10)**: p. 3658-65. .
  111. Gouilleux-Gruart, V., et al., *STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients.* Blood, 1996. **87(5)**: p. 1692-7.
  112. Spiekermann K, B.K., Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W, *Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells.* Clin Cancer Res, 2003. **9**: p. 2140-50.
  113. Landgraf KE, P.C., Falke JJ, *Molecular mechanism of an oncogenic mutation that alters membrane targeting: Glu17Lys modifies the PIP lipid specificity of the AKT1 PH domain.* Biochemistry, 2008. **47(47)**: p. 12260-9.
  114. Gutierrez, A., et al., *High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia.* Blood, 2009. **114(3)**: p. 647-50.
  115. Azuaje, F.J., et al., *Information encoded in a network of inflammation proteins predicts clinical outcome after myocardial infarction.* BMC Med Genomics, 2011. **14;4**: p. 59.
  116. Feng, L., et al., *SH3KBP1-binding protein 1 prevents epidermal growth factor receptor degradation by the interruption of c-Cbl-CIN85 complex.* Cell Biochem Funct., 2011. **29(7)**: p. 589-96.
  117. Stratton, M.R., et al., *The cancer genome.* Nature, 2009. **458**: p. 719-724.
  118. Ligresti, G., et al., *PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches.* Cell Cycle, 2009. **8(9)**: p. 1352-8.
  119. Samuels, Y., et al., *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.* Science, 2004. **304(5670)**: p. 554.
  120. Kim, M., et al., *Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias.* Br J Cancer, 2008. **98(9)**: p. 1533-5.
  121. Carpten, J., et al., *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.* Nature, 2007. **448(7152)**: p. 439-44.
  122. Luo, J., et al., *Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2003. **17(1)**: p. 1-8.
  123. Grandage, V., et al., *PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NFkappaB, Mapkinase and p53 pathways.* Leukemia, 2005. **19(4)**: p. 586-94.
  124. Min, Y., et al., *Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable.* Leukemia, 2003. **17(5)**: p. 995-7.
  125. Lundberg, P., et al., *Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms.* Blood, 2014. **123(14)**: p. 2220-8.
  126. Leich, E., et al., *Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules.* Blood Cancer, 2013. **3**: p. e102.
  127. Choudhary C, S.J., Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, et al, *AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations.* Blood, 2005. **106**: p. 265–273.
  128. Grundler R, M.C., Thiede C, Peschel C, Duyster J, *FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model.* Blood, 2005. **105**: p. 4792–4799.



129. Moelling, K., et al., *Regulation of Raf-Akt Cross-talk*. J Biol Chem, 2002. **277(34)**: p. 31099-106.
130. Yuan TL, C.L., *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. Oncogene, 2008. **27(41)**: p. 5497-510.
131. He, Y.F., et al., *Tet - mediated formation of 5 - carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA*. Science, 2001. **333(6047)**: p. 1303-7.
132. Ito, S., et al., *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. Science, 2011. **333(6047)**: p. 1300-3.
133. Tian, X., et al., *TET2 gene mutation is unfavorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients with NPM1+ and FLT3-ITD-mutations*. Int J Hematol, 2014. **100(1)**: p. 96-104.
134. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. Cancer Cell, 2010. **18(6)**: p. 553-567.
135. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324(5929)**: p. 930-5.
136. Quivoron, C., et al., *TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis*. Cancer Cell, 2011. **20(1)**: p. 25-38.
137. Moran-Crusio, K., et al., *Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation*. Cancer Cell, 2011. **20(1)**: p. 11-24.
138. Abdel-Wahab, O., et al., *Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **121(18)**: p. 3563-72.
139. Rasmussen, K.D., et al., *Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis*. Genes Dev, 2015. **29(9)**: p. 910-22.
140. Shih, A.H., et al., *Mutational Cooperativity Linked to Combinatorial Epigenetic Gain of Function in Acute Myeloid Leukemia*. Cancer Cell, 2015. **27(4)**: p. 502-15.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellen

Tabelle 1.1: Einteilung der akuten myeloischen Leukämie. ....	2
Tabelle 2.1.1.1: Inhibitoren.....	17
Tabelle 2.1.1.2: Enzyme.....	17
Tabelle 2.1.1.3: Zytokine .....	17
Tabelle 2.1.1.4: Chemikalien .....	18
Tabelle 2.1.2: Software.....	19
Tabelle 2.1.3: Kits.....	20
Tabelle 2.1.4: Laborausstattung .....	20
Tabelle 2.1.5: Zelllinien.....	21
Tabelle 2.1.6: Antikörper .....	22
Tabelle 2.1.7: Plasmide.....	23
Tabelle 2.1.8.1: Oligonukleotide zur Sequenzierung von hTET2 .....	24
Tabelle 2.1.8.2: Oligonukleotide hTET2 WT PCR.....	24
Tabelle 2.1.8.3: Oligonukleotide zur Sequenzierung von CIN85 (der Ratte) .....	24
Tabelle 2.1.8.4: Oligonukleotide zur Sequenzierung von hSB1 .....	24
Tabelle 2.1.8.5: Oligonukleotide zur Mutagenese von hSB1.....	25
Tabelle 2.1.9: Puffer, Medien, Lösungen .....	25

## 7.2 Abbildungen

Abbildung 1.1: Der Einfluss des Karyotyps auf das Überleben von jüngeren Erwachsenen mit AML.....	3
Abbildung 1.2.1: Einige in maligne hämatologische Erkrankungen involvierte Rezeptor-Tyrosinkinase-Familien und deren Aufbau.....	5
Abbildung 1.3.1: Das CBL-Interaktom .....	9
Abbildung 1.3.2: Die Rolle von CBL und CIN85 in der EGFR-Endozytose.....	10
Abbildung 1.3.3: Die Fähigkeit von SB1, jede der SH3-Domänen von CIN85 zu binden.....	12
Abbildung 1.4: Mechanismen der TET2-induzierten Genexpression.....	14
Abbildung 1.5: Überblick der untersuchten Aspekte der vorliegenden Doktorarbeit.....	16
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des SB1- und CBL-Proteins mit Mutationen .....	37
Abbildung 3.1.1: Endogene Expression von CIN85 in AML-Zelllinien .....	39
Abbildung 3.1.2.1: Expressionsnachweis der einzeln transduzierten Ba/F3-FLT3/CIN85/SB1-Zelllinien .....	40
Abbildung 3.1.2.2: Expressionsnachweis der doppelt-transduzierten Ba/F3-FLT3/CIN85/SB1-Zelllinien .....	40
Abbildung 3.1.3.1: Proliferation der doppelt-transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten mit Koexpression von FLT3-WT .....	41
Abbildung 3.1.3.2: Detailliertere Ansicht der Ab. 3.1.3.1 .....	42
Abbildung 3.1.3.3: Proliferation der einzeln transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten .....	43
Abbildung 3.1.3.4: Detailliertere Ansicht der Ab. 3.1.3.3 .....	43
Abbildung 3.1.4.1: Apoptose der einzeln transduzierten Ba/F3-Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten.....	44
Abbildung 3.1.4.2: Apoptose der doppelt-transduzierten Zelllinien CIN85-WT, SB1-WT und Mutanten mit Koexpression von FLT3-WT .....	45
Abbildung 3.1.5: Die Rate und Geschwindigkeit der Internalisierung des FLT3-Rezeptors ist in FLT3-WT- und in FLT3-WT/CIN85-WT bzw. SB1-WT bzw. Mutanten-exprimierenden Zellen gleich .....	46
Abbildung 3.1.6: Immunfluoreszenzbilder der Expression von SB1-WT und SB1-Mutanten in HEK 293-Zellen .....	47
Abbildung 3.2.1: Expressionsnachweis der Ba/F3-FLT3/AKT-Zelllinien.....	50
Abbildung 3.2.2.1: Proliferation und pharmakologische Inhibition mit AC220 der Ba/F3-FLT3/AKT-einzeln transduzierten Zelllinien.....	52
Abbildung 3.2.2.2: Proliferation und pharmakologische Inhibition mit AC220 der Ba/F3-FLT3/AKT-doppelt-transduzierten Zelllinien .....	53

Abbildung 3.2.2.3: Pharmakologische Inhibition mit MK2206 der Ba/F3-FLT3/AKT-Zelllinien .....	54
Abbildung 3.2.3: Apoptose der Ba/F3-FLT3/AKT-Zelllinien.....	55
Abbildung 3.2.4: Western-Blot-Analyse der durch FLT3-aktivierten Signalkaskaden STAT5, AKT und MAPK .....	57
Abbildung 3.3.1.1: Expressionskontrolle von hTET2-WT in Ba/F3-Zellen .....	59
Abbildung 3.3.1.2: Proliferation und Apoptose der Zelllinie Ba/F3 hTET2-WT .....	60
Abbildung 3.3.2: Isolation von Monozyten aus dem peripheren Blut der CMML-Patienten. FACS-Analyse der magnetischen Separation mit dem monoklonalen Antikörper CD14-FITC .....	61

## **8 Danksagung**

### **Mein herzlichster Dank geht an .....**

Prof. Dr. med. W. Hiddemann, der es mir ermöglichte, die Promotionsarbeit an der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern durchzuführen.

Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann, der mir die Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe bei einem tollen Klima, großartiger Betreuung als auch stetiger Unterstützung ermöglichte.

Dr. rer. nat. Harald Polzer, den ich als einen der zuverlässigsten Menschen kennenlernen durfte und der stets auf alle Fragen eine Antwort hatte.

Dr. med. Siegfried Völkl und Dr. med. Ole Maywald als auch dem Team des Leukämie-Diagnostik-Labors, die mich beim Rekrutieren der Patientenproben unterstützt haben.

Dr. med. Philipp Greif, Dr. med. Klaus Metzeler und Dr. med. Friederike Schneider für die Unterstützung bzgl. SB1 bzw. TET2.

Alle Laborkollegen und Mitarbeiter der KKG Leukämie Diana Schmid, Jutta Sturm, Anna Vetter, Daniel Reichart, Stephanie Fischbach-Scholz, Nadine Sandhöfer, Verena Weth, Sayantane Dutta, Hanna Janke, Belay Tizazu und Bianka Ksienzyk für die tolle Zeit, eure Unterstützung und Hilfe.

Meine Eltern und meine Oma, denen ich Alles zu verdanken habe.