

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

Die Bedeutung der Rezeptortyrosinkinasen KIT und VEGFR-2 in der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie

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

Vorgelegt von
Florian Christoph Johannes Faber

aus
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Hiddemann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. Igo - Kemenes
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. G. Meinhardt Prof. Dr. W. Krietsch
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Karsten Spiekermann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	13.01.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Organismen

2.1.1. Puffer, Lösungen und Gele

2.1.2. Antikörper

2.1.3. Zelllinien

2.2. Zellkultur- Isolations- und Quantifizierungsverfahren

2.2.1. Zellkultur

2.2.2. Proteinisolation

2.2.3. Immunpräzipitation

2.2.4. Proteinbestimmung nach Bradford

2.2.5. RNA Präparation

2.2.6. cDNA-Synthese

2.2.7. RNA Quantifizierung

2.3. Biologische assays

2.3.1. Zellwachstumskurven

2.3.2. In vitro Angiogenese Modell

2.3.2.1. Isolation und Kultivierung von "humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HLMEC)

2.3.2.2. Capillary sprouting formation assay als Modell für Angiogenese in vitro

2.4. Gentransferverfahren

2.4.1. DNA-Konstrukte und Vektoren

2.4.2. Transfektion von HEK-293 Zellen

2.4.3. Stabile Transfektion von Ba/F3 Zellen

2.5. Analyseverfahren

2.5.1. ELISA

2.5.2. PCR

2.5.3. Durchflusszytometrie

- 2.5.3.1. Durchflusszytometrische Analyse der KIT Expression
- 2.5.3.2. Aktive Caspase-3 Expression
- 2.5.3.3. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid Kernfärbung
- 2.5.3.4. Analyse von früh-und spätapoptotischen Zellen mit Hilfe von AnnexinV-PE und 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) Färbung
- 2.5.4. Western Blot
 - 2.5.4.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)
 - 2.5.4.2. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran
 - 2.5.4.3. Immundetektion
 - 2.5.4.4. Detektion mit dem ECL-Verfahren
 - 2.5.4.5. Stripping der Nitrozellulosemembran

3. Ergebnisse

- 3.1. Leukämische Zelllinien produzieren VEGF in vitro
- 3.2. SU5614 hemmt VEGF induzierte Endothelzellproliferation in vitro
- 3.3. Leukämischen Zelllinien zeigen eine heterogene Expression der VEGFR-1 und VEGFR-2 RNA
 - 3.4.1. SU5614 hemmt nicht das Zellwachstum von VEGFR-2 positiven Zelllinien
 - 3.4.2. SU5614 hemmt selektiv das Zellwachstum von KIT positiven Leukämiezelllinien
 - 3.4.3. STI571 jedoch nicht SU1498 hemmt die Zellproliferation von Kasumi-1 Zellen
 - 3.4.4. Zusammenfassung der RTK-Expressions-und Inhibitoraten
- 3.5. SU5614 induziert Apoptose und Zellzyklusarrest in KIT positiven Zelllinien
 - 3.5.1. Caspase-3 und Annexin-V / 7-Amino-Actinomycin Färbung von Kasumi-1 Zellen
 - 3.5.2. Analyse des hypodiploiden DNA Gehalts nach SU5614 Inkubation mittels Propidiumiodid-Kernfärbung
 - 3.5.3. Zellzyklusanalyse von M-07e Zellen nach Propidiumiodid-Kernfärbung und SU5614 Inkubation
- 3.6. Autokrine Produktion von SCF in Kasumi-1 Zellen
 - 3.7.1. SU5614 hemmt die Tyrosinphosphorylierung von KIT in Kasumi-1 und in transfizierten HEK-293 Zellen
 - 3.7.2. Die Tyrosinphosphorylierung von KIT D816V wird durch SU5614 nicht gehemmt

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

7.2. Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen

7.3. Danksagung

7.4. Curriculum vitae

1. Einleitung

Für die Entstehung einer leukämischen Erkrankung ist nach heutigen Erkenntnissen das Zusammenspiel von verschiedenen genetischen Alterationen verantwortlich. Diese pathogenetisch essentiellen Veränderungen bewirken in synergistischer Weise die Transformation von einer gesunden zu einer malignen Zelle. Eine wichtige Veränderung auf diesem Wege ist die erworbene Resistenz gegenüber physiologischen Signalwegen die normalerweise das unkontrollierte Wachstum einer Zelle hemmen. In diesem Zusammenhang ist die erworbene Unabhängigkeit von extrinsischen Wachstumssignalen und ein durch Fusionsgene vermitteltes unlimitedes Zellreplikationspotential zu nennen. Darüber hinaus spielt aber auch die erworbene Fähigkeit der Zellen dem programmierten Zelltod zu umgehen und die Induktion von Angiogenese und Zellmigration eine wichtige Rolle in der Entstehung vieler maligner hämatopoetischer Erkrankungen (Hanahan and Weinberg, 2000) (Zhao et al., 2002).

Ätiologisch werden verschiedene Ursachen für die Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (AML) diskutiert: Umweltfaktoren wie Benzol und radioaktive Strahlenbelastung, aber auch alkylierende Chemotherapeutika und Epiphyllotoxine wie z.B. Etoposid gelten als leukämogen (Cronkite, 1987) (Kato and Schull, 1982) (Moloney, 1987) (Curtis et al., 1990). Der Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung einer AML geht nicht zuletzt aus der Tatsache hervor, dass Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) zwanzigmal häufiger an einer AML erkranken als Personen der Normalbevölkerung (Kojima et al., 1990). Auch Krankheiten wie die Polycythaemia vera und das myelodysplastische Syndrom (MDS) prädisponieren ebenfalls für die Entwicklung einer AML (Raymakers et al., 1991).

Das klinische Bild der AML ist meistens von den Folgen der Knochenmarksinsuffizienz mit Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie, in seltenen Fällen auch durch Organinfiltration geprägt. Bei 80% der Patienten kann durch eine Induktionstherapie mit Cytosin-Arabinosid (Ara-C) und Anthrazyklinen eine komplette Remission erreicht werden, doch trotz nachfolgender zytostatischer Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Patienten etwa 40%, mit allogener Knochenmarkstransplantation bis zu 60% (Herold, 1999).

Es hat sich in den letzten Jahren sowohl in der Stammzellforschung als auch bei der Untersuchung von leukämischen Erkrankungen gezeigt, dass der die Zellen umgebende Raum, das so genannte Mikromilieu für das Wachstum von Stammzellen und Leukämiezellen eine entscheidende Rolle spielt. Wichtig für das Wachstum von soliden Tumoren wie auch von Leukämiezellen scheint die Versorgung der in Proliferation befindenden Zellen durch ein neu ausgebildetes Gefäßnetz zu sein. Das Wort Angiogenese oder Neoangiogenese, beschreibt diese Ausbildung und Formierung von neuen Blutgefäßen in physiologischen wie auch pathologischen Prozessen.

Seit den Arbeiten von Folkman et al. Anfang der siebziger Jahre ist bekannt, dass für die Entwicklung von soliden Tumoren diese Gefäßneubildung eine essentielle Rolle spielt (Folkman, 1995) (Folkman, 1990) (Zetter, 1998). Ohne Angiogenese tritt ab einem bestimmten Tumordurchmesser durch die entstehende Unterversorgung des proliferierenden Gewebes mit Blut, die Rate der neu entstehenden Tumorzellen und die Rate der absterbenden Tumorzellen in ein Gleichgewicht (Folkman, 1985) (Holmgren et al., 1995). Erst die Vaskularisierung erlaubt dem Tumorgewebe ohne Ischämie weiter zu wachsen und sich auszubreiten. Zusätzlich konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass von den Endothelzellen Wachstumsmediatoren abgegeben werden, welche das Tumorstadium fördern können (Nicosia, 1998) (Nicosia et al., 1994) (Rak et al., 2002) (Hamada et al., 2000). Dazu gehören unter anderem: Fibroblast Growth Factor (FGF), Angiogenin, Tumor Growth Factor ($TGF\alpha$, $TGF\beta$), Tumor Nekrose Factor ($TNF\alpha$), Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-derived endothelial-cell growth factor (PDGF), Platelet Growth Factor (PGF), Interleukin-8 (IL-8), Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Proliferin (Folkman and Klagsbrun, 1987).

Einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren ist der 1989 von Ferrara et al. klonierte Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Leung et al., 1989). Durch alternatives splicing entstehen aus dem auf Chromosom 6 liegenden Gen vier verschiedene Isoformen von VEGF-A: $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ and $VEGF_{206}$ (Ferrara and Davis-Smyth, 1997) (Ferrara and Keyt, 1997). Neben VEGF-A wurden noch weitere VEGF-Formen (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E) in den letzten Jahren charakterisiert (Karkkainen and Petrova, 2000). Die verschiedenen VEGF-A Isoformen binden mit unterschiedlich hoher Affinität an die beiden

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) Vaskular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) und Vaskular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2). Die Ligandenbindung erfolgt im Bereich der extrazellulären Ig-artigen Domäne II und III. Der intrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus der Juxtaglomerulären-transmembranösen (JM) Region sowie zwei Domänen mit Proteintyrosinkinaseaktivität (PTK) (Blume-Jensen and Hunter, 2001) (Robinson et al., 2000). Durch die VEGF Bindung an die extrazelluläre Domäne dimerisiert der Rezeptor wodurch die katalytische Aktivität erhöht wird und zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. In Folge davon werden verschiedene Signalwege aktiviert.

Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, resultiert aus dieser VEGF vermittelten Aktivierung des VEGFR-2 eine Ras und Proteinkinase C (PKC) Aktivierung wodurch Zellproliferation induziert wird. Zusätzlich entsteht durch die Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase Aktivierung ein starkes Survivalsignal in der Zelle (siehe auch Abb. 1) (Blume-Jensen and Hunter, 2001) (Karkkainen and Petrova, 2000).

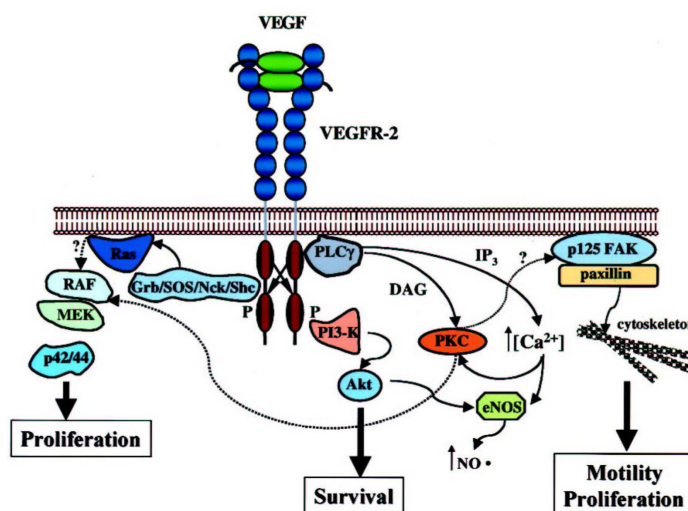


Abb. 1: VEGFR-2 Signaltransduktion. Die Bindung von VEGF führt zur Dimerisierung der immunglobulin-ähnlichen Bindungsdomäne wodurch intrazellulär verschiedene Proteinen phosphoryliert werden. Die Aktivierung des Ras und PKC Signalweges führt über RAF, MEK und p42/44 zu einer Zellproliferation. Die Aktivierung der PI3-Kinase zu einem „Survival-Signal“ in der Zelle (Karkkainen and Petrova, 2000).

In Studien von Fiedler et al. und Ratajczak et al. wurde gezeigt, dass AML Blasten von *de novo* an AML erkrankten Patienten zum Teil große Mengen VEGF-A produzieren und VEGFR-2 exprimieren. Der Zellüberstand von kultivierten AML Blasten enthielt signifikant mehr VEGF als die Vergleichskultur mit Knochenmarkszellen von gesunden freiwilligen Spendern (Fiedler et al., 1997) (Ratajczak et al., 1998). Zusätzlich zeigte Aguayo et al. einen

Zusammenhang zwischen der VEGF Konzentration in AML Blasten und im Blutplasma und dem Überleben dieser Patienten. Hohe VEGF Konzentrationen bedeuten dabei ein schlechteres Überleben für die an AML erkrankten Patienten (Aguayo et al., 1999) (Aguayo et al., 2002).

Darüber hinaus konnten, durch immunhistochemische Verfahren mehrere Arbeitsgruppen eine erhöhte Gefäßneubildungsrate im Knochenmark von AML Patienten im Vergleich zu Knochenmarksproben aus gesunden Kontrollgruppen nachweisen (Hussong et al., 2000) (Padro et al., 2000) (de Bont et al., 2001). Die Gefäßdichte korreliert ferner mit dem Ansprechen der Patienten auf eine Chemotherapie und nimmt nach Behandlung nur in der Patientengruppe deutlich ab, die eine Komplette Remission erreicht hat (Padro et al., 2000) (de Bont et al., 2001).

In normalen hämatopoetischen Stammzellen und in leukämischen Zelllinien bewirkt die Stimulation mit VEGF eine Induktion von MCL1, ein zur Bcl-2 Familie gehörendes antiapoptotisches Protein. Durch diesen Mechanismus werden die Zellen vor Apoptose geschützt. Dies zeigte sich in einer niedrigeren Apoptoserate nach Bestrahlung oder Zytostatika Exposition (Katoh et al., 1995) (Katoh et al., 1998).

Eine direkte Bedeutung der autokrinen VEGF Produktion für die Regulation von Zellwachstum und Zelltod in leukämischen Zellen wurde von Dias et al. in einer Studie gezeigt. Durch den Einsatz eines VEGFR-2 neutralisierenden Antikörpers konnte das Zellwachstum von VEGFR-2 positiven Zelllinien *in vitro* gehemmt werden (Dias et al., 2000).

In einem murinen Xenotransplantationsmodell konnte Dias et al. zusätzlich aufzeigen, dass durch die Unterbrechung einer autokrinen VEGF/VEGFR-2 Stimulationsschleife die transplantierten Leukämiezellen in ihrem Wachstum gehemmt werden. Um jedoch eine Ansiedelung, ein so genanntes engraftment der Leukämiezellen in dem Wirt zu verhindern, musste neben der autokrinen VEGF Produktion auch noch zusätzlich die murine parakrine VEGF Produktion blockiert werden (Dias et al., 2001).

Die funktionelle Bedeutung der VEGFR-2 Expression auf Leukämiezellen wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass für das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) *in vitro* eine Zugabe von VEGF nötig ist. Dafür spricht auch, daß Ziegler et al. eine VEGFR-2 Expression auf frühen HSC gefunden hat (Ziegler et al., 1999).

Die systematische Untersuchung und Charakterisierung der molekularen Pathogenese der AML ermöglicht ein molekular definiertes Krankheitsverständnis und die Entwicklung pathogenetisch basierter Therapieansätze. Dafür ist aber nicht nur die genaue Kenntnis der Signalwege und deren Effekte auf die Zellbiologie sondern auch gleichzeitig die Entwicklung und Charakterisierung neuer anti-proliferativer Substanzen nötig.

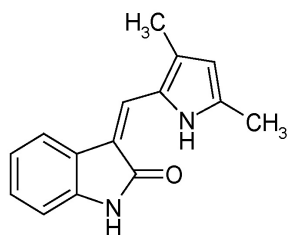
Die Blockierung von Rezeptortyrosinkinasen erscheint auf Grund der vorliegenden Daten als eine viel versprechende Option für eine an den molekularen Ursachen der Leukämie angreifende Therapiestrategie zu sein (Mesters et al., 2001) (Strawn et al., 1996). Dazu werden mehr und mehr Rezeptor-oder Liganden-neutralisierende Antikörper oder von unterschiedlichen Grundstoffen abstammende sogenannte „small molecule kinase catalytic domain inhibitors“ verwendet. Zu diesen kleinemolekularen Inhibitoren gehört unter anderem das erfolgreich bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) und gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eingesetzte STI571 (Imatinib mesylate, [Gleevec]). Dieses Molekül ist ein Proteintyrosinkinase (PTK)-Inhibitor der spezifisch BCR-ABL, KIT, c-ABL und den PDGF-Rezeptor hemmt (Sawyers, 2001) (Sawyers, 2002) (Tuveson et al., 2001) (Demetri, 2001) (Joensuu, 2002).

Ein VEGFR-2 spezifischer Rezeptortyrosinkinaseinhibitor (RTK-Inhibitor), der ebenfalls zur Gruppe der small molecule kinase catalytic domain inhibitors gehört ist SU5416 (siehe Abb. 2). SU5416 induziert *in vivo* (im murinen Model) eine Regression von subkutanen Tumoren durch die Inhibition von Angiogenese (Fong et al., 1999).

Für die in dieser Arbeit untersuchten Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch deren autokrin oder parakrin sezernierte Liganden und den daraus resultierenden Effekten auf Tumorzellwachstum und Zelltod wurde, der in seiner Wirkung noch nicht genauer charakterisierte PTK-Inhibitor SU5614 gewählt. Diese kleinemolekulare Struktur besteht ebenso wie SU5416 aus einem an mehreren Stellen substituierten Indolinonring. Der Unterschied besteht, wie in Abbildung 2 zu sehen ist, aus einer zusätzlichen Chlorid Substitution von SU5614 an der C-5 Position des Indolinonrings.

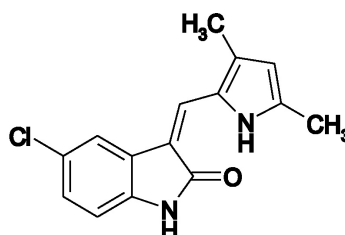
Die gemeinsame Wirkungsweise beider Inhibitoren besteht in einer kompetitiven Inhibition des katalytischen Zentrums des jeweiligen Rezeptors. Dabei bewirkt die strukturelle Ähnlichkeit der Inhibitoren mit dem Adenosin des Adenosintriphosphates (ATP), dass ein

kompetitiver ATP-Atagonismus entsteht der die Rezeptoraktivität hemmt (Al-Obeidi and Lam, 2000).



SU5416

3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylene]-2-indolin-2-one



SU5614

5-Chloro-3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylene]-2-indolin-2-one

Abb. 2: zeigt links das von SUGEN Inc. entwickelte SU5416. Rechts ist das in Position C-5 des Indolinonrings mit Chlorid substituierte SU5614 zu sehen. Beide Moleküle haben eine strukturelle Ähnlichkeit mit Adenosin.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass der PTK-Inhibitor SU5614 nicht nur den VEGFR-2 sondern auch sehr effektiv den stem cell factor receptor (KIT) hemmt. Die Rezeptortyrosinkinase KIT gehört zusammen mit PDGFR und FLT3 zur Gruppe der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen und besteht strukturell aus 5 Immunglobulin-artigen Domänen welche die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne darstellen. Diese Struktur ist über eine hydrophobe transmembranäre Domäne mit der eigentlichen intrazellulären Kinasedomäne verbunden (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass der stem cell factor receptor KIT in unterschiedlichen soliden Tumoren wie beispielsweise den so genannten gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), den Seminomen und den kleinzelligen Bronchialkarzinomen zum Teil exprimiert wird (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

Außerdem wird KIT auch physiologisch während der Ausreifung von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) exprimiert und spielt dabei, wie Mutationen auf den für KIT und SCF kodierenden SI Genlocus zeigen eine wichtige Rolle für die Bildung von Erythrozyten und Mastzellen (Zsebo et al., 1990). Daneben wird der stem cell factor receptor KIT nach Berichten von Sperling et al. auf 65% der aus Erwachsenen und Kindern isolierten AML Blasten exprimiert. Die KIT Expression schwankt zwischen 11.7% in der FAB Subpopulation M5 und 84.7% bzw. 87.5% in den FAB Subpopulationen M2 bzw. M6. Oft sind die KIT positiven Blasten immunphänotypisch CD34 positiv und tragen häufig zytogenetisch eine t(8;21) Translokation (Sperling et al., 1997). Das Genprodukt dieser t(8;21) Translokation besteht aus einem Rearrangement des AML1 Gens von dem Chromosom 21q22 und dem

so genannten ETO Gen von dem Chromosom 8q22. Dieses AML1-ETO Fusionsgen ist eine der häufigsten zytogenetischen Operationen der AML, besonders der Subpopulation M2 und bewirkt eine abnorme Zelldifferenzierung und ein so genanntes gesteigertes self-renewal in hämatopoetischen Zellen. Allerdings ist die Expression von AML1-ETO im Mausmodell allein nicht ausreichend um eine Leukämie zu verursachen (Downing, 1999) (Licht, 2001).

Die **Zielsetzung** der vorliegenden Arbeit war es die Bedeutung der Expression von Liganden wie VEGF und SCF sowie deren Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1, VEGFR-2 und stem cell factor receptor KIT für die Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie genauer zu untersuchen. Dazu wurden in einem ersten Schritt alle zur Verfügung stehenden Leukämiezelllinien mit Hilfe von RT-PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie auf dessen Liganden und Rezeptorstatus hin untersucht. Im Mittelpunkt stand der Nachweis und die Untersuchung einer so genannten autokrinen Stimulationsschleife zwischen den von AML Zellen sezernierten Liganden und den gleichzeitig exprimierten Rezeptortyrosinkinasen. Das Ziel war dabei die erfolgreiche Unterbrechung dieser Signalwege mit Induktion von Apoptose durch die Anwendung von small molecule kinase catalytic domain inhibitors wie STI571, SU5614 und SU1498.

Dazu wurden verschiedene Leukämiezelllinien unter anderem K562 mit dem Fusionsgen BCR-ABL und Kasumi-1 mit dem Fusionsgen AML1-ETO auf die Induktion von Apoptose in verschiedenen Apoptoseassays wie Caspase-3, Annexin-V / 7-Amino-Actinomycin und Propidiumiodid-Kernfärbung untersucht. Gleichzeitig wurden die in Proliferationsassays und Apoptoseassays gewonnenen Daten mit biochemischen Methoden im Western Blot bestätigt.

Darüberhinaus wurde der PTK-Inhibitor SU5614 in einem drei-dimensionalen, so genannten capillary sprouting formation assay unter Verwendung von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HLMVEC) auf seine anti-angiogenetischen Eigenschaften hin untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Organismen

2.1.1. Puffer, Lösungen, Gele und Inhibitoren

PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PAN, Deutschland)
2xBBS:	280mM NaCl; 1,5mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 50mM BES; H ₂ O (aqua bidest) ad 500ml (Chemikalien von Sigma, Deutschland)
5x TBE:	54g Tris; 27,5g Borsäure; 20ml 0,5M EDTA pH 8,0 auf 1Liter mit Milliporewasser auffüllen
2% Agarosegel:	2g Agarose, 100ml 1xTBE
1x BioRad-Dye:	BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, Deutschland) 1:5 mit H ₂ O verdünnen
RIPA-Puffer:	0,5M Tris-HCl pH 7,4; 2,5% Deoxycholat; 1,5M NaCl; 10mM EGTA pH 7; 1ml NP-40 (Fluka, Deutschland); 100mM PMSF; 100mM Orthovanadat (Na ₃ VO ₄); 1mg/ml Aprotinin; 1mg/ml Leupeptin; 0,1mg/ml Pepstatin; 100mM NaF; H ₂ O
HEPES-Puffer:	50mM HEPES pH 7.5; 150mM NaCl; 0.1% Triton X-100; 10% glycerol
4x HNTG-Puffer:	200mM HEPES pH 7,5; 600mM NaCl; 0,4% Triton X-100; 40% Glycerol
Lämmli-Puffer:	187,5mM Tris; 6% SDS; 30% Glyzerin; Bromphenolblau
Lämmli-DTT-Puffer:	2,5ml Lämmli-Puffer; 0,6g DTT (Dithiothreitol)
Tris-HCl pH 8,8:	1,5M Tris; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt
Tris-HCl pH 6,8:	1,5M Tris; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
4% Sammelgel:	6,1ml H ₂ O; 2,5ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8 ohne SDS; 1,3ml Acrylamid (Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30/0,8) (Roth, Deutschland); 100µl 10% SDS (Sigma, Deutschland); 50µl 10% APS (Ammoniumpersulfat; Sigma, Deutschland); 10µl TEMED (N',N',N',N'-Tetramethyldiamin; Sigma, Deutschland)

15% Trenngel:	2g Saccharose; 3,3ml H ₂ O; 11,3ml Tris pH8,8 ohne SDS; 15ml Acrylamid; 150µl 20% SDS; 100µl 10% APS und 3µl TEMED
12,5% Trenngel:	2g Saccharose; 2,9ml H ₂ O; 5,65ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 6,25ml Acrylamid; 75µl 20% SDS, 50µl 10% APS und 1,5µl TEMED
7,5% Trenngel:	5,4ml H ₂ O; 5,65ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 3,75ml Acrylamid; 75µl 20% SDS, 50µl 10% APS und 1,5µl TEMED
10x Elektr.-Puffer:	30g Tris; 144g Glycin; 800ml H ₂ O; 10g SDS (Natriumdodecylsulfat)
10x Transblot (1):	72,75g Tris; 36,63g Glycin; 0,475g SDS für 1xTransblot wurde noch 20% Methanol zugefügt
Ponceau-Rot:	1g Ponceau S in 500ml 2% Trichloressigsäure lösen
10x NET:	1,5M NaCl; 0,05M EDTA pH 8; 0,5M Tris pH 7,5; 0,5% Triton X-100
1x G-NET:	2,5g Gelatine wurden in 100ml 10x NET gelöst, aufgeköcht und mit H ₂ O. auf 1Liter aufgefüllt
10x TBS:	10mM Tris pH 8; 150mM NaCl
1x TBS-T:	100ml 10x TBS; 1% Tween 20; H ₂ O ad 1 Liter
3x TBS-T:	300ml 10x TBS; 15ml Tween 20; H ₂ O ad 1 Liter
Strippinglösung:	800ml 3xTBS-T; 20ml Mercapthoethanol; 200ml 10% SDS
HEK-293 Transfektion:	6µg DNA (Konzentration: 1µg/µl); 264µl sterilem H ₂ O; 30µl 2,5M CaCl ₂ ; 300µl 2x BBS
STI571	Imatinib mesylate, [Gleevec]; Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ
SU5614	CALBIOCHEM, A Brand of EMD Biosciences, Inc. San Diego, CA, USA
SU1498	CALBIOCHEM, A Brand of EMD Biosciences, Inc. San Diego, CA, USA

2.1.2. Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit für die Immundetektion der Zielproteine im Western Blot verwendet (Tabelle 1).

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
VEGF (147) sc-507	Kaninchen	Santa Cruz, CA, USA
Anti-Tubulin T3526	Kaninchen	Sigma, Germany
p-Tyr (PY99) sc-7020	Maus	Santa Cruz, CA, USA
c-Kit (H-300) sc-5535	Kaninchen	Santa Cruz, CA, USA
HRPO-GAM	Maus	Biorad, Hercules, CA, USA
HRPO-GAR	Kaninchen	Biorad, Hercules, CA, USA

Tabelle 1: zeigt die Charakteristik der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und deren Bezugsquellen

2.1.3. Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mit Ausnahme der humanen mikrovaskulären Lungenendothelzellen (HMLEC) von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) und von der ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) bezogen (Tabelle 2).

Zelllinien	Charakteristika, FAB	Medium	Zusätze
Kasumi -1	AML, M2, t(8;21), AML1- ETO	RPMI-1640	20% FCS
MM 6	akute monozytische Leukämie, M5	RPMI-1640	10% FCS
MM 1	akute monozytische Leukämie, M5	RPMI-1640	10% FCS
OCI-AML5	AML, M4	RPMI-1640	20% FCS
THP-1	akute monozytische Leukämie	RPMI-1640	10% FCS
NB4	akute promyelozytische, M3	RPMI-1640	10% FCS
HL-60	AML, M2	RPMI-1640	10% FCS
PLB-985	AML, M4	RPMI-1640	10% FCS
U937	histiozytisches Lymphom	RPMI-1640	10% FCS
K562	CML, BCR- ABL	RPMI-1640	20% FCS
HEK-293	embryonale Nierenzellen	DMEM	10% FCS
M-07e	akute megakaryoblastische, M7	RPMI-1640	10% FCS, 10ng/ml SCF
UT-7	AML, M7	alpha-MEM	10% FCS, 10ng/ml SCF
HLMEC	mikrovaskuläre Endothelzellen	MCDB 131	5% FCS, 5% HS, 5µl/ml ECGS-2
BA/F3	Maus pro B Zellen	RPMI-1640	10% FCS, 10ng/ml IL-3

Tabelle 2: zeigt die verwendeten Zelllinien, deren zytomorphologische Charakterisierung als auch die zur Kultivierung verwendeten Medien und die benötigten Zusätze

2.2. Zellkultur- Isolations- und Quantifizierungsverfahren

2.2.1. Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden gemäß dem Protokoll von Drexler et al. durchgeführt (Drexler et al., 1995). Hierfür wurden alle Zelllinien bei 5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank des Typs Cytoperm (Heraeus, Hannover) kultiviert.

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Gelaire-Sterilbank (Flow Lab. Meckenheim) durchgeführt. Medien und Zusätze wurden vor Verwendung im Wasserbad (Schütt, Göttingen) auf 37°C erwärmt. Mediumwechsel wurde bei allen Zelllinien im Abstand von 2-4 Tagen vorgenommen. Dabei wurden Suspensionszellen 6 Minuten bei 980 rpm (Rotanta 46RC, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium mit entsprechenden Zusätzen (siehe Tabelle 2) 1:2 bis 1:8 gesplittet. Die adhärent wachsenden Zellen wurden nach Absaugung des Kulturmediums für 5 bis 10 Minuten mit Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen und für 6 Minuten bei 980 rpm (Rotanta 46RC, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand verworfen, 1:4 bis 1:8 gesplittet und in frischem Medium mit entsprechenden Zusätzen (siehe Tabelle 2) resuspendiert. Die Bestimmung der Viabilität und Zellzahl erfolgte unter Anfärbung eines Zellaliquots mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer. Zum Einfrieren der Zellen wurden 1×10^7 Zellen in 1,5ml 90% FCS (Sigma, Deutschland) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deutschland) mit Hilfe eines Cryo 1°C Freezing Containers (Nalgene, Deutschland) bei -80°C eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert.

2.2.2. Proteinisolation

Nach Bestimmung der Zellzahl in 4°C kaltem PBS wurden 1×10^7 Zellen in 1ml modifizierten RIPA-Puffer aufgenommen und unter 4°C für 30 Minuten auf dem Drehrad inkubiert (Helenius et al., 1979).

Die Lysate wurden daraufhin bei 4°C mit 13500 rpm (Eppendorf 5415D, Hamburg, Deutschland) für 20 Minuten zentrifugiert; der Proteinüberstand in aliquots bei -20°C eingefroren.

2.2.3. Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation (IP) wurde 1 bis 10mg des gewünschten Proteinlysats zusammen mit dem in 30µl Protein-A/G-Sepharose (Pharmacia) vorinkubierten Antikörper für 4 Stunden bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Immunpräzipitats mit 1ml HEPES-Waschpuffer wurden die Proben in je 20µl Lämmli-DTT-Puffer aufgenommen und bei 95°C über 5 Minuten im Heizblock denaturiert. Nach der Abzentrifugation bei 13200 rpm (Eppendorf 5415D, Hamburg, Deutschland) wurde der so gewonnene Überstand auf das Gel aufgetragen.

2.2.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde gemäß dem Protokoll von Bradford et al. bestimmt und die Absorption von BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (Bradford, 1976). Dabei wurde zuvor die BioRad-Dye-Reagenz mit H₂O 1:5 verdünnt und filtriert. Es wurden jeweils 980 µl BioRad-Dye-Reagenz und 20 µl der mit H₂O 1:10 verdünnten Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messungen erfolgten in Halbmikroküvetten (Sarstedt, Deutschland). Das BioRad-Dye-Reagenz diente als Referenz. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Standardkurve aus der Absorption bestimmt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe aus einer 1mg/ml BSA-Stammlösung (Sigma, Deutschland) hergestellt. Für die Auswertung wurde die Absorption gegen die Proteinkonzentration [µg/ml] aufgetragen.

2.2.5. RNA Präparation

Die RNA Präparation von verschiedenen leukämischen Zelllinien wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 1×10^7 Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und in Lysispuffer aufgenommen. Die extrahierte RNA wurde nach den Isolationschritten in 50µl Rnase freiem Wasser resuspendiert.

2.2.6. cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden 20µl RNA nach 10 minütiger Denaturierung bei 70°C zu folgenden Syntheseansatz pipettiert: 8µl 5x Erststrangpuffer (Gibco Katalog-Nr.: 18064), 1,5µl Superscript RNase H Reverse Transcriptase (Gibco Katalog-Nr.: 18064), 4µl 100mM DTT (Gibco Katalog-Nr.: 18064), 3,5µl 100mM dNTP mix (Gibco Katalog-Nr.: 10297-018), 2µl (3µg/µl) Random Primer (Gibco Katalog-Nr.: 48190-011), 1µl rekombinanter Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega Katalog-Nr.: N2511). Nach der Inkubation des cDNA-Syntheseansatzes 70 Minuten bei 37°C und für 5 Minuten bei 95°C wurden die Proben umgehend bei -20°C eingefroren.

2.2.7. RNA Quantifizierung

Für die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurden 10µl der zu messenden Probe mit 490µl RNase freiem Wasser in einer Quarzglas Präzisionsküvette Suprasil (Hellma) gemischt und bei einer Wellenlänge von 260nm in einem Gene Quant II Photometer (Pharmacia Biotech) gemessen.

2.3. Biologische Assays

2.3.1. Zellwachstumskurven

Zur Bestimmung des Zellwachstums wurden nach Zugabe verschiedener Inhibitoren die Zellen mit PBS gewaschen und nach der Zellzahlbestimmung in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro 1ml in 24 well Platten (Sarstedt, Deutschland) mit dem entsprechendem Medium und Zusätzen ausgesät.

Nach Zugabe der jeweiligen Inhibitoren am Tag null wurden nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen Inkubation im Brutschrank Viabilität und Zellzahl nach Trypanblau Anfärbung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt und aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

2.3.2. *In vitro* Angiogenese Modell

2.3.2.1. *Isolation und Kultivierung von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HLMEC)*

Für die Gewinnung von HLMEC wurde peripheres Lungenparenchym (5-8mm subpleural) von pulmektomierten Lungen zur Isolation von Endothelzellen gewonnen.

Nach der mikroskopischen Entfernung von Bronchioli und Gefäßen wurde das in kaltem MCDB 131 Medium eingelegte Gewebe durch ein mit 20µm Porengröße ausgestattetem Nylonnetz (Brückmann GmbH, Mönchengladbach, Deutschland) aufgereinigt.

Das verbleibende Zellisolat wurde über Nacht in Suspensionskulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in MCDB 131 Medium mit folgenden Zusätzen: 5% Humanserum (HS, Sigma), 5% FCS (Sigma), 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 25µg/ml Amphotericin B, 4mM Glutamin und 90mg/ml Heparin (Sigma) mit Hilfe von 2U/ml Dispase bei 37°C und 5% CO₂ verdaut.

Das verdaute Gewebe wurde nach abzentrifugieren mit 800g über 10 Minuten in einem zweiten Aufreinigungsschritt durch einen 100µm messenden Nylonfilter gepresst und in mit Gelatine beschichteten Kulturflaschen mit folgenden Zusätzen: 5% Humanserum (Sigma), 5% FCS (Sigma), 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 4mM Glutamin, 90mg/ml Heparin (Sigma), 5µl/ml endothelial cell growth supplement-2 (ECGS-2; Promocell, Heidelberg, Germany), 0,1ng/ml rekombinanten humanen VEGF (R&D Systems, Minneapolis USA) und MCDB 131 Medium kultiviert.

Nur die schnell und adhärent wachsenden HLMEC wurden mit Hilfe magnetischer Dynabeads separiert. Diese Dynabeads waren mit humanen anti-CD31 Antikörper (DynaL Biotech, Hamburg, Deutschland) gekoppelt; wodurch das auf den humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen exprimierte PECAM-Adhäsionsmolekül (CD31) erkannt wurde.

2.3.2.2. *Capillary sprouting formation assay als Modell für Angiogenese in vitro*

Der capillary sprouting formation assay basiert auf dem dreidimensionalen kapillären Endothelzellwachstum in einer Fibrinmatrix (Nehls and Drenckhahn, 1995b) (Nehls and

Drenckhahn, 1995a). Das humane Fibrinogen, welches in diesem Versuch den Endothelzellen als Wachstumsmatrix dient, wurde mit einer 30% Ammoniumsulfat/PBS Lösung präzipitiert und auf eine Endkonzentration von 2mg/ml eingestellt. Um die im Fibrinogengemisch vorhandenen Proteasen zu blockieren wurden 200U/ml Aprotinin (Bayer, München, Deutschland) hinzugegeben.

Gleichzeitig wurden die für die HLMEC als Träger dienenden Cytodex-3 microcarrier beads (Cytodex-3 Beads, Sigma C-3275) gemäß den Herstellerangaben vorbereitet und zusammen mit 3×10^6 Zellen für 24 bis 48 Stunden bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert. Die mit HLMEC überwachsenen microcarrier wurden nun zusammen mit der Fibrinogen-Lösung welche die dem jeweiligen Experiment entsprechende Inhibitor- und Wachstumsfaktorkonzentration enthielt, in 24 well Platten pipettiert.

Für die Polymerisation des Fibrinogengemisches zu einem Gel, das den Endothelzellen letztlich als Matrix dient, wurde humanes Thrombin (Sigma, Deutschland) in einer Endkonzentration von 0,65U/ml hinzugegeben. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Ansätze mit 1ml MCDB 131 Medium und den entsprechenden Wachstumsfaktoren und Inhibitoren überschichtet und in 37°C bei 5% CO₂ für 18 bis 24 Stunden inkubiert.

Für die Auswertung wurden alle sprouts von je 50 microcarrier, die länger als 150µm waren, unter dem Mikroskop gezählt. Insgesamt wurden für die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung drei Ansätze je Experiment ausgewertet.

2.4.Gentransferverfahren

2.4.1. DNA-Konstrukte und Vektoren

Die cDNA für KIT Wildtyp und für die KIT D816V Mutation wurde freundlicherweise von L. Ashman (Adelaide, South Australia) zur Verfügung gestellt.

Beide cDNA Konstrukte wurden von dem pRUFNeo Vektorkonstrukt in den pcDNA6A/V5-His-blasticidin (Invitrogen, Groningen, Netherlands) Expressionsvektor umklontiert. Beide Expressionsvektorkonstrukte wurden durch *Hinf*I-restriction fragment gene length polymorphism (RFLP) und partieller Sequenzierung verifiziert.

2.4.2. Transfektion von HEK-293 Zellen

Zur CaCl₂-Transfektion wurden HEK-293 Zellen in einer Dichte von 2.2×10^5 Zellen pro ml in 10cm Kulturschalen ausgesät.

Der Transfektionsansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig auf die adhärenenten HEK-293 Zellen pipettiert. 24 Stunden nach der DNA Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit vorgewärmtem DMEM Medium. Durch die Cotransfektion der Zellen mit dem GFP Gen konnte nach 48 Stunden die Gentransfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Diese lag normalerweise über 80%. Nur die mit dem Zielgen transfizierten Zellen wurden für weitere Analysen verwendet.

2.4.3. Stabile Transfektion von Ba/F3 Zellen

Für die stabile Transfektion der murinen IL-3 abhängigen Ba/F3 Zelllinie mit TEL-ABL, BCR-ABL, TEL-JAK2 und einer Mock Kontrolle wurden diese nach der Transduktion durch IL-3 Entzug selektioniert und in einer Konzentration von $1,6 \times 10^5$ Zellen/ml Medium ausgesät. Nach 72 Stunden wurde unter Anfärbung eines Zellaliquots mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer die Viabilität der Zellen bestimmt (Spiekermann et al., 2002).

2.5. Analyseverfahren

2.5.1. ELISA

Für die Bestimmung der VEGF₁₆₅ Konzentration in Zellüberständen wurden nach einem Waschschrift mit PBS 1×10^6 Zellen pro 1ml in 24 well Platten für 24 Stunden in RPMI1640 Medium mit Penicillin/Streptomycin ohne FCS kultiviert. In dem gewonnenen Zellüberständen wurde mit Hilfe eines quantitativen Sandwich ELISAs (Human VEGF Immunoassay; Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, USA) die Konzentration von humanem VEGF₁₆₅ gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt.

2.5.2. PCR

Für die Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde jeweils 1 µg cDNA der zu untersuchenden Zelllinien mit Hilfe eines Perkin Elmer (GeneAmp 9700) PCR Thermocyclers, unter Verwendung von 0,5 U/µl Taq DNA Polymerase und des entsprechenden TakaRa PCR Kits (TakaRa Biomedicals, Shiga, Japan), amplifiziert. Sämtliche Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Für die Amplifikation der VEGF Splicevarianten VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆ wurde folgende Primersequenz: 5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3' und 5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGT-3' als Forward- und Reverseprimer verwendet (von Marschall et al., 2000). Das PCR Programm für die VEGF Amplifikation bestand initial aus einer 3-minütigen Denaturierung bei 94°C. Fortgeführt wurde die Reaktion über 40 Zyklen bei folgenden Reaktionsbedingungen: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 57°C und 1 Minute bei 72°C. Abgeschlossen wurde die Amplifikation durch einem einmaligen Zyklus von 72°C für 10 Minuten.

Für die Amplifikation der beiden VEGF-Rezeptoren wurden folgende Primersequenzen (VEGFR-1): 5'-ATTTGTGATTTTGGCCTTGC-3' und 5'-CAGGCTCATGAACTTGAAAGC-3' sowie (VEGFR-2): 5'-GTGACCAACATGGAGTCGTG-3' und 5'-CCAGAGATTCCATGCCA-CTT-3' als Forward- und Reverseprimer verwendet (Dias et al., 2000). Das PCR Programm für die Amplifikation von VEGFR-1 und VEGFR-2 bestand aus einer 3-minütigen Denaturierung bei 94°C. Darauf folgte ein Zyklus mit Temperaturen von 94°C für 1 Minute und von 60°C und 72°C für jeweils 45 Sekunden. Fortgeführt wurde die Reaktion über 35 Zyklen bei folgenden Reaktionsbedingungen: 1 Minute bei 94°C, 45 Sekunden bei 65°C und 2 Minuten bei 72°C. Abgeschlossen wurde die Amplifikation durch einem einmaligen Zyklus von 72°C für 7 Minuten.

Für die Amplifikation des membrangebundenen SCF sowie auch des sezernierten SCF Liganden wurde folgende Primersequenz: 5'-AATGCGTGGACTATCTGCCG-3' und 5'-CCT-GGGTTCTGGGCTCTTGA-3' als Forward- und Reverseprimer verwendet (Pietsch et al., 1992).

Das PCR Programm für die SCF Amplifikation bestand initial aus einer 3-minütigen Denaturierung bei 94°C. Fortgeführt wurde die Reaktion über 35 Zyklen bei folgenden Reaktionsbedingungen: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 61°C und 1 Minute bei 72°C. Abgeschlossen wurde die Amplifikation durch einem einmaligen Zyklus von 72°C für 10 Minuten.

Der Elogationsfaktor 1 α (EF1 α) wurde als sogenanntes "housekeeping-Gen" zur Kontrolle für gleiche Templatemengen verwendet. Als Forward- und Reversprimer wurden folgende Primersequenzen: 5'-CACACGGCTCACA-TTGCAT-3' und 5'-CACGAACAGCAAAGCGA-CC-3' eingesetzt. Das PCR Programm bestand aus einer 3-minütigen Denaturierung bei 94°C. Fortgeführt wurde die Reaktion über 30 Zyklen bei folgenden Reaktionsbedingungen: 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 53°C und 1 Minute bei 72°C. Abgeschlossen wurde die Amplifikation durch einem einmaligen Zyklus von 72°C für 7 Minuten.

Für die Amplifikation der cDNA des AML1-ETO Fusionsgens in Kasumi-1 Zellen wurden die Primer sowie die PCR Bedingungen aus der Arbeit von Miyamoto et al. übernommen (Miyamoto et al., 1997).

Bei jeder PCR wurde ein Aliquot des vollständigen PCR-Ansatzes aber ohne cDNA als interne Negativkontrolle amplifiziert. Zur Darstellung des PCR Produktes wurden 5 μ l jeder Amplifikationsreaktion durch ein 1,5 oder 2%iges Agarosegel aufgetrennt und mittels einer Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visualisiert. Die Größe der einzelnen Amplifikationsprodukte wurde durch Laufhöhenvergleiche mit der gleichzeitig aufgetragenen 100 bp DNA Leiter (Promega, Madison, USA) bestimmt.

2.5.3. Durchflusszytometrie

2.5.3.1. Durchflusszytometrische Analyse der KIT Expression

Die auf KIT (CD117) Expression zu analysierenden Zelllinien wurden mit kaltem PBS gewaschen und in einer Zelldichte von jeweils 5x10⁵ Zellen pro 1ml entweder mit 10 μ l PE-

konjugierten anti-CD117 Maus-Antikörper (clone 95C3, Immunotech, Coulter, Marseille, France) oder zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen mit 10µl IgG₁ PE-konjugierten Antikörper (Immunotech) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurden die Zellen wiederum mit kaltem PBS gewaschen und durchflusszytometrisch (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) auf KIT Expression untersucht. Die Auswertung der Rohdaten wurde mit Hilfe von WinMDI (Version 2.8, Joseph Trotter 1998) durchgeführt.

2.5.3.2. Aktive Caspase-3 Expression

Zum Nachweis der aktiven Caspase-3 Expression wurden 5×10^5 Zellen pro 2ml in 6-well Platten mit Inhibitor Konzentrationen von 0,1 bis 10µM für 12 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen mit kaltem PBS wurde die Zellmembran gemäß dem Herstellerprotokoll durch Zugabe von Cytifix/Cytoperm (PharMingen, Becton Dickinson, San Diego, USA), permeabilisiert. Nachfolgend wurden die permeabilisierten Zellen zweimal mit Waschlösung von Rückständen gereinigt und mit einem affinitätsgereinigten, PE-konjugierten, polyklonalen Kaninchen anti-aktive Caspase-3 Antikörper (PharMingen, Becton Dickinson, San Diego, USA) inkubiert.

Die Fluoreszenzstärke der einzelnen Proben wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers (Beckman Coulter, EPICS XL-MCL) analysiert und die Rohdaten mit WinMDI ausgewertet.

2.5.3.3. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid Kernfärbung

Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse und Bestimmung des hypodiploiden DNA Gehalts mittels Propidiumiodid-Kernfärbung wurde gemäß dem Protokoll von Buske et al. durchgeführt (Buske et al., 1997).

Der Puffer für die Kernanfärbung bestand aus: 0,1% NaCitrat, 0,1% Triton X-100, 20µg/ml Propidiumiodid bei ph von 8. Für die durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen wurden

5×10^5 Zellen pro 2ml Medium in 6-well Platten mit Inhibitor Konzentrationen von 0,1 bis $10 \mu\text{M}$ für 24 bis 72 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen in je 500 μl Lysispuffer resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Zellzyklusverteilung wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers von Becton Dickinson (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) analysiert und die Rohdaten mittels WinMDI und SigmaPlot (Version 6.0, SPSS Inc. 2000) ausgewertet.

2.5.3.4. Analyse von früh- und spätapoptotischen Zellen mit Hilfe von AnnexinV-PE und 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) Färbung

Für die Analyse von früh- und spätapoptotischen Zellen mit Hilfe der Annexin V-PE und 7-Amino-Actinomycin (7AAD) Färbung (Annexin V-PE Apoptose Detektions Kit; PharMingen, Becton Dickinson, San Diego, USA) wurden 5×10^5 Zellen pro 2ml Medium in 6-well Platten mit Inhibitor Konzentrationen von 0,1 bis $10 \mu\text{M}$ für 24 bis 72 Stunden inkubiert. Nach dem zweimaligen Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen in 100 μl Bindungspuffer gemäß den Herstellerprotokoll resuspendiert und zu jeder Probe je 5 μl Annexin V-PE Antikörper und 5 μl 7-AAD hinzugegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert und danach mit 400 μl Bindungspuffer aufgefüllt.

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers der Firma Becton Dickinson (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Die Rohdaten wurden mittels WinMDI und SigmaPlot ausgewertet.

2.5.4. Western Blot

2.5.4.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Im Western Blot wurden die durch die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die immobilisierten Proteine konnten nachfolgend mit Enzym-gekoppelten Antikörpern markiert und durch enzymvermittelte Chemilumineszenz visualisiert werden (Gershoni and Palade, 1983) (Towbin et al., 1979).

Zur Auftrennung von Proteinen wurden in der denaturierenden Gel-Elektrophorese polare Wechselwirkungen der Aminosäuren durch SDS abgeschwächt sowie Disulfidbindungen durch ein im Lämmli-Puffer enthaltenes DTT gespalten. Dadurch haben Sekundär- und Tertiärstrukturen keinen Einfluss mehr auf die Mobilität der nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine (Lämmli, 1970).

Für die Auftrennung der Proteine wurden 4%ige Sammelgele sowie 15%ige Polyacrylamid-Trenngele und 7,5-12,5%ige Polyacrylamid-Gradienten-Trenngele verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit H₂O überschichtet. Nach der Polymerisierung und dem Absaugen des H₂O wurde das ausgehärtete Trenngel mit dem 4%igen Sammelgel überschichtet und der benötigte Gelkamm eingesetzt.

Die zu analysierenden Proben mit einem Proteingehalt zwischen 15 und 100µg (Ganzzelllysate) wurden mit dem gleichen Volumen Lämmli-DTT-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock gekocht. Die denaturierten Proben wurden für 1 Minute bei 9000 rpm in einer Eppendorfcentrifuge (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert.

Als Referenz für die Proteingrößenbestimmung wurden zwei Molekulargewichtsmarker (*LMW*, low molecular weight calibration kit, Amersham, England; *HMW*, high molecular weight standards broad range, BioRad, Deutschland) gemäß den Angaben der Hersteller verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophorese-Kammer (Protean II xi; Biorad, Deutschland) mit 20 bis 32 mA (Netzgerät; Consort E333, Deutschland) bis die Lauffront des Bromphenolblau-Markers (im Lämmli-DTT-Puffer enthalten) in einem Zeitraum von 12 bis 18 Stunden das Ende des Trenngels erreicht hat.

2.5.4.2. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Der nach Towbin et al. modifizierte Western Blot basiert auf einem „semi-dry“ Elektrotransfer der Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Towbin et al., 1979).

Drei Blottingpapiere (Schleicher & Schüll, Deutschland) sowie eine Nitrozellulosemembran (Protran, Porengröße 0,45µm, Schleicher & Schüll, Deutschland) in der Größe des Trenngels wurden mit Transblotpuffer getränkt und übereinander auf die Anode der Semi-Dry-Elektrophorese Transferkammer (Trans-Blot SD, BioRad, Deutschland) gelegt. Auf die Nitrozellulosemembran wurde das Gel, sowie drei weitere mit Transblotpuffern getränkte Blottingpapiere und die Kathode platziert. Bei unbegrenzter Stromspannung und einer Stromstärke von 250 mA (Netzgerät; PowerPac 200, BioRad, Deutschland) erfolgte der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran in einem Zeitraum von 3 Stunden.

Anschließend wurden die Proteine auf der Membran durch Inkubation mit Ponceau S für eine Minute reversibel angefärbt und die Molekulargewichtsstandards auf der Nitrozellulosemembran markiert. Gleichzeitig konnte durch diese Färbung der gleiche Proteingehalt der einzelnen Bahnen bestätigt werden. Das Ponceau S wurde durch 20-minütiges Waschen in G-NET entfernt.

2.5.4.3. Immundetektion

Vor der Bindung eines Antikörpers auf der Nitrozellulosemembran wurde diese mit G-NET bei 4°C über 12 Stunden inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Für die Immundetektion wurden der Kaninchen oder der Maus Primärantikörper mit G-NET 1:800 bis 1:1000 verdünnt und die Membran für 12 Stunden auf einem Kippschüttler inkubiert (siehe Tabelle 3).

Antikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Waschlösung
VEGF (147)	1:800	HRPO-GAR	G-Net
Anti-Tubulin	1:1000	HRPO-GAR	G-Net
p-Tyr (PY99)	1:1000	HRPO-GAM	G-Net
c-Kit (H-300)	1:800	HRPO-GAR	G-Net
HRPO-GAM	1:25000		G-Net
HRPO-GAR	1:25000		G-Net

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Antikörper und deren Gebrauchsbedingungen.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten in 1xTBS-T gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit dem an HRPO (horse radish peroxidase) gekoppelten anti-Kaninchen- oder anti-Maus- Sekundärantikörper (Santa Cruz bzw. BioRad, Deutschland) bei Raumtemperatur (Tabelle 3). Anschließend wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten in 1xTBS-T und 5 Minuten in PBS gewaschen

2.5.4.4. Detektion mit dem ECL-Verfahren

Für die Detektion der Antikörper wurde ein ECL-Kit (enhanced chemiluminescence Kit, Amersham, England) verwendet, dessen Bestandteile Luminol und H_2O_2 zusammen mit der antikörpergebundenen Peroxidase eine Reaktionskette initiieren, die eine Chemilumineszenz zur Folge hat (Durrant, 1994). Die beiden ECL-Komponenten wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Membran darin für eine Minute inkubiert. Mit der in Klarsichtfolie verpackten Membran wurde nun ein Röntgenfilm (HyperfilmTMECLTM, Amersham, England) in einer Filmkassette (HypercassetteTM, Amersham, England) bis zu einer Stunde exponiert und danach in einem automatischen Entwicklungsgerät des Typs Gevamic 60 (Agfa Gevaert, Leverkusen) entwickelt.

2.5.4.5. Stripping der Nitrozellulosemembran

Für den Nachweis gleicher Proteinmengen in einzelnen Bahnen musste die mit Antikörpern besetzte Membran von diesen gereinigt und mit einem anti-Tubulin Antikörper ein zweites Mal detektiert werden. Hierzu wird die Nitrozellulosemembran zwei Mal für 15 Minuten mit 65°C heißer Strippinglösung inkubiert und danach für 30 Minuten mit 3xTBST gewaschen. Hiernach folgt die zweite Immundetektion wie in 2.5.4.3. beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Leukämische Zelllinien produzieren VEGF *in vitro*

Zum Nachweis einer VEGF Produktion in den zehn verschiedenen leukämischen Zelllinien die für diese Arbeit ausgewählt wurden, wurde in einem ersten Schritt die VEGF₁₆₅ Konzentration im Zellüberstand mit Hilfe eines Sandwich ELISA bestimmt. Dabei zeigten alle zehn Zelllinien bis auf OCI-AML5 eine VEGF₁₆₅ Sekretion im untersuchten Zellüberstand. Die Proteinkonzentrationen variierten von $1516,6 \pm 0,0$ pg/ml (MW \pm SD) in U937 Zellen über $838,1 \pm 44,8$ pg/ml in den Kasumi-1 Zellen bis $137,7 \pm 54,0$ pg/ml Zellüberstand in der PLB-985 Zelllinie (Abbildung 3 A).

Aus den Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen ist bekannt, dass gesunde hämatopoetische Zellen weniger VEGF produzieren als leukämische Zellen. In den Untersuchungen von Fiedler et al. zeigten die Knochenmarkszellen von 9 gesunden Probanden eine VEGF Konzentration zwischen 0pg/ml und 136pg/ml. Die durchschnittliche VEGF Konzentration lag bei 46pg/ml (Fiedler et al., 1997). Vergleicht man nun diese von Fiedler et al. publizierten VEGF ELISA Daten mit den in dieser Arbeit untersuchten AML Zellen so zeigt sich, dass 9 von 10 der hier untersuchten leukämischen Zelllinien mehr VEGF produzieren als die gesunden Knochenmarkszellen.

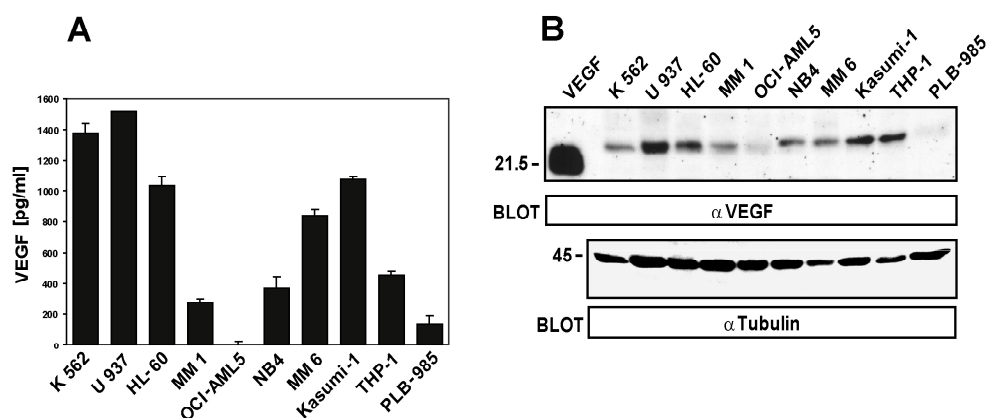


Abb. 3 A zeigt Mittelwert und Standardabweichung der VEGF ELISA Messungen aus den gesammelten Zellüberständen. In **Abb. 3 B** ist die Western Blot Detektion von VEGF Protein aus RIPA-lysierten Zelllinien abgebildet. Um die gleiche Proteinbeladungsmenge der einzelnen Bahnen des Blots zu zeigen, wurde die Membran mit einem Antikörper gegen das Strukturprotein alpha-Tubulin ein zweites Mal inkubiert und detektiert.

Zur Bestätigung dieser zum Teil sehr hohen VEGF Konzentration im Zellüberstand der mit Hilfe eines Sandwich ELISAs untersuchten leukämischen Zelllinien wurde in einem zweiten

Schritt mittels eines Western Blots die intrazelluläre VEGF Proteinexpression gemessen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung zwischen der VEGF Konzentration im Überstand der Zellkultur und den intrazellulären VEGF Mengen. Eine hohe zelluläre VEGF Expression war bei U937, HL-60, Kasumi-1 und THP-1 Zellen nachweisbar. Im Vergleich dazu zeigten die OCI-AML5 und PLB-985 Zelllinien eine sehr schwache VEGF Expression (Abbildung 3 B).

Um die im Western Blot gewonnenen Daten vergleichen zu können, muss eine gleiche Proteinbeladungsmenge der einzelnen Bahnen (Lanes) gewährleistet sein. Zu dieser Kontrolle wurde der Blot von dem alten Antikörper gereinigt und mit einem neuen Antikörper, der das in allen Zellen gleichstark exprimierte Strukturprotein alpha-Tubulin erkennt, ein zweites Mal inkubiert und detektiert (Abb. 3 B).

3.2. SU5614 hemmt die VEGF induzierte Endothelzellproliferation *in vitro*

Die ELISA und Western Blot Daten in Abbildung 3 zeigen, dass der Großteil aller untersuchten Zelllinien zum Teil beträchtliche Mengen von VEGF exprimieren und sezernieren. Möglicherweise trägt diese VEGF Sekretion der Leukämiezellen zu der erhöhten Endothelzellproliferation im Knochenmark *in vivo* bei.

Zur Untersuchung des Einflusses von VEGF und SU5614 auf die Wachstumsaktivität von Endothelzellen wurden, in einer Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung in Bad Nauheim humane mikrovaskuläre endotheliale Zellen aus Lungenresektaten isoliert und in einem Fibringel zur Durchführung eines so genannten dreidimensionalen Angiogeneseassays eingebettet.

Für die Auswertung wurden alle gebildeten sprouts (mikrovaskuläre Gefäßverästelungen) von je 50 microcarrier die länger als 150µm waren unter dem Mikroskop gezählt. Insgesamt wurden für die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung drei Ansätze je Experiment ausgewertet. Der Versuch zeigte, dass VEGF auf die humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HLMEC) eine starke proliferative Wirkung hat und dass der PTK-Inhibitor SU5614 dieses durch VEGF ausgelöste Wachstumssignal blockieren kann.

Wie in dem Balkendiagramm in Abbildung 4 A zu sehen, nimmt nach Endothelzellstimulation durch VEGF mit ansteigender SU5614 Konzentration die Anzahl der von den microcarrier auswachsenden sprouts signifikant ab. Ein gleicher Effekt ist durch den Einsatz eines VEGF neutralisierenden Antikörpers (Abb. 4 B-3) als Positivkontrolle zu beobachten. Bei VEGF Stimulation ohne gleichzeitige SU5614 Inkubation ist eine starke Endothelzellproliferation in Form von auswachsenden mikrovaskulären Gefäßverästelungen (sprouts) in Abbildung 4 B-2 zu sehen. Demgegenüber erkennt man in Abbildung 4 B-4 bei Inkubation der Ansätze mit 1 μ M SU5614 eine deutliche Reduktion der sprouts bildenden Endothelzellproliferation.

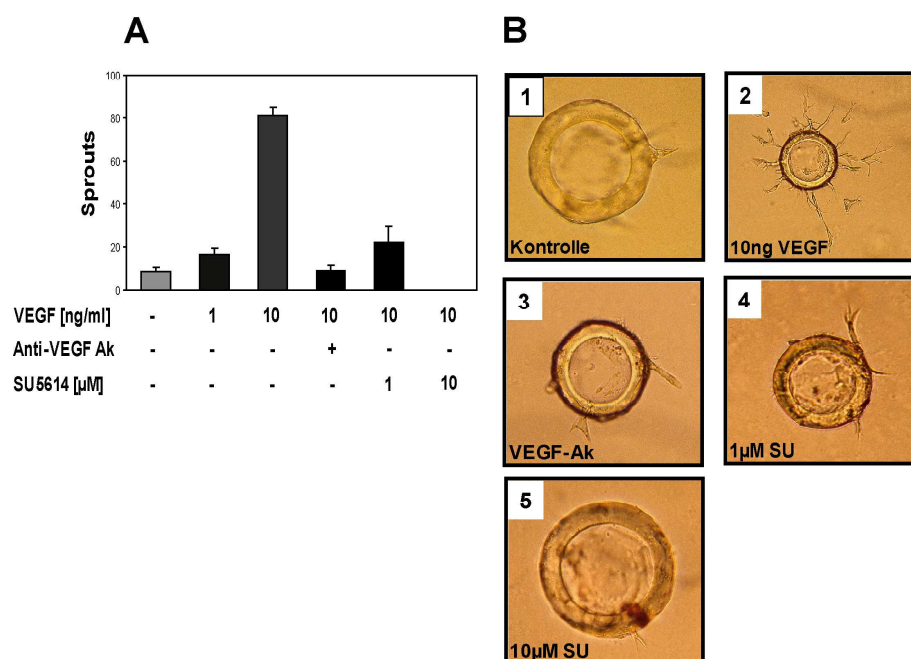


Abb. 4 A zeigt in dem Balkendiagramm Mittelwert und Standardabweichungen der im Mikroskop gezählten sprouts von jeweils drei Versuchen. Es wurden nur die sprouts gewertet, die länger wie der Durchmesser des microcarrier (150 μ m) waren. In **Abb. 4 B** sind exemplarisch 5 durch das Mikroskop fotografierte repräsentative Bilder von den einzelnen Versuchen gezeigt. Die flächige Kreisform im Zentrum eines jeden Bildes stellt den microcarrier dar.

3.3. Leukämische Zelllinien zeigen eine heterogene Expression der VEGFR-1 und VEGFR-2 RNA

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die starke VEGF Produktion der einzelnen Leukämiezelllinien auch möglicherweise einen autokrinen Wachstumseffekt hat, wurden die Zellen auf eine VEGFR-1 und VEGFR-2 Expression hin untersucht. Die Bestimmung dieser

beiden Rezeptoren wurde wegen dem zum Teil sehr niedrigen Expressionslevel von Rezeptortyrosinkinasen mittels RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde bei sechs von zehn der untersuchten Leukämiezelllinien eine Bande von 554bp im Agarosegel nachgewiesen. Diese Bande entspricht der Größe des VEGFR-1 Transkripts. Die VEGFR-2 mRNA Expression, mit einer spezifischen Bande von 629bp war im Vergleich dazu auf die K562 und THP-1 Zelllinie beschränkt (Abb. 5). Zur Kontrolle der gleichen cDNA Integrität wurde zusätzlich die cDNA des Elongationsfaktors EF1 α amplifiziert.

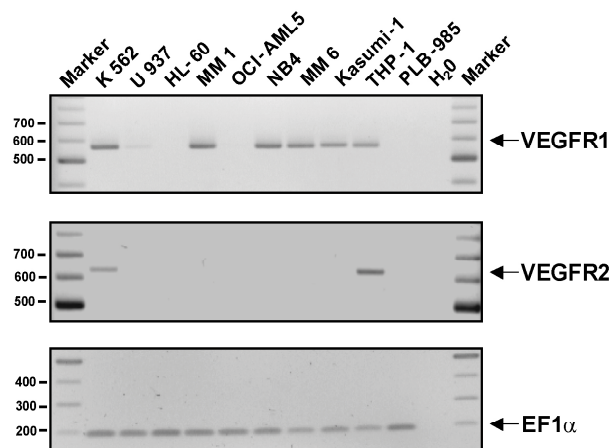


Abb. 5: zeigt die Ergebnisse der VEGFR-1 und VEGFR-2 RT-PCR aufgetragen auf einem 2%igen Agarosegel. Für den Nachweis von VEGFR-1 wurde eine Bande von 554 bp amplifiziert. Die spezifische Bande von VEGFR-2 liegt bei 629bp. Zur Kontrolle der gleichen cDNA Integrität wurde als housekeeping Gen die cDNA des EF1 α amplifiziert.

3.4.1. SU5614 hemmt nicht das Zellwachstum von VEGFR-2 positiven Zelllinien

Die Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 und die gleichzeitige Sekretion des Liganden VEGF ermöglicht sowohl eine autokrine Stimulationsschleife zwischen VEGF und VEGF-Rezeptoren als auch eine parakrine Wachstumsstimulation der VEGFR tragenden Zellen. Um die Bedeutung dieser autokrinen oder parakrinen VEGF Stimulation für das Zellwachstum der leukämischen Zelllinien zu untersuchen, wurde die Signaltransduktion des VEGFR-2 mit Hilfe des RTK-Inhibitors SU5614 blockiert. Die hohe Effektivität dieses Inhibitors gegenüber der VEGF induzierten Zellproliferation wurde bereits in Kapitel 3.2 ausführlich dargestellt. Die Hemmung des VEGFR-2 Signalweges geschah in der

Vorstellung, dass durch die Inhibition von VEGFR-2 ein, durch VEGF Aktivierung dieses Rezeptors entstandener pro-proliferativer Effekt aufgehoben werden kann.

Dazu wurden die zehn verschiedenen Leukämiezelllinien aus den vorhergegangenen Versuchen in einer Dichte von 10^5 Zellen pro ml Medium mit SU5614 Konzentrationen von 0,1 μ M bis 10 μ M über 72 Stunden inkubiert. Nach jeweils 24 Stunden wurde mittels Trypanblau Färbung die Zahl an viablen Zellen bestimmt. Zum besseren Vergleich der einzelnen Zelllinien und deren Reaktion auf SU5614 Inkubation wurde die Proliferationsaktivität bei 1 μ M und 0 μ M SU5614 nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden zur Standardisierung herangezogen. Die Auswertung dieser Daten erfolgte nun nach folgendem Schema: +++, <10%; ++, 10-40%; +, 41-70%; -, >70% und ist in Tabelle 4 als Übersichtsbild dargestellt.

Zelllinien	VEGFR-2 Expression	SU5614 Sensitivität [1 μ M]
Kasumi-1	-	+++
MM 6	-	+
MM 1	-	+
OCI-AML5	-	-
THP-1	+	-
NB4	-	-
HL-60	-	-
PLB-985	-	-
U937	-	-
K562	+	-

Tabelle 4: zeigt die VEGFR-2 Expression: -, keine Expression; +, Expression. Die SU5614 Sensitivität wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden durch vergleichen der Proliferationsaktivität bei 1 μ M und 0 μ M nach folgendem Schema standardisiert: +++, <10%; ++, 10-40%; +, 41-70%; -, >70%.

Erstaunlicherweise zeigten von den zehn auf SU5614 Sensitivität untersuchten Zelllinien die VEGFR-2 positiven Vertreter wie THP-1 und K562 keinerlei Beeinflussbarkeit in der Proliferationsrate nach der SU5614 Inkubation. Interessanterweise konnte jedoch, wie in Tabelle 4 und Abbildung 6 A zu sehen ist, durch den Einsatz von SU5614 eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung von Kasumi-1 Zellen sowie in geringerer Ausprägung von MM1 und MM6 Zellen erreicht werden. Nach 72 Stunden wurde bei der Kasumi-1 Zelllinie, ab einer SU5614 Konzentration von 1 μ M nur noch eine Zellviabilität von

7% ($0,2 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$) gemessen. Bei einer im selben Experiment untersuchten Inhibitorkonzentration von $10 \mu\text{M}$ SU5614 lag die Zellviabilität der Kasumi-1 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ($4,1 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$) sogar unter 1% (Abbildung 6 A). Diese Proliferationsversuche mit dem PTK-Inhibitor SU5614 zeigten somit, dass die Blockierung des VEGFR-2 Signalweges zumindest in den hier untersuchten Leukämiezelllinien keinen Einfluss auf dessen Proliferationsaktivität hat. Weder in der K562 noch in der THP-1 Zelllinie, welche sowohl VEGFR-1 und VEGFR-2 als auch den VEGF Liganden exprimieren konnte eine signifikante Wachstumsinhibition nach SU5614 Inkubation gezeigt werden (Abbildung 6 B).

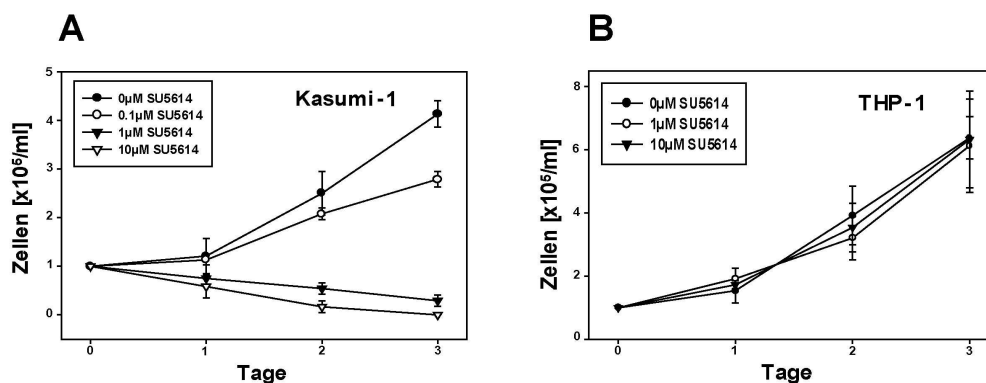


Abb. 6: A zeigt die Proliferationskurve über 3 Tage von Kasumi-1 Zellen nach SU5614 Inkubation. B die Proliferationskurve von THP-1 Zellen bei gleichen Versuchbedingungen. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei Versuchen.

3.4.2. SU5614 hemmt selektiv das Zellwachstum von KIT positiven Leukämiezelllinien

Diese Ergebnisse der Proliferationsversuche mit SU5614 zeigten nicht wie erwartet eine Wachstumsinhibition der beiden VEGFR-2 positiven Zelllinien K562 und THP-1. Vielmehr zeigte als einzige die VEGFR-2 negative Kasumi-1 Zelllinie eine deutliche Beeinflussbarkeit in ihrer Proliferationsaktivität nach SU5614 Inkubation.

Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass für die Proliferationsinhibition durch den PTK-Inhibitor SU5614 in den leukämischen Zelllinien ein anderes Zielprotein als der VEGFR-2 verantwortlich sein muss. Um dieses Protein zu identifizieren wurden die Zelllinien auf die Expression von anderen, auch das Zellwachstum steuernden Rezeptortyrosinkinasen hin untersucht. Einer von diesen Rezeptoren, der auch in der Ausreifung von hämatopoetischen Stammzellen eine wichtige Rolle spielt ist der stem cell factor receptor KIT.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Expressionsrate dieser Rezeptortyrosinkinase zeigte sich, in dem durchflusszytometrischen Verteilungsmuster eine deutliche Übereinstimmung der gemessenen KIT Expression mit der inhibitorischen Aktivität des PTK-Inhibitors SU5614: Nur die SU5614 sensitiven Kasumi-1 Zellen wiesen auch eine deutliche KIT Expression auf (Abbildung 7 B).

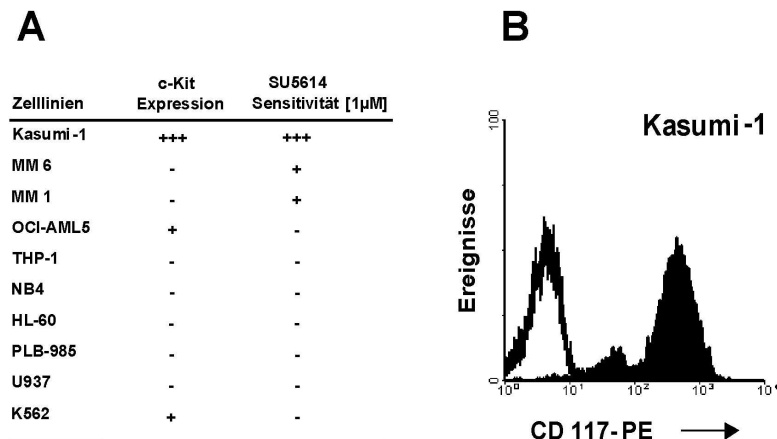


Abb. 7 A zeigt in der Tabelle den Zusammenhang zwischen der KIT Expression (+++, sehr starke Expression; ++, starke; +, schwache; -, keine) und der SU5614 Sensitivität. Die SU5614 Sensitivität wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden durch vergleichen der Proliferationsaktivität bei 0µM nach folgendem Schema standardisiert: +++, <10%; ++, 10-40%; +, 41-70%; -, >70%. In **Abb. 7 B** ist die im Durchflusszytometer gemessene KIT (CD117) Expression von Kasumi-1 Zellen zu sehen.

Zur Bestätigung dieses an der Kasumi-1 Zelllinie beobachteten Zusammenhangs zwischen der KIT Expression auf der Zelloberfläche und der wachstumshemmenden Aktivität von SU5614, wurden in einem weiteren Versuch die beiden KIT positiven AML Zelllinien M-07e und UT-7 auf eine mögliche SU5614 Sensitivität hin untersucht.

In Abbildung 8 A ist zu sehen, dass beide Zelllinien eine deutliche KIT Expression aufweisen. Die Ergebnisse der Proliferationsversuche sind in Abbildung 8 B gezeigt: Nach einer Inkubation mit 50ng/ml SCF und einer SU5614 Konzentration von 1µM über 72 Stunden betrug die Viabilität von M-07e Zellen nur noch 22% ($0,7 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (100%, $3,5 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$). Die Viabilität von UT-7 Zellen nach 48 Stunden und gleichen Inkubationsbedingungen betrug 37% ($1,2 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ($3,2 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$).

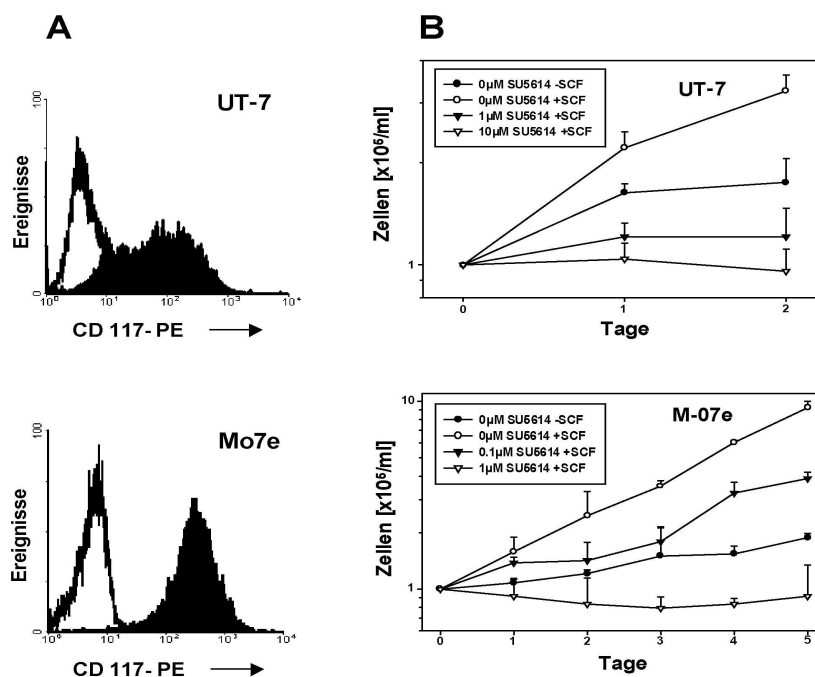


Abb. 8 A zeigt die im FACS gemessene KIT Expression von UT-7 und M-07e Zellen. In **Abb. 8 B** sind die Proliferationskurven von UT-7 und M-07e Zellen nach SU5614 Inkubation mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zu sehen. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Somit wurde der in Kasumi-1 Zellen gezeigte Effekt von SU5614, auch in den Proliferationsversuchen mit M-07e und UT-7 Zellen bestätigt. Alle untersuchten KIT positiven Zelllinien zeigten eine Beeinflussbarkeit der Zellproliferation durch den Einsatz von SU5614. Um zu zeigen, dass der PTK-Inhibitor SU5614 wirklich ein spezifischer VEGFR-2 und KIT Inhibitor ist und nicht auch unselektiv andere Proteintyrosinkinasen hemmt wurden in mehreren Versuchsreihen die leukämogenen Fusionsproteine: TEL-ABL, BCR-ABL, TEL-JAK2 auf eine SU5614 Sensitivität hin untersucht. Dazu wurden diese in die murine IL-3 abhängige Ba/F3 Zelllinie stabil transfiziert (Spiekermann et al., 2002). Nachdem die transfizierten Zellen Faktorunabhängigkeit zeigten wurden einzelne Versuchsreihen mit SU5614 inkubiert. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass keines der drei Fusionsproteine von SU5614 in seiner onkogen proliferativen Wirkung beeinflusst werden kann.

3.4.3. STI571 jedoch nicht SU1498 hemmt die Zellproliferation von Kasumi-1 Zellen

Um die pharmakologische Rezeptorselektivität der small molecule kinase catalytic domain inhibitors zu bestätigen und um auszuschließen, dass diese Inhibitoren ein unselektives

zytotoxisches Potential besitzen, wurden verschiedene Zelllinien mit STI571 und SU1498 inkubiert. Der für BCR-ABL und KIT nicht jedoch für VEGFR-2 hochspezifische PTK-Inhibitor STI571 wurde hierbei als eine Positivkontrolle für die KIT Inhibition in Kasumi-1 Zellen verwendet. Der VEGFR-2-Inhibitor SU1498 wurde als Negativkontrolle für eine in der RT-PCR möglicherweise nicht nachweisbare VEGFR-2 Aktivität und zum Ausschluss unselektiver zelltoxischer Wirkungen von PTK-Inhibitoren verwendet. Für die Untersuchung der STI571 Aktivität wurden die Ansätze mit jeweils 10^5 Zellen pro ml Medium bei STI571 Konzentrationen von $0,1\mu\text{M}$ bis $10\mu\text{M}$ inkubiert. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurde mittels Trypanblau Färbung die Viabilität bestimmt. Dabei zeigten Kasumi-1 Zellen wie in Abbildung 9 A zu sehen, nach 72 Stunden und einer STI571 Konzentration von $1\mu\text{M}$ nur noch eine Viabilität von 5% ($0,3 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ($7,6 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$). Für die Untersuchung einer SU1498 Aktivität wurden nach den oben beschriebenen Versuchsbedingungen SU1498 Konzentrationen von $0,1\mu\text{M}$ bis $10\mu\text{M}$ eingesetzt. Auch nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden konnte der VEGFR-2-Inhibitor SU1498 keinerlei Veränderungen der Zellproliferation in den Kasumi-1 Zellen induzieren. (Abbildung 9 B).

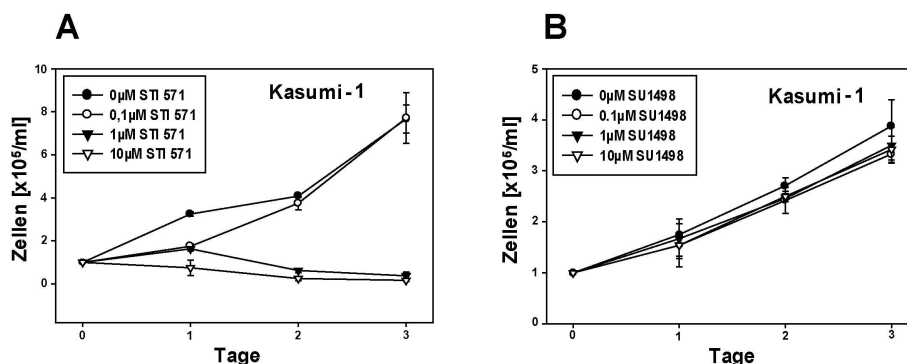


Abb. 9 A zeigt die Proliferationskurve von Kasumi-1 Zellen über 3 Tage nach STI571 Inkubation. In **Abb. 9 B** ist die Proliferationskurve von Kasumi-1 Zellen bei gleichen Versuchsbedingungen aber nach Inkubation mit den VEGFR-2-Inhibitor SU1498 zu sehen. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Versuchen.

3.4.4. Zusammenfassung der RTK Expressions- und Inhibitor Daten

Die Zusammenfassung der Rezeptorexpressions- und Proliferationsversuche mit SU5614 und STI571 zeigen, wie in der Tabelle 5 zu sehen ist ein eindeutiges Bild: Die

Wachstumshemmung durch den Einsatz der PTK-Inhibitoren SU5614 und STI571 ist eindeutig mit der KIT Expression auf AML Zelllinien assoziiert. Nur die drei KIT positiven Zelllinien Kasumi-1, M-07e und UT-7 werden durch SU5614 in ihrem Wachstum gehemmt. Die beiden VEGFR-2 positiven Zelllinien THP-1 und K562 zeigen keine SU5614 Sensitivität. Desweiteren haben SU5614 Inkubationsversuche in einem Ba/F3 Transfektionsmodell gezeigt, dass leukämogene Fusionsproteine wie TEL-ABL, BCR-ABL, TEL-JAK2 von SU5614 nicht gehemmt werden können. Die Interpretation der SU1498 Daten gibt darüber hinaus keinen Anhaltspunkt für eine antiproliferative Aktivität durch minimale, mit RT-PCR nicht detektierbare Expressionslevel von VEGFR-2 oder durch unselektive toxische Effekte dieser small molecule kinase catalytic domain inhibitors auf das Zellwachstum von AML-Zelllinien.

Wie eine zusätzlich durchgeführte RT-PCR nach dem Protokoll von Miyamoto et al. zum Nachweis des Fusionsgens aus AML1 von Chromosom 21q22 und ETO von Chromosom 8q22 zeigt, sind die Kasumi-1 Zellen neben KIT auch AML1-ETO positiv (Daten nicht gezeigt). Somit scheint für das transformierende Potential von AML1-ETO in Kasumi-1 Zellen die Aktivierung des KIT Signalweges ein nötiges zusätzliches Signal zu sein.

Zelllinien	VEGFR-2 Expression	CD117 Expression	SU5614 Sensitivität [1µM]	STI 571 Sensitivität [1µM]
Kasumi-1	-	+++	+++	+++
MM 6	-	-	+	-
MM 1	-	-	+	-
OCI-AML5	-	+	-	+
THP-1	+	-	-	-
NB4	-	-	-	-
HL-60	-	-	-	-
PLB-985	-	-	-	-
U937	-	-	-	-
K562	+	+	-	+++
M-07e	n.d.	+++	++	n.d.
UT-7	n.d.	++	++	n.d.

Tabstelle 5: zeigt die VEGFR-2 und KIT Expression von verschiedenen Zelllinien (+++, sehr starke Expression; ++, starke; +, schwache; -, keine). Demgegenüber ist die SU5614 und STI571 Sensitivität angegeben. Die Sensitivität beider PTK-Inhibitoren wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden durch Vergleich der Proliferationsaktivität bei 1µM und 0µM nach folgendem Schema standardisiert: +++, <10%; ++, 10-40%; +, 41-70%; -, >70%.

3.5. SU5614 induziert Apoptose und Zellzyklusarrest in KIT positiven Zelllinien

Für die weitere Charakterisierung der wachstumsinhibierenden Aktivität von SU5614 und für den Nachweis eines molekularen Pathways der bisher beobachteten Effekte wurden ausgewählte Zelllinien (Kasumi-1, UT-7 und M-07e) auf eine Apoptoseinduktion nach SU5614 Inkubation untersucht.

3.5.1. Caspase-3 und Annexin-V / 7-Amino-Actinomycin Färbung von Kasumi-1 Zellen

In einem ersten Schritt wurde die apoptoseinduzierende Aktivität von SU5614 mittels AnnexinV-PE / 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) und Caspase-3 Färbung getestet: Mit der durchflusszytometrischen Messung AnnexinV/7-AAD Färbung ist es möglich frühapoptotische Zellen (Annexin⁺ und 7-AAD⁻) von spätapoptotischen Zellen (Annexin⁺ und 7-AAD⁺) zu unterscheiden.

Für die AnnexinV/7-AAD Messungen wurden $2,5 \times 10^5$ Kasumi-1 Zellen pro ml Medium je nach Versuchansatz mit und ohne SU5614 für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde, wie in Abbildung 10 A zu sehen ist, der AnnexinV und 7-AAD positive Zellanteil im Durchflusszytometer bestimmt.

Die aktivierte Protease Caspase-3 ist ein sensitiver Marker der frühen Phase des programmierten Zelltodes. Durch die proteolytische Aktivität des Enzyms wird die für den Zellzyklus wichtige Poly-(ADP-Ribose) Polymerase zerstört (Patel et al., 1996).

Zum Nachweis dieser frühen apoptotischen Enzymaktivität wurde, wie in Abbildung 10 B zu sehen ist die aktive Caspase-3 Expression in Kasumi-1 Zellen nach SU5614 Inkubation gemessen: Als Messstandard wurden die unbehandelten Kasumi-1 Zellen verwendet und die Geräteeinstellung (Gate) bei den FACS Messungen dieser Kontrollzellen so gesetzt, dass maximal 4% dieser Zellen Caspase-3 positiv waren.

In dem in Abbildung 10 B gezeigten Experiment sind 3,77% der Kontrollzellen Caspase-3 positiv und 96, 23% der Kontrollzellen Caspase-3 negativ. Die Caspase-3 Expression betrug

bei 0,1 μ M SU5614 5,59% bei 1 μ M 64,1% bei 2 μ M 87,2% bei 5 μ M 93,6% und bei 10 μ M 95,5%. In beiden Assays führte die Inkubation von Kasumi-1 Zellen mit SU5614 zur Induktion von Pathways des apoptotischen Zelltodes.

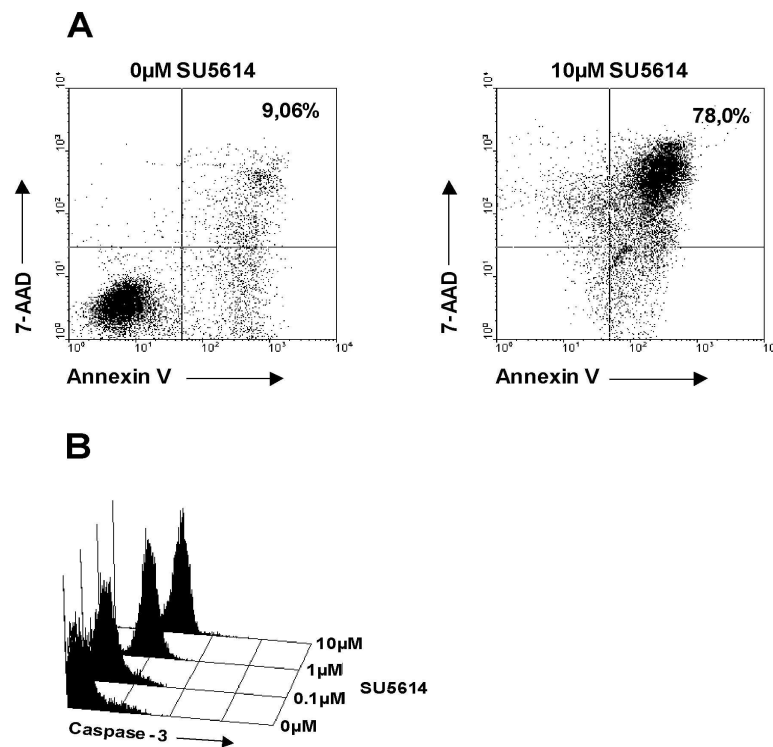
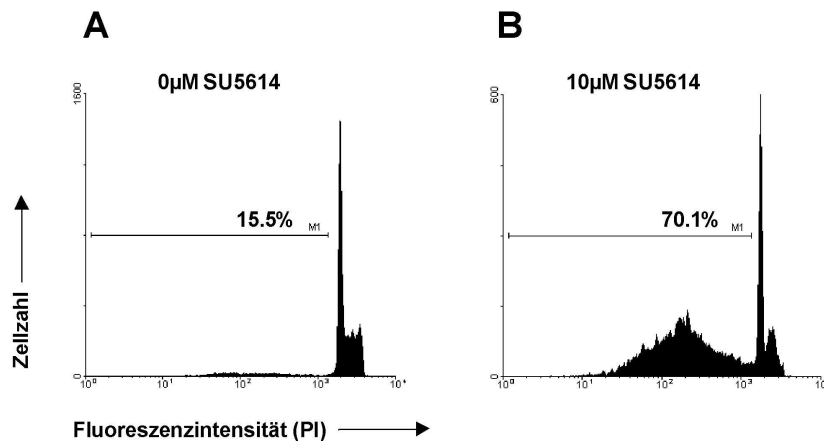


Abb. 10 A zeigt die im FACS gemessene Apoptoseinduktion von Kasumi-1 Zellen nach SU5614 Inkubation und AnnexinV/7-AAD Färbung. Links ist die Spontanapoptose von Kasumi-1 Zellen bei 0 μ M SU5614 aufgetragen. Rechts unter gleichen Versuchsbedingungen bei 10 μ M SU5614. In **Abb. 10 B** ist die im FACS gemessene aktive Caspase-3 Expression als früher Apoptosemarker von Kasumi-1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von SU5614 zu sehen.

3.5.2. Analyse des hypodiploiden DNA Gehalts nach SU5614 Inkubation mittels Propidiumiodid-Kernfärbung

Allgemein gilt: Apoptotische Zellen weisen als Ausdruck von DNA-Fragmentation einen erhöhten Anteil hypodiploider DNA auf. Für diese Analyse des Anteils von Zellkernen mit hypodiploiden DNA Gehalt, als Marker für spätapoptotische Zellvorgänge wurden Kasumi-1,

M-07e und UT-7 Zellen nach Inkubation mit einem propidiumoidhaltigen Lysispuffer untersucht: Abbildung 11 A und B zeigen exemplarisch den Prozentsatz von spätapoptotischen Zellen ohne SU5614 (A) und nach 12 stündiger Inkubation mit 10 μ M des PTK-Inhibitors (B).



In **Abb. 11 A** ist in Abwesenheit von SU5614 die Spontanapoptoserate von Kasumi-1 Zellen abgebildet. In **Abb. 11 B** erkennt man nach Apoptoseinduktion durch SU5614 bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M einen typischen m peak der die hypodiploiden Zellkerne apoptotischer Zellen repräsentiert.

In der auf Seite 42 dargestellten Abbildung 12 A, B und C sind im Überblick die Mittelwerte und Standardabweichungen der Propidiumiodid-Kernfärbung von den drei KIT positiven Zelllinien Kasumi-1, UT-7 und M-07e gezeigt. Die einzelnen Zelllinien wurden für diesen Versuch mit SU5614 Konzentrationen von 0 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M inkubiert. Zusätzlich wurden die UT-7 und M-07e Zellen sowohl mit und ohne „Stem Cell Factor“ SCF kultiviert. In Abbildung 12 A und C ist eine deutliche SU5614 dosisabhängig ansteigende Apoptoseinduktion zu erkennen.

Die in der Zellkultur gewonnene Erkenntnis, dass das Zellwachstum der UT-7 und M-07e Zelllinien in vitro essentiell von der Zugabe des „Stem Cell Factors“ SCF abhängig ist, zeigt sich auch in einer deutlichen Apoptoseinduktion nach SCF Entzug. In Abbildung 12 B ist diese SCF Abhängigkeit der M-07e Zellen in der SCF Negativkontrolle deutlich durch eine starke Zunahme des hypodiploiden Zellkernanteils zu erkennen.

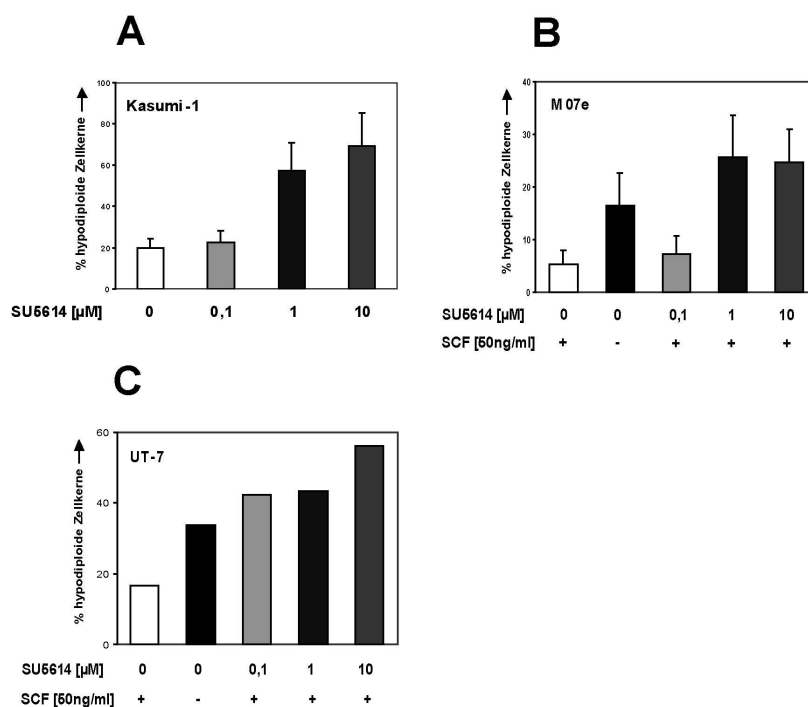


Abb. 12: zeigt die Apoptoseinduktion durch SU5614, erkennbar an der Zunahme des hypodiploiden DNA Gehalts der Propidiumiodid-gefärbten Kasumi-1, M-07e und UT-7 Zellen. Sowohl M-07e als auch UT-7 wurden in einigen Ansätzen mit 50ng/ml SCF kultiviert.

3.5.3. Zellzyklusanalyse von M-07e Zellen nach Propidiumiodid-Kernfärbung und SU5614 Inkubation

Um die Daten aus den beiden vorangegangenen Apoptoseassays zu bestätigen wurden in einem weiteren Versuch Zellzyklusanalysen der drei KIT positiven Zelllinien Kasumi-1, UT-7 und M-07e durchgeführt. Dabei ist ein Anstieg der G_0/G_1 Phase und ein Abfall der G_2/M Phase und S-Phase als Zeichen für Wachstumsstopp zu werten. Die Analyse der Zellzyklusverteilung zeigt, dass SU5614 zu einem Wachstumsarrest in der G_0/G_1 Phase des Zellzykluses sowie zu einer signifikanten Reduktion der Zellen in G_2/M Phase und S-Phase führt.

In der Abbildung 13 A ist repräsentativ die Zellzyklusverteilung von M-07e Zellen bei An- und Abwesenheit von SU5614 dargestellt. Der Anteil von Zellen in G_0/G_1 Phase des Zellzykluses erhöhte sich von $63,4\% \pm 2,7$ (0μ M Inhibitor) auf $82,7\% \pm 2,9$ (1μ M Inhibitor). Der Anteil der Zellen in der Synthese Phase bzw. G_2/M Phase erniedrigte sich hingegen von $19,5\% \pm 0,9$

bzw. $17,1\% \pm 1,9$ ($0\mu\text{M}$ Inhibitor) auf $9,6\% \pm 1,5$ bzw. $7,7\% \pm 1,4$ ($1\mu\text{M}$ Inhibitor). In Abbildung 13 B ist in Form von zwei Histogrammen exemplarisch die Zellzyklusverteilung von M-07e Zellen bei $0\mu\text{M}$ SU5614 und $1\mu\text{M}$ SU5614 dargestellt. Durch die Einwirkung von SU5614 erkennt man eine deutliche Zunahme der Zellen in der G_0/G_1 Phase des Zellzykluses (Marker 1 und 2). Ebenso wird die Abnahme der Zellen in der Synthesephase bzw. G_2/M Phase deutlich (Marker 3 und 4).

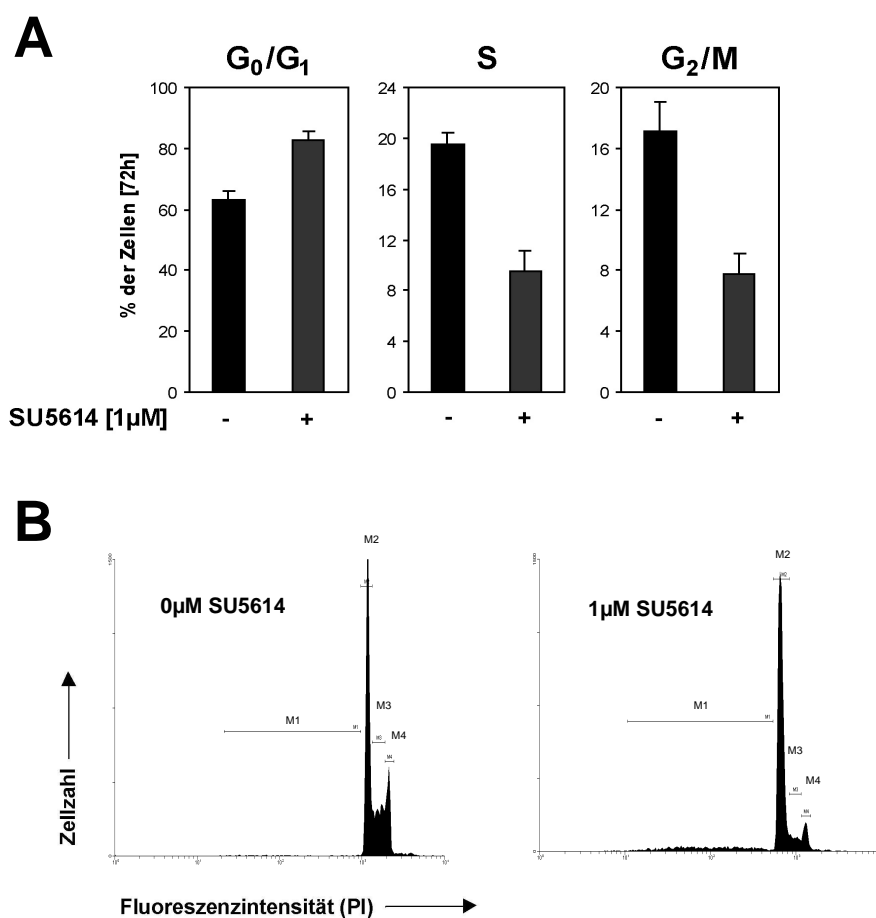


Abb. 13 zeigt graphisch **(A)** und in Form zweier Histogramme **(B)** die Zellzyklusverteilung von M-07e Zellen nach Inkubation mit (+) und ohne (-) SU5614 und Propidiumiodid-Färbung sowie FACS Auswertung. In Abb. 13 B repräsentieren die Marker 1 und 2 die Zellen in der G_0/G_1 Phase des Zellzykluses und die Marker 3 und 4 die Zellen in der Synthesephase bzw. G_2/M Phase.

Diese Daten zeigen eindeutig, dass SU5614 Apoptose und Zellzyklusarrest in KIT positiven Leukämiezellen induziert. Dies ist gleichzeitig ein wichtiger indirekter Beweis für die anti-apoptotische und pro-proliferative Aktivität des KIT Signalweges in AML Zelllinien.

3.6. Autokrine Produktion von SCF in Kasumi-1 Zellen

Im folgenden Teil dieser Arbeit sollen die zellulären Mechanismen der SCF abhängigen und konstitutiven KIT Aktivierung genauer untersucht werden. Als ursächliche Mechanismen der KIT abhängigen Zellproliferation in Kasumi-1 Zellen können mindestens zwei unterschiedliche Hypothesen zur Erklärung herangezogen werden:

Erstens besteht die Möglichkeit dass der auf Chromosom 4 gelegene KIT Rezeptor eine konstitutiv aktivierende Mutation in der zytoplasmatischen Domäne im Exon 17 trägt. Bei dieser Mutation wird im Codon 816 die Base Guanin gegen Thymin ausgetauscht. Dadurch wird die Aminosäure Aspartat durch Valin ersetzt (D816V) und es entsteht eine ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung. Durch diesen Basenaustausch entsteht eine neue *Hinfl* Restriktionsschnittstelle die einen Nachweis der Mutation erlaubt. Genomische DNA von Kasumi-1 Zellen wurde mittels *Hinfl*-restriction fragment gene length polymorphism (RFLP) und Sequenzierung von Exon 17 analysiert. Dabei erbrachte weder die Analyse mittels RFLP noch die direkte Nukleotidsequenzierung des betroffenen Exons 17 einen Hinweis für eine D816V Mutation (Daten nicht gezeigt) (Beghini et al., 1998a) (Beghini et al., 1998b) (Beghini et al., 2000). Nach der RFLP des KIT Gens und der Nukleotidsequenzierung des Exon 17 kann zumindest eine bekannte konstitutiv aktivierende Mutation für das KIT abhängige Wachstum in Kasumi-1 Zellen ausgeschlossen werden. Dies bedeutet zugleich, dass nach einer anderen Ursache für die Aktivierung von KIT gesucht werden muss.

Eine zweites Erklärungsmodell wäre eine ligandengesteuerte Aktivierung des KIT Rezeptors durch auto/parakrine Stimulation. Ein erster Hinweis für eine autokrine SCF Stimulation in Kasumi-1 Zellen zeigte sich bereits in den unter 3.4.2 beschriebenen Proliferationsversuchen. Anders als die anderen beiden KIT positiven M-07e und UT-7 Zellen benötigt die Kasumi-1 Zelllinie keinen SCF Wachstumszusatz um in der Zellkultur wachsen zu können. Für diese endogene Aktivierung des KIT Rezeptors stehen der Zelle zwei, durch alternatives splicing desselben Gens entstehende SCF-Isoformen zur Verfügung: Eine membranständige und eine lösliche Isoform. Aus diesem Grund wurden für die PCR Primerpaare verwendet, durch welche sowohl das im Zellüberstand gelöste als auch das membrangebundene SCF amplifiziert wird.

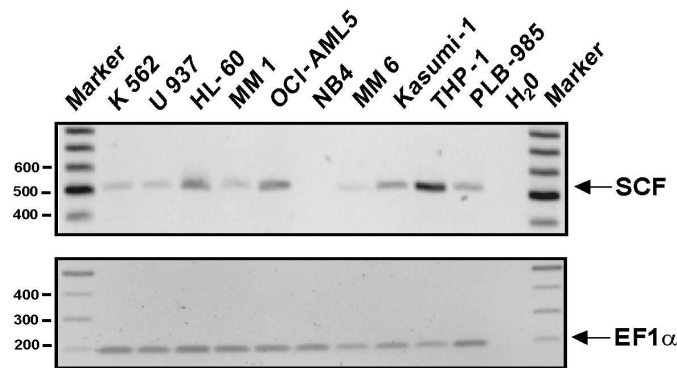


Abb. 14 zeigt die Ergebnisse der SCF RT-PCR. Für den Nachweis von sowohl dem löslichen als auch dem membranständigen SCF wurde eine Bande von 510 bp amplifiziert. Zur Kontrolle der cDNA Integrität aller Proben wurde die cDNA des housekeeping Gens EF1 α amplifiziert.

Nach dem Auftragen der PCR Produkte auf ein 2%iges Agarosegel zeigten, wie in Abbildung 14 zu sehen ist, alle untersuchten Zelllinien außer NB4 eine zum Teil starke SCF Expression in Form einer amplifizierten Bande von 510bp. Zur Kontrolle der cDNA Integrität aller Proben wurde in einer zweiten PCR Reaktion das housekeeping Gen EF1 α amplifiziert (Abb. 14). Diese, in neun der zehn untersuchten Zelllinien vorhandene Produktion von SCF könnte zur autokrinen KIT abhängigen Zellproliferation beitragen.

3.7.1. SU5614 hemmt die Tyrosinphosphorylierung von KIT in Kasumi-1 und in transfizierten HEK-293 Zellen

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass nur KIT positive AML Zelllinien durch SU5614 in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten, ist die Analyse der Tyrosinphosphorylierung von KIT ein weiterer wichtiger Schritt um die Rolle des KIT Signalweges für die Zellproliferation von AML Zellen genauer zu charakterisieren.

Hierzu wurden Kasumi-1 Zellen sowie mit KIT Wildtyp transfizierte HEK-293 Zellen auf ihre KIT Tyrosinphosphorylierung hin untersucht: Zur CaCl₂-Transfektion des KIT cDNA codierenden Expressionsvektors wurden HEK-293 Zellen in einer Dichte von 2.2×10^5 Zellen pro ml in 10cm Kulturschalen ausgesät und der Transfektionsansatz auf die adhären wachsenden HEK-293 Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde

mit Hilfe des kotransfizierten GFP Gens die Gentransfektionseffizienz beurteilt. Diese lag über 80%. Nur die mit dem Zielgen transfizierten Zellen wurden für weitere Analysen verwendet. Wie in der Abbildung 15 A zu sehen ist, exprimieren HEK-293 Zellen endogen kein KIT Protein. Nach der Stimulation (200ng/ml SCF) des transfizierten Rezeptors nimmt dessen Tyrosinphosphorylierung stark zu. Durch die Inkubation der Zellen mit SU5614 1 Stunde vor der SCF Stimulation ist eine dosisabhängige Hemmung der KIT Tyrosinphosphorylierung zu beobachten. Bereits mit einer SU5614 Konzentration von 1µM wurde eine nahezu komplette Hemmung der KIT Tyrosinphosphorylierung erreicht.

Die Analyse der Rezeptortyrosinphosphorylierung in HEK-293 Zellen ist im Vergleich zu den Zelllinien die aus Patienten isoliert wurden ein artifizielles Modell. Deswegen wurde die Hemmung der SCF induzierten KIT Phosphorylierung auch noch zusätzlich in Kasumi-1 Zellen untersucht.

Nach der Immunpräzipitation des Zielproteins zeigte sich im Western Blot eine dosisabhängige Reduktion der KIT Tyrosinphosphorylierung durch SU5614 (Abb 15 B). Im Vergleich zu der kompletten Blockierung der KIT Tyrosinphosphorylierung in den embryonalen HEK-293 Nierenzellen ist, wie in Abbildung 15 zu sehen dieser starke Effekt in Kasumi-1 Zellen nur teilweise zu erreichen. Zur Kontrolle der gleichen Beladungsmengen der Gele wurden beide Blots mit Mercaptoethanol von Antikörrückständen gereinigt (gestrippt) und mit einem spezifischen KIT Antikörper ein zweites Mal detektiert (unterer Teil der Abb. 15 A und B).

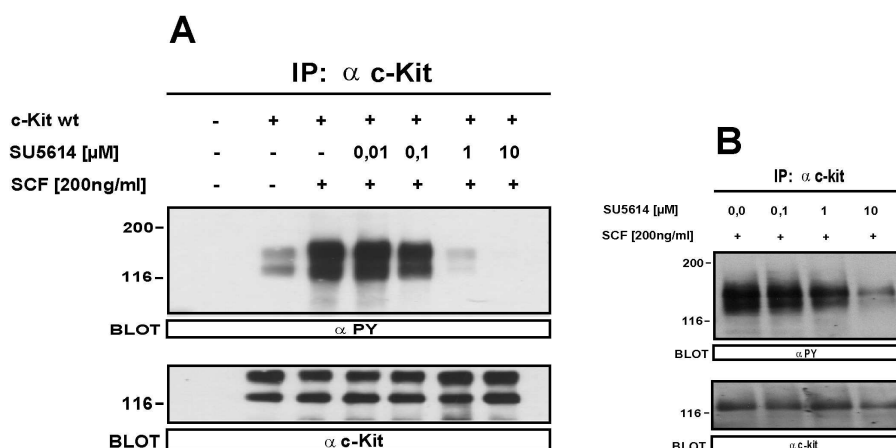


Abb. 15 A zeigt die Detektion der KIT Tyrosinphosphorylierung von mit KIT Wildtyp transfizierten 293 Zellen im Western Blot. Dazu wurde nach Immunpräzipitation mit einem spezifischen KIT Antikörper die Tyrosinphosphorylierung detektiert. In **Abb. B** ist bei gleichen Blotbedingungen die Tyrosinphosphorylierung von endogenen KIT in Kasumi-1 Zellen gezeigt. Im unteren Teil von **A** und **B** wurde die Membran mit einem Antikörper gegen KIT ein zweites Mal inkubiert und detektiert.

3.7.2. Die Tyrosinphosphorylierung von KIT D816V wird durch SU5614 nicht gehemmt

Um die Wirksamkeit des PTK-Inhibitors SU5614 gegenüber der von Beghini et al. in AML Blasten beschriebenen und auf Exon 17 des KIT Rezeptors liegenden D816V Mutation zu testen wurden wiederum HEK-293 Zellen verwendet. Diese wurden mit einer für die D816V Mutation codierenden cDNA in einem geeigneten Expressionsvektor mit Hilfe der CaCl₂-Methode transfiziert. Diese D816V Mutation des KIT Rezeptors zeigte bereits in anderen Versuchen eine Resistenz gegenüber dem KIT Inhibitor STI571 und anderen Inhibitoren.

Wie zu erwarten war zeigte die konstitutiv aktivierende D816V Mutation in den biochemischen Phosphorylierungsuntersuchungen im Western Blot auch bereits ohne SCF Stimulation eine sehr starke KIT Tyrosinphosphorylierung.

Wie in der Abbildung 16 zu sehen ist, hatte der Einsatz des PTK-Inhibitors SU5614 auch bei einer Konzentration von 10µM keine Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von KIT D816V zur Folge. Zur Kontrolle der gleichen Beladungsmengen des Gels wurde der Blot mit Mercaptoethanol von Antikörperrückständen gereinigt (gestrippt) und mit einem spezifischen KIT Antikörper ein zweites Mal inkubiert und detektiert.

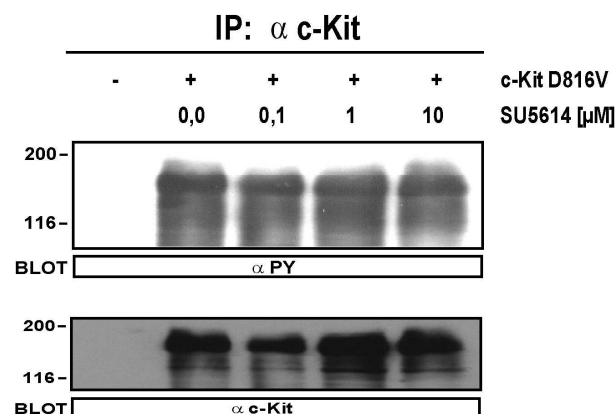


Abb. 16: zeigt nach Immunpräzipitation die Western Blot Analyse der KIT D816V Tyrosinphosphorylierung von mit D816V transfizierten 293 Zellen. Um die gleiche Proteinbeladungsmenge der einzelnen Bahnen des Blots zu zeigen, wurde die Membran mit einem Antikörper gegen KIT ein zweites Mal inkubiert und detektiert.

4. Diskussion

Die akute myeloische Leukämie ist eine hämatologische Neoplasie die durch eine rasche Vermehrung von normalerweise nur in sehr geringer Anzahl vorhandener hämatopoetischer Vorläuferzellen charakterisiert ist. Grundlage für diese Expansion eines malignen hämatopoetischen Zellklons mit generalisierter Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark und einer Ausschwämmung von unreifen leukämischen Zellen ins periphere Blut ist eine als leukämische Transformation bezeichnete genetische Alteration einer hämatopoetischen Stammzelle. Es ist bekannt, dass solche akute myeloische Leukämiezellen zum Teil große Mengen von Rezeptortyrosinkinasen exprimieren (Caceres-Cortes et al., 2001) (Sperling et al., 1997) (Ikeda et al., 1991) (Kato et al., 1995). Die pathogenetische Bedeutung der Überexpression und Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinasen für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer leukämischen Erkrankung soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem der stem cell factor receptor KIT und der vaskular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) (Zhao et al., 2002) (Ziegler et al., 1999). Von diesen Rezeptortyrosinkinasen gehen Signale aus, die sowohl die Zellproliferation und das „self-renewal“ von Zellen als auch Apoptose regulieren. Rezeptortyrosinkinasen wie der VEGFR-2 sind aber auch ebenso bedeutsam für die Bildung eines für das Tumorzellwachstum günstigen Umgebungsmilieus. Beispielsweise wird durch die Sezernierung von VEGF und anderen angiogenen Mediatoren in Endothelzellen ein Mikrations- und Proliferationssignal aktiviert, welches letztendlich durch Induktion von Angiogenese zur Tumorzellprogression beitragen kann (Millauer et al., 1993) (Millauer et al., 1996) (Grunstein et al., 2000). Derartige, das Tumorzellwachstum unterstützende oder bedingende autokrine Stimulationsschleifen wurden für verschiedene Tumorentitäten beschrieben. Dabei wurde sowohl von Marschall et al. bei Pankreaskarzinomzelllinien als auch von Dias et al. bei AML-Zelllinien eine VEGF induzierte autokrine Schleife postuliert (von Marschall et al., 2000) (Dias et al., 2000). Aufbauend auf der oben dargelegten Bedeutung von Rezeptortyrosinkinasen und deren Liganden für die Induktion und Persistenz einer malignen Erkrankung wurden in dieser Arbeit eine Reihe von humanen leukämischen

Zelllinien auf die Expression von relevanten Rezeptortyrosinkinasen und deren Liganden untersucht.

In neun von zehn der untersuchten leukämischen Zelllinien konnte eine starke VEGF Expression gezeigt werden, wohingegen die VEGFR-1 und VEGFR-2 Expression auf sechs bzw zwei Zelllinien beschränkt blieb. Studien von Fiedler et al. und Aguayo et al. beschrieben in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten eine deutliche VEGF Expression in AML-Zelllinien und primären AML-Blasten. Die Studie von Aguayo et al. definierte zusätzlich die Bedeutung der VEGF Expression als einen wichtigen Prognosemarker für das Überleben von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Fiedler et al., 1997) (Aguayo et al., 1999) (Aguayo et al., 2002). Die Studie von Dias et al. beschrieb eine das Zellwachstum stimulierende autokrine Stimulationsschleife zwischen VEGF und VEGFR-2 unter serumfreien Kulturbedingungen. Dabei konnte durch VEGFR-2 neutralisierende Antikörper eine Zellproliferationsinhibition erreicht werden (Dias et al., 2000). Zusätzlich gelang es Dias et al. in einem Xenotransplantationsmodell bei Mäusen durch den Einsatz eines neutralisierenden Antikörpers gegen den VEGFR-2 das Wachstum der transplantierten humanen HL-60 Leukämiezellen zu hemmen. Jedoch konnte in dieser Studie nur durch die gleichzeitige Blockierung des humanen wie auch des murinen VEGFR-2 eine Langzeitremission der mit HL-60 Zellen inokulierten Mäuse erreicht werden (Dias et al., 2001). Diese Studie unterstreicht sowohl die Bedeutung einer direkten VEGFR-2 Stimulation auf AML-Blasten als auch die Bedeutung der durch VEGFR-2 vermittelten Aktivierung von peripher gelegenen Endothelzellen für das „engraftment“ von Leukämiezellen.

Im Gegensatz zu der Studie von Dias et al. konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchungen der VEGF Sekretion und der VEGFR-2 Expression sowie durch das Screening der Zelllinien auf eine Sensitivität gegenüber dem VEGFR-2 Inhibitor SU5614 kein Hinweis für eine autokrine Stimulationsschleife zwischen VEGF und VEGFR-2 in Leukämiezellen gefunden werden. Diese *in vitro* gewonnenen Daten erlauben jedoch keinen generellen Rückschluss auf die Bedeutung der VEGFR-2 Aktivierung *in vivo*. Die Diskrepanz zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen und den oben beschriebenen Daten aus der Studie von Dias et al. ist möglicherweise durch Unterschiede im Versuchsaufbau bedingt: So verwendeten Dias et al. zur Proliferationsinhibition der leukämischen Zelllinien VEGFR-2 neutralisierende Antikörper und serumfreies Kulturmedium. Die Experimente dieser Arbeit

wurden hingegen mit einem im katalytischen Zentrum des VEGF-2-Rezeptors angreifenden PTK-Inhibitors und in Gegenwart von 10% FCS durchgeführt. Das Fehlen von Serum (FCS) bei den Versuchsansätzen von Dias et al. hat möglicherweise eine Sensibilisierung der untersuchten Zellen gegenüber dem endogen produzierten VEGF und somit eine stärkere Wirksamkeit der wachstumshemmenden Aktivität der anti-VEGFR-2 Antikörper zur Folge. Durch das Ausbleiben einer VEGFR-2 Inhibition in Gegenwart von Serum muss die Bedeutung dieser autokrinen Schleife unter physiologischen Wachstumsbedingungen in Frage gestellt werden.

Möglicherweise spielt aber die Produktion von VEGF durch primäre AML Blasten auf eine andere Art und Weise eine wichtige Rolle in der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie. Es zeigte sich nämlich in einer Arbeit von de Bont et al., dass eine erhöhte Knochenmarksgefäßdichte in Patienten mit AML besteht, die möglicherweise durch die VEGF Produktion und VEGF Sezernierung der AML-Blasten initiiert oder zumindest unterstützt wird (de Bont et al., 2001). Möglicherweise ist diese Neoangiogenese im Knochenmark von AML Patienten ein wichtiger Teilschritt der zur Konsolidierung dieser Erkrankung beiträgt. Somit könnte die Blockierung von VEGFR-2 mittels Inhibitoren wie SU5614 die Proliferation von Endothelzellen im Knochenmark einschränken und dadurch die Versorgung der Leukämiezellen mit Blut (Sauerstoff und Nährstoffen) unterbinden. Erste Erfolge mit einem Therapiekonzept dieser Art konnte Dias et al. in einem Maus-Xenotransplantationsmodell durch die Untersuchung der Bedeutung der VEGFR-2 Blockierung mit Antikörpern für das Langzeitüberleben an AML erkrankter Mäuse zeigen (Dias et al., 2001).

Ausgehend von diesen Überlegungen wurde die Wirkung von SU5614 auf das Zellwachstum von mikrovaskulären Endothelzellen in dieser Arbeit in einem dreidimensionalen *in vitro* Angiogenesemodell untersucht. Dabei zeigte sich in diesem sehr physiologischen Angiogenesemodell, dass durch den Einsatz des Inhibitors eine komplette Blockierung des VEGF induzierten kapillären Wachstums von Endothelzellen erreicht werden konnte. Dies bedeutet, dass der small molecule kinase catalytic domain inhibitor SU5614 ein ausgeprägtes anti-angiogenetisches Potential bei geringen toxischen Eigenschaften zeigt und dadurch beispielweise als Modellsubstanz für zukünftige anti-angiogenetische Therapieansätze dienen kann.

Wegen der fehlenden Korrelation zwischen der VEGFR-2 Expression und der Sensitivität der Zelllinien gegenüber einer antiproliferativen Aktivität von SU5614 wurden weitere Proteintyrosinkinasen als mögliche Zielstruktur von SU5614 untersucht. Hierbei zeigte letztendlich nur der Vergleich zwischen den Proliferationsversuchen mit SU5614 und der untersuchten KIT Expression eine positive Korrelation und legt die Vermutung nahe, dass die Expression des stem cell factor receptor „KIT“ für die Sensitivität von Kasumi-1, UT-7 und M-07e Zellen gegenüber SU5614 verantwortlich ist. Eine Reihe von Apoptoseversuchen mit Kasumi-1, UT-7 und M-07e Zellen, nach Inkubation mit SU5614 bestätigten die bereits in den Proliferationsversuchen gewonnenen Daten. Nach SU5614 Inkubation zeigten die KIT-positiven Zellen eine eindeutige Apoptoseinduktion sowohl in der Caspase-3 also auch in der AnnexinV-PE / 7-Amino-Actinomycin Färbung. Auch die Zellzyklusanalysen und die Messungen des hypodiploiden DNA Gehaltes, als Marker für spätapoptotische Zellvorgänge zeigten eindeutig, dass SU5614 in sensitiven Zelllinien Apoptose induziert. Die Bedeutung des KIT Signalweges für das Wachstum von Leukämiezellen wird auch durch eine Untersuchung von Caceres et al. bestätigt: Hierbei wurden SCF produzierende AML Blasten mit gegen SCF mRNA gerichteten antisense-Oligonukleotide behandelt. Dabei zeigte sich eine Abnahme der SCF Proteinmenge und eine Apoptoseinduktion in den untersuchten Zellen (Caceres-Cortes et al., 2001).

Zur Bestätigung, dass SU5614 spezifisch den KIT Signalweg hemmt, und kein anderer unspezifischer oder zytotoxischer Effekt des small molecule kinase catalytic domain inhibitors für die Wachstumsinhibition verantwortlich ist, wurden Kasumi-1 Zellen mit zwei weiteren PTK-Inhibitoren inkubiert. Dabei zeigte der KIT Inhibitor STI571 die gleiche proliferationshemmende Wirkung wie SU5614. Der VEGFR-2-Inhibitors SU1498 wurde als Negativkontrolle für eine in der RT-PCR möglicherweise nicht nachweisbare VEGFR-2 Aktivität und zum Ausschluss unselektiver toxischer Wirkungen von PTK-Inhibitoren verwendet. Auch nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden konnte dieser VEGFR-2-Inhibitor keinerlei Veränderungen der Zellproliferation von Kasumi-1 Zellen verursachen.

Die Hypothese, dass durch spezifische Inhibition des KIT Signalweges eine Proliferationsinhibition von KIT positiven AML Zelllinien erreicht werden kann, wird durch eine Studie von Schmolich et al. mit unterstützt. In dieser Studie zeigte der Einsatz des von der Firma SUGEN entwickelten RTK-Inhibitors SU5416 in der SCF abhängigen M-07e

Zelllinie eine Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion (Smolich et al., 2001). Abweichend von dieser Hypothese zeigen die in der vorliegenden Arbeit bei gleichen experimentellen Bedingungen untersuchten OCI-AML5 und K562 Zellen trotz einer detektierbaren KIT Expression keine Wachstumsinhibition nach SU5614 Inkubation.

Der Grund für dieses nicht in die oben genannte Hypothese passende Ergebniss liegt möglicherweise darin, dass im Vergleich zu den KIT positiven und zugleich SU5614 sensitiven Zelllinien Kasumi-1, UT-7 und M-07e die OCI-AML5 Zellen eine, nur in einer kleinen Subfraktion vorhandene KIT Expression aufweisen. Der KIT negative Großteil der OCI-AML5 Zellen würde demnach wie alle anderen untersuchten KIT negativen Zelllinien keine Beeinflussung des Wachstums durch SU5614 zeigen. Eine andere Möglichkeit für die Unempfindlichkeit von OCI-AML5 gegenüber SU5614 könnte der Erwerb von Mutationen eines anderen, das Wachstum steuernden Gens, z.B. eines Tumorsuppressorgens sein. Ferner besteht die Möglichkeit, dass sich innerhalb des KIT Rezeptors eine konstitutiv aktivierende und das katalytische Zentrum verändernde Mutation ausgebildet hat, wodurch die Effektivität des Inhibitors möglicherweise verloren geht. Untersuchungen von PTK-Rezeptoren mit Mutationen in der katalytischen Tasche oder der Aktivierungsschleife zeigten, dass solche Mutationen zu einer PTK-Inhibitor Resistenz führen können (Gorre et al., 2001) (Hochhaus et al., 2001) (Marx, 2001). In allen oben genannten Fällen hätte die Unterbrechung des KIT Signalweges durch SU5614 keine die Viabilität der Zellen beeinflussenden Effekte mehr zur Folge.

Die fehlende Wachstumshemmung von K562 Zellen durch SU5614 liegt möglicherweise nicht wie oben im Text beschrieben an der Existenz einer KIT Mutation, sondern an der Expression des BCR-ABL Fusionsgens in K562 Zellen. Die Zelllinie ist wahrscheinlich durch dieses Fusionsprotein weitgehend unabgänglich von Wachstumssignalen, die über den KIT Rezeptor zugeführt werden. Des weiteren haben die in dieser Arbeit beschriebenen SU5614 Inkubationsversuche mit BCR-ABL transfizierten Ba/F3 Zellen gezeigt, dass SU5614 die Funktion dieses Fusionsproteins nicht hemmen kann (siehe Abschnitt 3.4.4).

Bei der genaueren Untersuchung der Wirkung von SU5614 auf KIT in Kasumi-1 und in KIT transfizierten HEK-293 Zellen zeigte sich, dass die Blockierung der KIT Tyrosinphosphorylierung in Kasumi-1 Zellen im Vergleich zu den transfizierten 293 Zellen

nur partiell ausgebildet ist. Erst ab einer SU5614 Konzentration von 10 μ M nimmt die KIT Tyrosinphosphorylierung deutlich ab, wohingegen die biologischen Effekte des Inhibitors bereits ab einer Konzentration von 1 μ M zu beobachten waren. Diese Tatsache kann einerseits bedeuten, dass die verbleibende Tyrosinphosphorylierung von KIT nicht ausreicht um die Kasumi-1 Zellen vor Apoptose zu schützen oder andererseits, dass es sich bei der inkompletten Abnahme der Tyrosinphosphorylierung um ein „Artefakt“ im Western Blot handelt. Unabhängig davon zeigen die Ergebnisse der Tyrosinphosphorylierungsuntersuchungen in den KIT transfizierten embryonalen HEK-293 Nierenzellen, dass der KIT Rezeptor ein molekulares Target von SU5614 ist.

Das mitogene Potential von KIT kann prinzipiell durch zwei Mechanismen bedingt sein: Erstens durch eine autokrine oder parakrine, SCF abhängige Aktivierung des KIT Signalwegs oder zweitens durch eine konstitutiv aktivierende Mutation des KIT Rezeptors (Beghini et al., 2000) (Boissan et al., 2000). Ausgehend von diesen beiden Hypothesen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine autokrine und oder parakrine SCF Produktion und nicht eine konstitutiv aktivierende Mutation in Kodon 816 für die KIT abhängige Proliferation von Kasumi-1 Zellen verantwortlich ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass sich eine andere, bisher unbekannte Mutation im Gen des von Kasumi-1 Zellen exprimierten KIT Rezeptors befindet. Diese Mutation müsste allerdings, anders wie die von Beghini et al. in AML Blasten beschriebene und auf Exon 17 des KIT-Rezeptors liegende D816V Mutation sensitiv gegenüber SU5614 sein. Die in dieser Arbeit untersuchte D816V Mutation ist hingegen auch gegenüber SU5614 Konzentrationen von 10 μ M resistent.

Die essentielle Bedeutung des KIT Signalweges für die Pathogenese leukämischer Erkrankungen wurde auch eindrucksvoll im Bereich der hämatopoetischen Stammzellforschung gezeigt: Für hämatopoetische Stammzellen stellt die gleichzeitige Aktivierung von zwei Proteinkinasen in der Zelle ein Proliferationssignal und ein Self-renewal-Signal dar. So ist die Aktivierung von KIT durch SCF und die Aktivierung von JAK-2 durch einen artifiziellen Liganden ausreichend, um sogenannte primäre „multipotential hematopoietic progenitor cells“ (MHPCs) in einen lang anhaltenden Zyklus von Proliferation und self-renewal zu versetzen (Zhao et al., 2002). Die Bedeutung dieser Erkenntnisse aus der Stammzellforschung für die Ergebnisse dieser Arbeit liegt möglicherweise darin, dass

auch die Kombination von einer ligandengesteuerten KIT Aktivierung mit einem onkogenen Fusionsgen wie TEL-JAK-2 in hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zu einer starken Zellproliferation und zu „self-renewal“ in der Langzeitkultur führen kann. Daraus geht hervor, dass für eine klonale Leukämiezellproliferation in bestimmten Fällen die KIT Aktivierung zusammen mit der Aktivierung einer weiteren Proteintyrosinkinase ausreichend sein kann. Auch für das transformierende Potential von AML1-ETO, einem AML spezifischen Fusionsgen aus den Transkriptionsfaktoren AML1 und ETO, ist ein zusätzliches mitogenes Signal nötig. Wie die Proliferationsversuche mit Kasumi-1 Zellen in dieser Arbeit zeigen, ist für das Wachstum dieser AML1-ETO fusionsgentragenden Zellen die zusätzliche Aktivierung des KIT Signalweges von essentieller Bedeutung da nach Hemmung von KIT die Expression von AML1-ETO nicht ausreicht ein proliferatives Signal zu induzieren und die Zellen vor Apoptoseinduktion zu schützen. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen SCF Produktion, KIT Expression und Zellproliferation ist nicht zuletzt deshalb von besonderer Bedeutung da in 65% der isolierten Blasten von AML Patienten nach Berichten von Sperling et al. eine KIT Expression nachgewiesen wurde. Durch diese KIT Expression der AML Patientenzellen ergibt sich, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte eine mögliche Hemmbarkeit der Leukämiezellen durch RTK-Inhibitoren wie SU5614 (Ikeda et al., 1991) (Sperling et al., 1997).

Zum Ende dieser Arbeit soll auch die Frage gestellt werden in wie fern die Verwendung von SU5614 gegenüber einer konventionellen Chemotherapie und anderen bereits bekannten PTK-Inhibitoren (STI571) einen Vorteil bringen kann?

Der Vorzug einer Therapie mit SU5614 gegenüber Therapieversuchen mit STI571 könnte sein, dass mit SU5614 mehrere AML krankheitsrelevante Zielstrukturen gleichzeitig inhibiert werden könnten. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kommt in der akuten myeloischen Leukämie für den PTK-Inhibitor SU5614 neben KIT auch der VEGFR-2 als potentielle therapierrelevante Zielstruktur in Frage. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von SU5614 gegenüber anderen PTK-Inhibitoren liegt in einer möglichen Verhinderung von sekundären Resistenzen durch Punktmutationen in den Zielstrukturen des Inhibitors wie sie für STI571 bereits beschrieben worden sind (Gorre et al., 2001) (Marx, 2001) (Hochhaus et

al., 2001) (Blagosklonny, 2002). Ausschlaggebend für die Verhinderung einer solchen Resistenzentwicklung könnte sein, dass durch SU5614 nicht nur KIT Rezeptoren auf Tumorzellen gehemmt werden, welche durch eine hohe Teilungsrate einem starken Selektions- und Mutationsdruck ausgesetzt sind sondern auch, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, gesunde VEGFR-2 tragende Endothelzellen welche durch Neoangiogenese in das Tumorwachstum indirekt eingreifen können.

Der Vorteil von small molecule kinase catalytic domain inhibitors gegenüber einer Chemotherapie liegt, wie man aus den Erfahrungen mit STI571 weiß, in einem wahrscheinlich geringeren Nebenwirkungsprofil dieser Substanzen (Druker et al., 2001a), (Druker et al., 2001b). Dies kann durch deren spezifischen Wirkmechanismus erklärt werden. Möglicherweise wird man auch in Zukunft erst durch den kombinierten Einsatz von solchen Inhibitoren und klassischen Chemotherapeutika eine Verbesserung der Therapieoptionen von malignen Erkrankungen erreichen können. Insbesondere könnte die Kombination von Inhibitoren gegen KIT und AML1-ETO, allein schon aufgrund des sehr häufigen Vorkommens beider Proteine für die Behandlung der AML eine vielversprechende therapeutische Option darstellen.

Die Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten unterschiedlichen molekularen Zielstrukturen des RTK-Inhibitors SU5614 zu einem gemeinsamen zellbiologischen und molekularen Wirkmechanismus begründen das Konzept einer gezielten, an den molekularen Mechanismen orientierten Therapieform. Durch die Hemmung des KIT Signalweges in Leukämiezellen sowie durch die Hemmung der VEGF induzierten Endothelzellproliferation, werden, wie in Abbildung 17 dargestellt, zwei unterschiedliche, für die Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie wichtige Signalwege durch eine einzige Substanz blockiert. Durch die gezielte Hemmung des KIT Rezeptors konnte in dieser Arbeit dessen Bedeutung sowohl für die Regulation von Zellproliferation als auch für die Regulation von „self-renewal“ und Apoptose in Leukämiezellen gezeigt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass für das Wachstum der AML1-ETO fusionsgenetragenden Kasumi-1 Zellen die zusätzliche Aktivierung des KIT Signalweges von

essentieller Bedeutung ist, da nach Hemmung von KIT die Expression von AML1-ETO nicht ausreicht um ein proliferatives Signal zu induzieren und die Zellen vor Apoptose zu schützen.

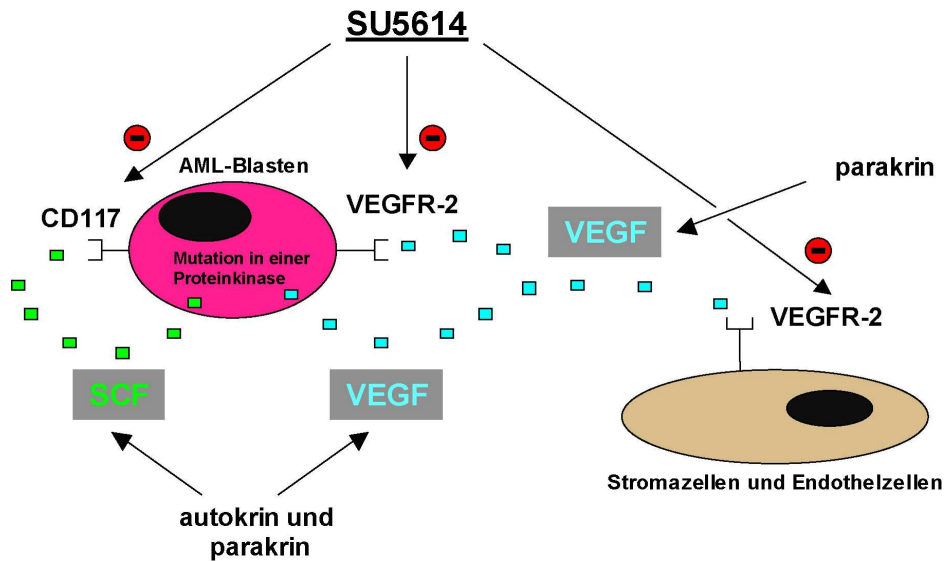


Abb. 17: zeigt für die Entstehung der Akuten Myeloischen Leukämie wichtige pathophysiologische Zusammenhänge sowie verschiedene Angriffspunkte des RTK-Inhibitors SU5614. Im Vordergrund steht die Wachstumshemmung von KIT positiven Leukämiezellen durch die Unterbrechung von autokrinen und parakrinen SCF Stimulationsschleifen. Dazu gehört auch die Hemmung der Angiogenese durch einen anti-proliferativen Effekt von SU5614 auf Endothelzellen. Eine Wachstumshemmung der Leukämiezellen durch eine Blockierung des VEGFR-2 konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

5. Zusammenfassung

Die pathogenetische Grundlage der akuten myeloischen Leukämie (AML) stellt die leukämische Transformation hämatopoetischer Stammzellen dar, die zur Proliferation eines leukämischen Klons führt. Der leukämische Zellklon ist einerseits durch ein rasches, von normalen Regulationsmechanismen unbeeinflusstes Wachstum und andererseits durch eine gestörte Reifungstendenz charakterisiert.

Forschungsarbeiten zur Aufklärung molekularer Ursachen der leukämischen Transformation von hämatopoetischen Stammzellen rücken zunehmend die Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen als häufige Faktoren oder Co-Faktoren in den Vordergrund. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es die Bedeutung der Expression von Liganden wie Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Stem Cell factor (SCF) sowie deren Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1, VEGFR-2 und Stem Cell Factor Receptor KIT für die Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie genauer zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Leukämiezelllinien mit Hilfe von RT-PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie auf dessen Liganden und Rezeptorstatus hin untersucht. Im Mittelpunkt stand die Untersuchung und der Nachweis einer so genannten autokrinen und oder parakrinen Stimulationsschleife zwischen den von AML Zellen sezernierten Liganden und den gleichzeitig exprimierten Rezeptortyrosinkinasen. Das Ziel dabei war die erfolgreiche Unterbrechung dieser Signalwege durch die Anwendung des small molecule kinase catalytic domain Inhibitors SU5614, der in Experimenten mit VEGF positiven mikrovaskulären Endothelzellen bereits eine antiproliferative Wirkung gezeigt hat.

In neun von zehn der untersuchten leukämischen Zelllinien konnte eine starke VEGF Expression gezeigt werden, wohingegen die VEGFR-1 und VEGFR-2 Expression auf sechs bzw. zwei Zelllinien beschränkt blieb. Um der Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen in den untersuchten Leukämiezelllinien eine pathogenetische Relevanz zuweisen zu können, wurde mit Hilfe der spezifischen Proteintyrosinkinaseinhibitoren SU5614, STI571 und SU1498 versucht das Wachstum dieser leukämischen Zellen zu hemmen. Dabei zeigte sich, dass in den untersuchten AML Zelllinien nicht die Expression von dem VEGFR-2 sondern nur die Überexpression und Stimulation des stem cell factor receptor KIT eine proliferative Wirkung auf die untersuchten AML Zelllinien hat. So konnte durch die Anwendung von SU5614 das Zellwachstum der KIT positiven Zelllinien Kasumi-1, UT-7 und M-07e

konzentrationsabhängig gehemmt werden. Zur Bestätigung dieser aus Wachstumskurven gewonnenen Ergebnisse wurden zusätzlich verschiedene Apoptoseassays durchgeführt die zeigen konnten, dass durch den Einsatz des PTK-Inhibitors SU5614 keine unspezifischen toxischen Effekte in den mit SU5614 behandelten Zellen entstehen sondern die Induktion von Apoptose initiiert wird.

Um den in den vorangegangenen Proliferations -und Apoptoseversuchen beschriebenen Zusammenhang zwischen dem Einsatz des Proteintyrosinkinaseinhibitors SU5614 und der beobachteten Wachstumshemmung von KIT positiven Zellen zu beweisen, wurden biochemische Phosphorylierungsuntersuchungen des KIT Rezeptors in Kasumi-1 und KIT Rezeptor transfizierten HEK-293 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen eindeutig eine Hemmung der Tyrosinphosphorylierung des KIT Rezeptors durch SU5614 Inkubation und bestätigen die Bedeutung des SCF/KIT Signalweges für das Zellwachstum von KIT positiven AML Zelllinien. Die abschließende Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse verdeutlicht, dass die Regulation von Zellproliferation und Apoptoseinduktion in den untersuchten KIT positiven Leukämiezelllinien durch den KIT Signalweg gesteuert wird. Auch für das Wachstum der AML1-ETO positiven Kasumi-1 Zelllinie ist neben der Expression dieses Fusionsgens die zusätzliche Aktivierung des KIT Signalweges von essentieller Bedeutung.

6. Literaturverzeichnis

Aguayo, A., Estey, E., Kantarjian, H., Mansouri, T., Gidel, C., Keating, M., Giles, F., Estrov, Z., Barlogie, B., and Albitar, M. (1999). Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia, *Blood* 94, 3717-21.

Aguayo, A., Kantarjian, H. M., Estey, E. H., Giles, F. J., Verstovsek, S., Manshour, T., Gidel, C., O'Brien, S., Keating, M. J., Albitar, M., *et al.* (2002). Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes

Al-Obeidi, F. A., and Lam, K. S. (2000). Development of inhibitors for protein tyrosine kinases, *Oncogene* 19, 5690-701.

Beghini, A., Cairoli, R., Morra, E., and Larizza, L. (1998a). In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blasts carrying a novel activating ligand-independent C-kit mutation, *Blood Cells Mol Dis* 24, 262-70.

Beghini, A., Larizza, L., Cairoli, R., and Morra, E. (1998b). c-kit activating mutations and mast cell proliferation in human leukemia, *Blood* 92, 701-2.

Beghini, A., Peterlongo, P., Ripamonti, C. B., Larizza, L., Cairoli, R., Morra, E., and Mecucci, C. (2000). C-kit mutations in core binding factor leukemias, *Blood* 95, 726-7.

Blagosklonny, M. V. (2002). STI-571 must select for drug-resistant cells but 'no cell breathes fire out of its nostrils like a dragon', *Leukemia* 16, 570-2.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling, *Nature* 411, 355-65.

Boissan, M., Feger, F., Guillosson, J. J., and Arock, M. (2000). c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases, *J Leukoc Biol* 67, 135-48.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dry banding, *Anal Biochem* 72, 246-254.

Buske, C., Becker, D., Feuring-Buske, M., Hannig, H., Wulf, G., Schafer, C., Hiddemann, W., and Wormann, B. (1997). TGF-beta inhibits growth and induces apoptosis in leukemic B cell precursors, *Leukemia* 11, 386-92.

Caceres-Cortes, J. R., Alvarado-Moreno, J. A., Waga, K., Rangel-Corona, R., Monroy-Garcia, A., Rocha-Zavaleta, L., Urdiales-Ramos, J., Weiss-Steider, B., Haman, A., Hugo, P., *et al.* (2001). Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias, *Cancer Res* 61, 6281-9.

Cronkite, E. P. (1987). Chemical leukemogenesis: benzene as a model, *Semin Hematol* 24, 2-11.

Curtis, R. E., Boice, J. D., Jr., Moloney, W. C., Ries, L. G., and Flannery, J. T. (1990). Leukemia following chemotherapy for breast cancer, *Cancer Res* 50, 2741-6.

de Bont, E. S., Rosati, S., Jacobs, S., Kamps, W. A., and Vellenga, E. (2001). Increased bone marrow vascularization in patients with acute myeloid leukaemia: a possible role for vascular endothelial growth factor, *Br J Haematol* 113, 296-304.

Demetri, G. D. (2001). Targeting c-kit mutations in solid tumors: scientific rationale and novel therapeutic options, *Semin Oncol* 28, 19-26.

Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Zhu, Z., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D. J., Tateno, M., Bohlen, P., Moore, M. A., and Rafii, S. (2001). Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10857-62.

Dias, S., Hattori, K., Zhu, Z., Heissig, B., Choy, M., Lane, W., Wu, Y., Chadburn, A., Hyjek, E., Gill, M., *et al.* (2000). Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration, *J Clin Invest* 106, 511-21.

Downing, J. R. (1999). The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance, *Br J Haematol* 106, 296-308.

Drexler, H., Dirks, W., MacLeod, R., Quentmeier, H., and Steube, K. (1995). Suggestion for Handling Received Cultures, *DSM Catalogue of Human and Animal Cell lines* 14.

Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001a). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome, *N Engl J Med* 344, 1038-42.

Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., and Sawyers, C. L. (2001b). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 344, 1031-7.

Durrant, I. (1994). Enhanced chemiluminescence detection of horseradish peroxidase labelled probes, *Methods Mol Biol* 31, 147-161.

Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocr Rev* 18, 4-25.

Ferrara, N., and Keyt, B. (1997). Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications, *Exs* 79, 209-32.

Fiedler, W., Graeven, U., Ergun, S., Verago, S., Kilic, N., Stockschlader, M., and Hossfeld, D. K. (1997). Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia, *Blood* 89, 1870-5.

Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis, *Adv Cancer Res* 43, 175-203.

Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J Natl Cancer Inst* 82, 4-6.

Folkman, J. (1995). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis, *N Engl J Med* 333, 1757-63.

Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors, *Science* 235, 442-7.

Fong, T. A., Shawver, L. K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T. J., Kim, Y. H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., *et al.* (1999). SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types, *Cancer Res* 59, 99-106.

Gershoni, J., and Palade, G. (1983). Protein blotting: Principles and applications, *Anal Biochem* 131, 1-15.

Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., and Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification, *Science* 293, 876-80.

Grunstein, J., Masbad, J. J., Hickey, R., Giordano, F., and Johnson, R. S. (2000). Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature, *Mol Cell Biol* 20, 7282-91.

Hamada, K., Oike, Y., Takakura, N., Ito, Y., Jussila, L., Dumont, D. J., Alitalo, K., and Suda, T. (2000). VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis, *Blood* 96, 3793-800.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer, *Cell* 100, 57-70.

Helenius, A., McCaslin, D., Fries, E., and Tanford, C. (1979). Properties of detergents, *Methods Enzymol* 56, 734-749.

Herold, G. (1999). *Innere Medizin (August-Haas-Straße 43, 50737 Köln, Herold, Gerd)*.

Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A., La Rosee, P., Lahaye, T., Berger, U., Cross, N. C., Linkesch, W., Druker, B. J., Hehlmann, R., *et al.* (2001). Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy, *Science* 293, 2163.

Holmgren, L., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression, *Nat Med* 1, 149-53.

Hussong, J. W., Rodgers, G. M., and Shami, P. J. (2000). Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia, *Blood* 95, 309-13.

Ikeda, H., Kanakura, Y., Tamaki, T., Kuriu, A., Kitayama, H., Ishikawa, J., Kanayama, Y., Yonezawa, T., Tarui, S., and Griffin, J. D. (1991). Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells, *Blood* 78, 2962-8.

Joensuu, H. (2002). Treatment of inoperable gastrointestinal stromal tumor (GIST) with Imatinib (Glivec, Gleevec), *Med Klin* 97, 28-30.

Karkkainen, M. J., and Petrova, T. V. (2000). Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Oncogene* 19, 5598-605.

Kato, H., and Schull, W. J. (1982). Studies of the mortality of A-bomb survivors. 7. Mortality, 1950-1978: Part I. Cancer mortality, *Radiat Res* 90, 395-432.

Katoh, O., Takahashi, T., Oguri, T., Kuramoto, K., Mihara, K., Kobayashi, M., Hirata, S., and Watanabe, H. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor, *Cancer Res* 58, 5565-9.

Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A., and Satow, Y. (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation, *Cancer Res* 55, 5687-92.

Kojima, S., Matsuyama, T., Sato, T., Horibe, K., Konishi, S., Tsuchida, M., Hayashi, Y., Kigasawa, H., Akiyama, Y., Okamura, J., and et al. (1990). Down's syndrome and acute leukemia in children: an analysis of phenotype by use of monoclonal antibodies and electron microscopic platelet peroxidase reaction, *Blood* 76, 2348-53.

Lämmler, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science* 246, 1306-9.

Licht, J. D. (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML, *Oncogene* 20, 5660-79.

Marx, J. (2001). Cancer research. Why some leukemia cells resist STI-571, *Science* 292, 2231-3.

Mesters, R. M., Padro, T., Bieker, R., Steins, M., Kreuter, M., Goner, M., Kelsey, S., Scigalla, P., Fiedler, W., Buchner, T., and Berdel, W. E. (2001). Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in a patient with refractory acute myeloid leukemia, *Blood* 98, 241-3.

Millauer, B., Longhi, M. P., Plate, K. H., Shawver, L. K., Risau, W., Ullrich, A., and Strawn, L. M. (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo, *Cancer Res* 56, 1615-20.

Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W., and Ullrich, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis, *Cell* 72, 835-46.

Miyamoto, T., Nagafuji, K., Harada, M., and Niho, Y. (1997). Significance of quantitative analysis of AML1/ETO transcripts in peripheral blood stem cells from t(8;21) acute myelogenous leukemia, *Leuk Lymphoma* 25, 69-75.

Moloney, W. C. (1987). Radiogenic leukemia revisited, *Blood* 70, 905-8.

Nehls, V., and Drenckhahn, D. (1995a). A microcarrier-based cocultivation system for the investigation of factors and cells involved in angiogenesis in three-dimensional fibrin matrices in vitro, *Histochem Cell Biol* 104, 459-66.

Nehls, V., and Drenckhahn, D. (1995b). A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis, *Microvasc Res* 50, 311-22.

Nicosia, R. F. (1998). What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis?, *Am J Pathol* 153, 11-6.

Nicosia, R. F., Nicosia, S. V., and Smith, M. (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro, *Am J Pathol* 145, 1023-9.

Padro, T., Ruiz, S., Bieker, R., Burger, H., Steins, M., Kienast, J., Buchner, T., Berdel, W. E., and Mesters, R. M. (2000). Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia, *Blood* 95, 2637-44.

Patel, T., Gores, G. J., and Kaufmann, S. H. (1996). The role of proteases during apoptosis, *Faseb J* 10, 587-97.

Pietsch, T., Kyas, U., Steffens, U., Yakisan, E., Hadam, M. R., Ludwig, W. D., Zsebo, K., and Welte, K. (1992). Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors, *Blood* 80, 1199-206.

Rak, J., Yu, J. L., Kerbel, R. S., and Coomber, B. L. (2002). What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors?, *Cancer Res* 62, 1931-4.

Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., Machalinski, B., Majka, M., Marlicz, W., Carter, A., Pietrkowski, Z., and Gewirtz, A. M. (1998). Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta-derived growth factor (PlGF) in regulating human haemopoietic cell growth, *Br J Haematol* 103, 969-79.

Raymakers, R., De Witte, T., Joziase, J., Van der Lely, N., Boezeman, J., and Haanen, C. (1991). In vitro growth pattern and differentiation predict for progression of myelodysplastic syndromes to acute nonlymphocytic leukaemia, *Br J Haematol* 78, 35-41.

Robinson, D. R., Wu, Y. M., and Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome, *Oncogene* 19, 5548-57.

Sawyers, C. L. (2001). Cancer treatment in the STI571 era: what will change?, *J Clin Oncol* 19, 13S-16S.

Sawyers, C. L. (2002). Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets, *Curr Opin Genet Dev* 12, 111-5.

Smolich, B. D., Yuen, H. A., West, K. A., Giles, F. J., Albitar, M., and Cherrington, J. M. (2001). The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts, *Blood* 97, 1413-21.

Sperling, C., Schwartz, S., Buchner, T., Thiel, E., and Ludwig, W. D. (1997). Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias, *Haematologica* 82, 617-21.

Spiekermann, K., Pau, M., Schwab, R., Schmieja, K., Franzrahe, S., and Hiddemann, W. (2002). Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells, *Exp Hematol* 30, 262-71.

Strawn, L. M., McMahon, G., App, H., Schreck, R., Kuchler, W. R., Longhi, M. P., Hui, T. H., Tang, C., Levitzki, A., Gazit, A., *et al.* (1996). Flk-1 as a target for tumor growth inhibition, *Cancer Res* 56, 3540-5.

Towbin, H., Staehlin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci* 76, 4350-4354.

Tuveson, D. A., Willis, N. A., Jacks, T., Griffin, J. D., Singer, S., Fletcher, C. D., Fletcher, J. A., and Demetri, G. D. (2001). STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications, *Oncogene* 20, 5054-8.

von Marschall, Z., Cramer, T., Hocker, M., Burde, R., Plath, T., Schirner, M., Heidenreich, R., Breier, G., Riecken, E. O., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2000). De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop, *Gastroenterology* 119, 1358-72.

Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis, *Annu Rev Med* 49, 407-24.

Zhao, S., Zoller, K., Masuko, M., Rojnuckarin, P., Yang, X. O., Parganas, E., Kaushansky, K., Ihle, J. N., Papayannopoulou, T., Willerford, D. M., *et al.* (2002). JAK2, complemented by a second signal from c-kit or flt-3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hemopoietic cells, *Embo J* 21, 2159-67.

Ziegler, B. L., Valtieri, M., Porada, G. A., De Maria, R., Muller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., *et al.* (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells, *Science* 285, 1553-8.

Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C., and *et al.* (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor, *Cell* 63, 213-24.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphates
BCR-ABL	Philadelphia Chromosom
BSA	Bovines Serumalbumin
CD31	PECAM-1; Adhäsionsmolekül
CML	Chronische Myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid Acid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECGS-2	Endothelial Cell Growth Supplement-2
ECL-K	Enhanced Chemiluminescence Kit
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetic Acid
EF1 α	Elongationsfactor 1 α
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FAB	French-American-British-Group
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescence Protein
GIST	Gastrointestinaler Stroma Tumor
H ₂ O	Aqua bidest
HMLEC	Humane Mikrovaskuläre Lungenendothelzellen
HMW	High Molecular Weight
HRPO	Horse Radish Peroxidase

HS	Humanserum
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
KIT	Stem Cell Receptor; SCF-Receptor; c-Kit; CD117
LMW	Low Molecular Weight
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHPCs	Multipotential Hematopoietic Prognitor Cells
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-Rezeptor	Platelet-Derived Endothelial-Cell Growth Factor Receptor
PGF	Platelet Growth Factor
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PTK	Proteintyrosinkinase
RFLP	Restriction Fragment Gene Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGF α	Tumor Growth Factor
TNF α	Tumor Nekrose Factor
VEGF	Vaskular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vaskular Endothelial Growth Factor Receptor-1
VEGFR-2	Vaskular Endothelial Growth Factor Receptor-2

7.2. Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen

Full-length Artikel Erstautorschaft:

Karsten Spiekermann[¶], Florian Faber[¶], Robert Voswinckel and Wolfgang Hiddemann, The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells, Exp Hematol. 2002 Jul; 30 (7):767-73 ([¶]These authors contributed equally to this work)

Full-length Artikel Koautorschaft:

Spiekermann K., Dirschinger RJ., Schwab R., Bagrintseva K., Faber F., Buske C., Schnittger S., Kelly LM., Gilliland DG., Hiddemann W., The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3, Blood, 15 February 2003, Vol. 101, No. 4, pp. 1494-1504

Abstracts und Kongressbeiträge Erstautorschaft:

F. Faber, M. Fiegl, W. Hiddemann, K. Spiekermann, Growth inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) producing Acute Myeloid Leukemia cell lines by the VEGF-receptor inhibitor SU5614, Onkologie, International Journal for Cancer Research and Treatment 2001; 24 (Suppl.6):4-4 (Abstract und oral presentation)

Florian Faber, Robert Voswinckel, Wolfgang Hiddemann and Karsten Spiekermann, The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells, Onkologie, International Journal for Cancer Research and Treatment 2002; 25 (Suppl.4):261-261 (Abstract und oral presentation)

Florian Faber, Michael Fiegl, Jan Braess, Wolfgang Hiddemann, Karsten Spiekermann, Growth inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) producing Acute Myeloid Leukemia cell lines by the VEGF-receptor inhibitor SU5614, Blood, November 16, 2001; Vol 98, N° 11: 326a-326a (Abstract und poster presentation)

Florian Faber, Robert Voswinckel, Wolfgang Hiddemann, and Karsten Spiekermann, The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells, ASCO Molecular Therapeutics Symposium, November 8-10, 2002; San Diego, California (Abstract und poster presentation)

7.3. Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Arbeit in der Medizinischen Klinik III an der Ludwig-Maximilians-Universität München Großhadern möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Karsten Spiekermann, der mich jederzeit ausgezeichnet betreute.

Ebenso möchte ich mich bei Ruth Schwab bedanken, die mir bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Dr. Matthias Clauss und Dr. Robert Voswinckel von dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung in Bad Nauheim möchte ich mich für die gelungene Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Keith Humphries am Terry Fox Laboratory des BC Cancer Research Center an der Universität von British Columbia, Kanada für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes.

Denn Mitarbeitern des Labors für Leukämiediagnostik der Ludwig-Maximilians-Universität München Großhadern möchte ich meinen Dank für die technische Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen aussprechen.

7.4. Curriculum vitae

Schulbildung

1982-1995 Rudolf Steiner Schule München-Schwabing; Gröbenzell
Juni 1995 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Sept.95-Okt.96 Krankenhaus München Bogenhausen in der zentralen
Operationsabteilung als Lagerungspfleger

Studium

Nov.1996 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1999 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0)
März 2001 1.Staatsexamen (Note: 2,0)
März 2003 2.Staatsexamen (Note: 1,6)
April 2004 3.Staatsexamen (Note: 1,0)

Promotion

Aug.00-Juli 02 Prof. Hiddemann, Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum
Großhadern in Zusammenarbeit mit dem „National Research
Center for Environment and Health“ (GSF)

Thema: Die Bedeutung der Rezeptortyrosinkinasen KIT und
VEGFR-2 in der Pathogenese der akuten myeloischen
Leukämie

Aug.2001 Forschungsaufenthalt im Max-Planck-Institut für Physiologie
und Zellbiologie in Bad Nauheim

Vorträge und Poster

Okt.01 und Okt.02 Wissenschaftliche Vorträge auf der Jahrestagung der
Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie
und Onkologie (DGHO) in Mannheim2001 und in München
2002

Dez.2001 Posterpräsentation auf dem Weltkongress der American
Society of Hematology (ASH) in Orlando, Florida

Nov. 2002 Posterpräsentation auf ASCO´s Molecular Therapeutics
Symposium in San Diego, Kalifornien

Stipendien

Juli 1999	Oskar-Karl-Forster-Stipendium
März 02-Juli 02	Boehringer Ingelheim Fonds Stipendium für einen Forschungsaufenthalt (Gentherapie von hämatopoetischen Stammzellen mit Hilfe eines modifizierten HIV) am Terry Fox Laboratory bei Prof. Keith Humphries an der Universität von British Columbia, Kanada
Nov. 02	Merit Award Stipendium von der American Society of Clinical Oncology (ASCO)

Praktische Tätigkeiten

Aug.98-Jan.99	Krankenhaus München Bogenhausen (internistische Notaufnahme)
seit Juli 1999	Anstellung bei der Deutschen Stiftung Organtransplantation im Organperfusionsdienst
seit Nov.2000	Übernahme der Leitung über die studentischen Mitarbeiter des Organperfusionsdienstes der Deutschen Stiftung Organtransplantation
April 03-März 04	Praktisches Jahr: Innere Medizin (Klinikum Großhadern), Chirurgie (Universitätsklinikum Bern, Schweiz), Radiologie und Nuklearmedizin (Klinikum Großhadern)

Sonstige Erfahrungen und Kenntnisse

ehemaliges Mitglied im Jugendorchester des Richard Strauß Konservatoriums

Englisch und Französisch in Wort und Schrift, Sehr gute EDV-Kenntnisse

Hobbys:

Geigespielen, Skifahren, Segeln