

**Untersuchungen zur Signaltransduktion in Zelllinien der Akuten
Myeloischen Leukämie mit Mutationen der Rezeptortyrosinkinase
FLT3**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Rouven Müller,
geboren am 11. Mai 1979 in Stuttgart**

Jena, 31.07.2007

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Dritter Gutachter:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungsverzeichnis:

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
abl	Abl-Tyrosinkinase
AML	Akute Myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATRA	all trans retinoic acid
B-ALL	Akute Lymphatische Leukämie der B-Zell-Reihe
bcr	breakpoint cluster region
BIR	baculovirus-IAP-repeat-Domäne
BSA	bovine serum albumine
CBF	Core binding factor
C/EBP α	CCAAT-enhancer-binding protein-alpha
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CSF1-R	colony stimulating factor 1 receptor
D-65476	FLT3-Inhibitor
ddH ₂ O	double distilled H ₂ O
DFS	disease free survival (krankheitsfreies Überleben)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EFS	event free survival (ereignisfreies Überleben)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
F _c	fragment constant (konstantes Fragment eines Antikörpers)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	FLT3-Ligand
FLK-2	fetal liver tyrosine kinase 2
FLT3	fms-like-tyrosine kinase 3
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GITC	Guanidin-Isothiocyanat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HL-60	AML-Zelllinie
HRP	horse radish peroxidase
IAP	inhibitor of apoptosis
IP	Immunpräzipitation
IOD	intermediate optical density
ITD	Interne Tandemduplikation
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase
MLL	mixed lineage leukemia
MMLV	moloney murine leukemia virus
MOLM-13	AML-Zelllinie
MONO-MAC-6	AML-Zelllinie
MP	Milchpulver
MV4-11	AML-Zelllinie
MW	molecular weight
OS	overall survival (Gesamtüberleben)

PBS	Phospho buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF-R α/β	platelet derived growth factor receptor α/β (Plättchenwachstumsfaktor α/β)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PI	Propidiumiodid
PLP	Proteinlysepuffer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
STAT	signal transducer and activator of transcription
STK-1	stem cell tyrosine kinase 1
Tab.	Tabelle
T-ALL	Akute Lymphatische Leukämie der T-Zell-Reihe
TD	Tandem-Duplikation
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THP-1	AML-Zelllinie
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TWEEN 20	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot

1. Zusammenfassung

2. Einleitung

- 2.1. Die Rezeptortyrosinkinase FLT3
- 2.2. FLT3-Expression in Leukämien
- 2.3. FLT3-Mutationen und ihr Vorkommen in Leukämien
- 2.4. Assoziation von FLT3-Mutationen mit anderen zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen
- 2.5. Prognostische Bedeutung der FLT3-Mutationen
- 2.6. Signaltransduktion in AML-Zelllinien in Abhängigkeit vom FLT3-Mutationsstatus
- 2.7. FLT3-Inhibitoren

3. Aufgabenstellung

4. Materialien und Methoden

A Materialien

B Methoden

- 4.1. Beschreibung der Zelllinien
- 4.2. Zellkultur und Zellzahlbestimmung
- 4.3. Durchflußzytometrie (FACS)
 - 4.3.1. Analyse von Zelloberflächenmarkern
 - 4.3.2. Zellzyklus-Analyse
 - 4.3.3. Annexin V/PI-Apoptose-Assay
 - 4.3.4. CFSE-Proliferations-Assay
- 4.4. Proteinbiochemie
 - 4.4.1. Proteinisolierung
 - 4.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung
 - 4.4.3. Probenvorbereitung für Western Blots
 - 4.4.4. SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
 - 4.4.5. Western Blot
 - 4.4.6. Immunpräzipitation von FLT3
- 4.5. Molekularbiologie
 - 4.5.1. RNA-Isolierung
 - 4.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration
 - 4.5.3. cDNA-Synthese
 - 4.5.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.5.5. Agarose-Gelelektrophorese

5. Ergebnisse

- 5.1. FLT3-Expression und –Phosphorylierung in Abhängigkeit von FL und D-65476
- 5.2. Interaktion von FLT3 und nachgeschalteten Signalmolekülen in Abhängigkeit von FL und D-65476
- 5.3. Einfluß von ATRA, G-CSF und D-65476 auf Zelldifferenzierung, Zellzyklusverteilung, Apoptose und Proliferationsverhalten
 - 5.3.1. Zelldifferenzierung
 - 5.3.2. Zellzyklusverteilung
 - 5.3.3. Apoptose
 - 5.3.4. Proliferation
- 5.4. Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PU.1 in Abhängigkeit von ATRA, G-CSF und D-65476
- 5.5. Phosphorylierung von Akt (Ser473) in Abhängigkeit von ATRA, FL und D-65476
- 5.6. Expression von Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S und Bax in Abhängigkeit von ATRA und D-65476
- 5.7. Expression von Survivin, Livin und XIAP in Abhängigkeit von ATRA, G-CSF und D-65476
- 5.8. Kinetik der Survivinexpression in MV4-11 und MOLM-13 in Abhängigkeit von ATRA und D-65476
- 5.9. Untersuchung auf zellzyklusabhängige Regulation von Survivin in MOLM-13 und MV4-11

6. Diskussion

7. Literaturangaben

Anhang:

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden von Leukämiepatienten abgeleitete permanente Zelllinien mit Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 untersucht. Dabei handelte es sich um die Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 mit einer internen Tandemduplikation (FLT3-ITD) sowie die Zelllinie MONO-MAC-6 mit einer Punktmutation in der juxtamembranären Domäne der Rezeptortyrosinkinase. Als biologische Kontrolle wurde die Zelllinie THP-1 untersucht, eine Zelllinie mit FLT3-Wildtyp-Expression. Bei allen vier Zelllinien handelt es sich um Zellen des morphologischen FAB-Subtyps M5.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich Signaltransduktion, Zellzyklusverteilung, Differenzierungsinduktion sowie Apoptose- und Proliferationsverhalten nach vorangehender Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor D-65476 sowie den beiden Substanzen All-trans-Retinsäure (ATRA) und G-CSF.

Mittels durchflußzytometrischer Oberflächenanalyse sowie Immunoblot konnte die FLT3-Expression auf den untersuchten Zelllinien verifiziert werden.

Nach Immunpräzipitation wurde die Phosphorylierung von FLT3 näher untersucht. Während die Zelllinie THP-1 erst nach Stimulation mit dem FLT3-Liganden (FL) eine FLT3-Phosphorylierung zeigte, bestand in den Zelllinien MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6 bereits eine konstitutive Ruhephosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase. In allen untersuchten Zelllinien war die Phosphorylierung konzentrationsabhängig durch D-65476 inhibierbar.

Mittels durchflußzytometrischer Detektion des mit myeloischer Differenzierung assoziierten Markers CD11b konnte in THP-1 eine ATRA-abhängige Expression gezeigt und auf eine ATRA-abhängige Differenzierungsinduktion geschlossen werden. In den FLT3-Mutationstragenden Zelllinien konnte keine ATRA-vermittelte Differenzierung nachgewiesen werden.

In Zellzyklusanalysen zeigte sich in THP-1 eine ATRA-abhängige Verschiebung in Richtung G₁-Phase, wobei in MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6 der Inhibitor D-65476 eine Abnahme des S/G₂/M-Anteils induzierte, in MOLM-13 konnte ATRA diese Reduktion signifikant erhöhen.

Hinsichtlich der Induktion von Apoptose konnten ähnliche Befunde erhoben werden. In THP-1 hatte wiederum nur ATRA eine apoptoseinduzierende Wirkung. In den FLT3-mutierten Zelllinien konnte D-65476 Apoptose induzieren. Besonders in MOLM-13 wurde dies durch ATRA noch verstärkt.

In dem auf CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester) -basierenden Proliferations-Assay konnte ATRA in THP-1 eine moderate Abnahme der Proliferation bewirken. In MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6 sank die Proliferationsaktivität durch D-65476, was durch ATRA signifikant verstärkt wurde.

Der Frage nachgehend, ob ATRA-vermittelte Effekte auf Apoptose und Proliferation durch Akt hervorgerufen werden, wurden Western Blots gegen Phospho-Akt angefertigt. Dabei führte die Vorinkubation der Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 mit ATRA nicht zu einer veränderten Akt-Phosphorylierung.

In RT-PCR-Untersuchungen und Western Blots zur Detektion von Vertretern der IAP (inhibitors of apoptosis)-Proteinfamilie konnte für Survivin eine D-65476- und ATRA-abhängige Suppression der Transkription und Expression in den Zelllinien mit FLT3-Mutation gezeigt werden. Livin und XIAP blieben in ihrer Expression von einer D-65476- oder ATRA-Inkubation unbeeinflusst. Die Untersuchung der Survivin-Expression im Verlauf von 48 h Inkubation mit D-65476 und ATRA konnte demonstrieren, dass die D-65476/ATRA-vermittelte Downregulation von Survivin in MOLM-13 und MV4-11 frühestens nach 24 h auftritt und somit eher mit einem veränderten Transkriptionsprogramm der Zelle mit der Notwendigkeit der Neusynthese von Proteinen als mit einer kurzfristigen Veränderung – beispielsweise einem verstärkten Abbau der Survivin mRNA – zu erklären ist.

Da für Survivin eine zellzyklusabhängige Expression beschrieben wurde, stellte sich die Frage ob die verminderte Expression sekundäre Folge einer Verschiebung des Zellzyklus darstellt oder ob eine primäre Expressionsänderung zu verstärkter Apoptose und Zellzyklusarrest führt. Mit Hilfe der Substanzen L-Mimosine und Nocodazole konnten Zellzyklusverschiebungen induziert werden, die tatsächlich von einer Survivin-Expressionsänderung begleitet wurden. Jedoch wurde durch die Substanzen ebenfalls Apoptose induziert, so daß auch hier nicht zwischen Ursache und Begleitphänomen differenziert werden konnte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der Rezeptortyrosinkinase FLT3 auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung in den genannten Modellsystemen gezeigt werden. Durch die Hemmung von FLT3 mittels des Inhibitors D-65476 konnte die Proliferation der untersuchten Zelllinien gehemmt, Apoptose induziert und begleitend eine Zellzyklusumverteilung beobachtet werden. ATRA konnte insbesondere in den Zelllinien mit FLT3-ITD-Mutation die Apoptoserate signifikant steigern. So erscheint es vielversprechend, konventionelle Chemotherapieregime durch derartige Substanzen zu ergänzen.

2. Einleitung:

2.1. Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

Die FLT3 (fms like tyrosine kinase 3)-Rezeptortyrosinkinase, auch als STK-1 (stem cell tyrosine kinase 1), FLK-2 (fetal liver tyrosine kinase 2) oder CD135-Antigen bezeichnet, gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen der Gruppe III.

Die Rezeptortyrosinkinasen dieser Gruppe, zu denen auch die Rezeptoren für den Plättchenwachstumsfaktor PDGFR α und β , der Kolonie stimulierenden Faktor 1-Rezeptor CSF1-R sowie der Rezeptor für den Stammzellwachstumsfaktor c-kit zählen, zeichnen sich durch einen ähnlichen strukturellen Aufbau sowie Aminosäuresequenzhomologien aus. So lassen sich als gemeinsame Strukturmerkmale das Vorkommen von fünf extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig), einer Transmembrandomäne, einer intrazellulären juxtamembranen Domäne (JM) sowie zweier Tyrosinkinasedomänen anführen (TK 1 und 2; siehe Abb.1; Agnes et al. 1994).

Das Gen für FLT3 findet sich auf Chromosom 13q12 und besteht aus 24 Exons (Rosnet et al. 1991). Transkription und Translation dieses Gens führen zu der aus 993 Aminosäuren bestehenden funktionsfähigen FLT3-Rezeptortyrosinkinase mit einem Molekulargewicht der nicht glykosylierten Form von 130 kDa, sowie von 160 kDa der glykosylierten Variante. Die Aminosäurepositionen 572 bis 603 repräsentieren die juxtamembrane Region, während die beiden Tyrosinkinasedomänen durch die Aminosäuren 604 bis 958 gebildet werden.

Die stärkste Expression von FLT3 ist auf hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks, im Thymus sowie in Lymphknoten zu finden. Es exprimieren jedoch auch Gonaden, Plazenta, das Klein- sowie das Großhirn FLT3 (Rosnet et al. 1993).

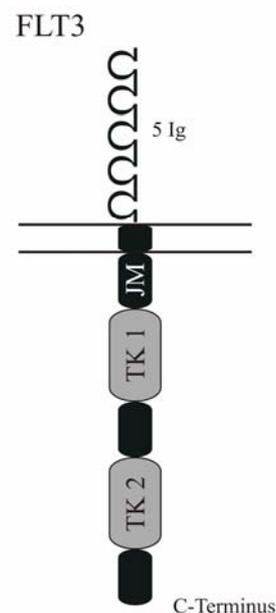


Abb.1: Struktur von FLT3: *Ig* Immunglobulinähnliche Domäne, *JM* juxtamembrane Region, *TK1/2* Tyrosinkinase-Domäne 1/2

Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase setzt die Bindung ihres Liganden FL (FLT3-Ligand) voraus. FL ist ein Typ 1 Transmembranprotein, das als lösliche Form freigesetzt werden kann (Lyman et al. 1995).

FL wird im Knochenmark sowohl in Knochenmarksfibroblasten des Stromas (Lisovsky et al. 1996) als auch in myeloischen und lymphatischen Zellen exprimiert (Brasel et al. 1995). Sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form von FL kann FLT3 aktivieren. Ähnlich dem Liganden für c-Kit ist es dem FL alleine jedoch nicht möglich, die Proliferation myeloischer und lymphatischer Zellen zu induzieren, bei Kombination wird jedoch ein starker Synergismus mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Interleukinen beobachtet (Lyman et al. 1998). FL ist ein Wachstumsfaktor für unreife myeloische Zellen und kann die Proliferation CD34 positiver Zellen anregen (Rusten et al. 1996).

Darüberhinaus spielt FL eine bedeutende Rolle im Immunsystem. So führt die gezielte Zerstörung des FL-Gens zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems, Reduktion der Anzahl myeloischer Vorläuferzellen, Reduktion von B-Zell-Vorläufern, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen (McKenna et al. 2000). Diese Eigenschaften weisen auf eine tumorsupprimierende Funktion, unter anderem durch Förderung der Antigenpräsentation der dendritischen Zellen, hin. Verschiedene Modellsysteme, beispielsweise für das maligne Melanom (B16 und CL8-1) und maligne Lymphome (EL-4) in der Maus, haben dies bereits gezeigt (Esche et al. 1998).

Bei der Akuten Myeloischen Leukämien (AML) scheint jedoch Gegenteiliges der Fall zu sein. So führt die Stimulation von FLT3 durch seinen Liganden zur Proliferation leukämischer Blasten (Minden et al. 1996). Ferner zeigt sich bei Applikation von FL eine antiapoptotische Wirkung auf AML-Zellen und myeloische Zelllinien (Drexler et al. 1999).

2.2. FLT3-Expression in Leukämien

FLT3 wird in 90-100% der Fälle auf den Zellen akuter Leukämien exprimiert (AML, B-ALL, T-ALL) (Drexler 1996).

Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zeigen sich abhängig von der Phase der Erkrankung Unterschiede. So ist in Zellen der chronischen Phase keine FLT3-Expression nachweisbar, während in der Phase der Akzeleration in 2 von 7 untersuchten Fällen und im Blastenschub in 12 von 16 Fällen FLT3 nachweisbar ist (Birg et al. 1992).

Entsprechend konnte auch in Leukämiezelllinien eine FLT3-Expression gezeigt werden. Während in prä-B-Leukämiezelllinien in 90% der Fälle FLT3 detektierbar ist, ist in Untersuchungen myeloischer Linien in 40 –80 % der Fälle eine FLT3-Expression zu finden (Drexler 1996).

2.3. FLT3-Mutationen und ihr Vorkommen in Leukämien

1996 wurden erstmals Mutationen in der juxtamembranen Domäne der FLT3-Rezeptortyrosinkinase nachgewiesen (Nakao et al. 1996). Dabei handelt es sich um interne Tandemduplikationen (ITD) von Teilen der FLT3-Sequenz. Die Länge der duplizierten Sequenz beträgt bis zu 400 Basenpaare (Schnittger et al. 2002) und befindet sich meist in der Nähe der Position 590-600 der Aminosäuresequenz (entsprechend Exon 14-15). Mitunter finden sich zu Beginn der Duplikationen noch zusätzliche Baseninsertionen, das Leseraster und damit die exakte Transkription nach der Insertion bleiben jedoch erhalten. Neben den internen Tandemduplikationen zeigt Exon 14 Punktmutationen, die in Aminosäuresubstitutionen resultieren. Beispiele hierfür sind die Substitution von Valin durch Alanin in Position 579 und 592 (V579A und V592A), sowie Mutationen, die zur Substitution von Phenylalanin und Tyrosin in Position 590-591 zu Glycin und Aspartat führen (FY590-591GD) (Stirewalt et al. 2004).

Auch in der ersten Tyrosinkinasedomäne, genauer im codierenden Exon 16 wurde eine Punktmutation mit Substitution von Alanin in Position 680 zu Valin nachgewiesen (Piccaluga et al. 2003). Weiterführende Untersuchungen, ob auch hier eine konstitutive Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase die Folge ist, wurden bisher noch nicht publiziert.

Desweiteren finden sich Mutationen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne in den codierenden Regionen für die Aminosäurepositionen 835 und 836 in Exon 20 (Yamamoto et al. 2001, Abu-Duhier et al. 2001). Diese Mutationen führen zu Aminosäuresubstitutionen, in Position 835 von ursprünglich Aspartat zu Tyrosin (D835Y), Histidin (D835H), Valin (D835V), Glutamat (D835E) oder Asparagin (D835N), in Position 836 von ursprünglich Isoleucin zu Methionin (I836M) bzw. zur Deletion von Isoleucin in Position 836 und resultieren in der konstitutiven Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase.

Spiekermann et al. berichteten 2002 von einer 6 bp-Insertion in Exon 20, mit Insertion von Glycin und Serin an Position 840 (840GS) der Aminosäuresequenz.

FLT-Mutationen	FLT3-Aktivierung	Häufigkeit	Erstbeschreibung
ITD	+	20-25 %	Nakao et al. 1996
D835Y, D835H, D835V, D835E, D835N, I836M, I836del	+	7 %	Yamamoto et al. 2001, Abu-Duhier et al. 2001
840GS	+	<1 %	Spiekermann et al. 2002
N841I	+	nicht untersucht	Jiang et al. 2004
Y842C	+	ca. 2%	Kindler et al. 2004
A680V	nicht untersucht	nicht untersucht	Piccaluga et al. 2003
V592A	+	< 1 %	Spiekermann et al. 2003 Stirewalt et al. 2004
FY590-591GD, V592A, V579A	nicht untersucht	2 %	Stirewalt et al. 2004

Tab. 1: FLT3-Mutationen, konstitutive Aktivierung, Häufigkeit und Erstbeschreibung

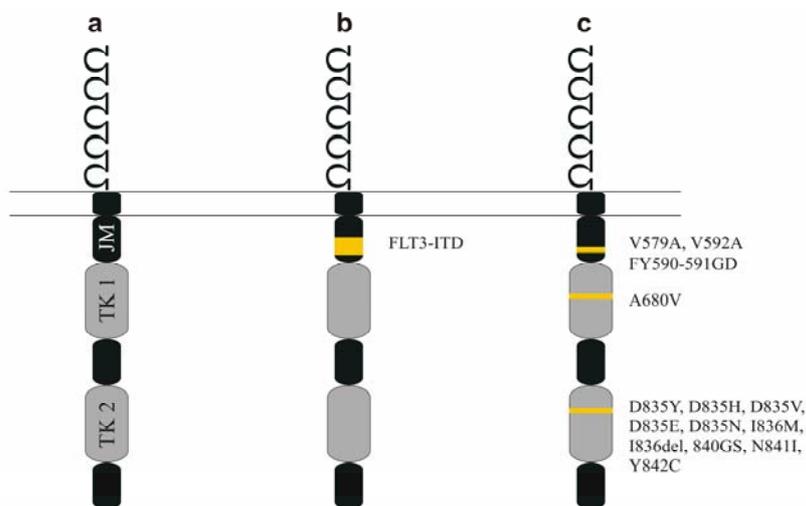


Abb. 2: FLT3-Wildtyp und FLT3-Mutationen: **a** FLT3-Wildtyp; **b** FLT3-ITD; **c** FLT3-Punktmutationen
Schematische Darstellung der Rezeptortyrosinkinase mit ihren fünf extrazellulären immunglobulinähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne sowie intrazellulär der juxtamembranen Region sowie zweier Tyrosinkinasedomänen. Farblich hervorgehoben ist die Lokalisation der verschiedenen Mutationen. *JM* juxtamembrane Region, *TK1/2* Tyrosinkinase-Domäne 1/2

Ferner wurden erst kürzlich von Jiang et al. 2004 eine Punktmutation, die zum Austausch von Asparagin zu Isoleucin in Position 841, sowie von Kindler et al. 2004 eine Punktmutation die zum Austausch von Tyrosin zu Cystein in Position 842 führt, beschrieben. Beide resultieren in der konstitutiven Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase.

Nachdem 1996 erstmals FLT3-ITD-Mutationen in mRNA-Proben erwachsener AML-Patienten und in ALL-Proben von Kindern nachgewiesen wurden (Nakao et al. 1996), haben zahlreiche Studien die Inzidenz dieser Mutationen in verschiedenen Patientenkollektiven untersucht.

In Studien an erwachsenen Patienten mit AML fand sich eine Prävalenz bis zu 27% (Kottaridis et al. 2001) und somit galten FLT3-ITD-Mutationen zunächst als die häufigsten Mutationen in Akuten Myeloischen Leukämien.

Im Jahr 2005 berichteten verschiedene Gruppen über Mutationen in Exon 12 des Nucleophosmin-Gens (NPM1-Mutationen). Eine Arbeit von Falini et al. 2005 konnte in 35,2% aller AML NPM1-Mutationen zeigen. Betrachtet man die Subgruppe mit normalem Karyotyp konnten in 52,9% der AML mit normalem Karyotyp NPM1-Mutationen detektiert werden (Schnittger et al. 2005). Die Mutationen führen zum Austausch von Tryptophan in Aminosäureposition 288 oder 290 des C-Terminus des translatierten Proteins. Folge dieser Mutationen ist die zytoplasmatische Lokalisation des sonst als Wildtyp im Zellkern lokalisierten Proteins.

Patienten mit Mutationen im NPM1-Gen zeigen, wenn nicht mit FLT3-ITD-Mutationen assoziiert, eine günstige Prognose mit einer höheren Rate an kompletten Remissionen sowie einem signifikant erhöhten Gesamtüberleben. Aktuell gelten Mutationen im Nucleophosmin-Gen als die am häufigsten beobachteten Mutationen in Akuten Myeloischen Leukämien.

Betrachtet man die Häufigkeit von FLT3-ITD-Mutationen unter den morphologischen Gesichtspunkten der Einteilung nach der French-American-British-Klassifikation oder hinsichtlich zytogenetischer Aberrationen angelehnt an die WHO-Klassifikation, zeigen sich folgende Unterschiede:

Neben einer hohen Prävalenz an FLT3-ITD-Mutationen in der Gruppe mit normalem Karyotyp von 34,2% (Kottaridis et al. 2001) findet sich eine hohe Assoziation zwischen FLT3-ITD-Expression und dem FAB M3-Subtyp (37% FLT3-ITD-Mutationen in einem Kollektiv von 90 AML M3 Patienten) (Noguera et al. 2002). Auch in der Subgruppe FAB M5b findet sich ein gehäuftes Auftreten von FLT3-ITD-Mutationen (34,4% der Fälle) (Schnittger et al. 2002), während in den FAB-Subtypen M2, M6, M7 eine niedrige Prävalenz festzustellen ist (Schnittger et al. 2002, Thiede et al. 2002).

Bei Kindern mit AML werden durchweg niedrigere Prävalenzen der FLT3-ITD-Mutationen mit Werten zwischen 5,3% (Iwai et al. 1999) und 16,5% (Meshinchi et al. 2001) berichtet.

Mutationen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne (TKD) von FLT3 wurden erstmals 2001 von Abu-Duhier et al. beschrieben. Mit einer Häufigkeit von 7,7 % bei Erwachsenen mit AML (Thiede et al. 2002) sind FLT3-TKD-Mutationen deutlich seltener als FLT3-ITD-Mutationen. FLT3-TKD-Mutationen treten darüber hinaus vereinzelt bei Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie (2,8%) und Myelodysplastischem Syndrom (3,4%) auf (Yamamoto et al. 2001).

Permanente Zelllinien, die durch Kultivierung von AML-Zellen bei Diagnosestellung etabliert wurden, bieten die Möglichkeit, die Auswirkungen der FLT3-Mutationen auf Signaltransduktion und Zellbiologie in vitro zu untersuchen.

Betrachtet man den Anteil FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutation-exprimierender AML-Zellen bei Erstdiagnose ist bei Untersuchung von aus Patientenproben abgeleiteten AML-Zelllinien von einer hohen Zahl mutationstragender Zelllinien auszugehen.

Eine 2003 von Quentmeier et al. publizierte Studie erbrachte jedoch nach Screening von 69 AML-Zelllinien lediglich vier FLT3-ITD-positive Zelllinien. Hierbei exprimierten zwei Zelllinien (MUTZ 11 und MV4-11) das mutierte Allel homozygot, während die anderen beiden (MOLM-13 und PL-21) sowohl die mutierte als auch die Wildtyp-Variante des FLT3-Gens heterozygot exprimierten. Die Zelllinie MUTZ-11 wächst trotz homozygoter Rezeptormutation streng zytokinabhängig, eine mögliche Erklärung ist das geringe Expressionslevel des Rezeptores auf der Zelloberfläche. So bleibt laut Quentmeier et al. die Zelllinie MV4-11 als einzige Zelllinie mit homozygoter Mutationsexpression, die die konstitutiv aktive FLT3-Rezeptortyrosinkinase in relevanten Mengen auf der Zelloberfläche exprimiert. Eine FLT3-TKD-Mutation-tragende Zelllinie konnte in dieser Untersuchung nicht gefunden werden.

2004 wurden von Taketani et al. jedoch die zwei Zelllinien KOCL-33 und KOCL-48 mit FLT3-TKD-Mutation beschrieben. Bei KOCL-33 handelt es sich um eine ALL-Zelllinie, während KOCL-48 von einer AML abgeleitet wurde.

Zelllinien mit Mutationen, die zum Aminosäuretausch in Position 592 der FLT3-Rezeptortyrosinkinase führen, wurden erstmals von Spiekermann et al. 2003 identifiziert. Hierbei handelt es sich um die Zelllinien MONO-MAC-1 und MONO-MAC-6, die beide die Mutation V592A tragen.

2.4. Assoziation von FLT3-Mutationen mit anderen zytogenetischen sowie molekulargenetischen Aberrationen

Wie oben bereits erwähnt wird bei Patienten mit AML Subtyp FAB M3 ein gehäuftes Auftreten von FLT3-ITD-Mutationen beobachtet. Im Besonderen findet sich eine Assoziation mit M3-Varianten, die hohe Leukozytenzahlen und die kurze BCR3-Isoform des Translokationsproduktes PML/RAR α zeigen (Noguera et al. 2002).

Auch Thiede et al. fanden 2002 eine Assoziation von FLT3-ITD-Mutationen und der Translokation t(15;17), die für das Fusionsprotein PML/RAR α kodiert. Sie beobachteten eine Inzidenz von 31% an FLT3-ITD-Mutationen in dieser Subgruppe.

Darüberhinaus konnten sie in 90 % der untersuchten Patienten mit t(6;9)-Translokation eine FLT3-ITD-Mutation nachweisen. Die t(6;9)-Translokation kodiert für das Fusionsprotein DEK-CAN und ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Soekarman et al. 1992).

Eine signifikant niedrigere Prävalenz findet sich in den als prognostisch günstig geltenden Leukämien mit Core binding factor (CBF)-Translokationen. In dieser Subgruppe, zytogenetisch durch die Translokation t(8;21) oder eine Inversion im Chromosom 16 repräsentiert, zeigt sich eine Prävalenz von 5,4 % (Schnittger et al. 2002). Ob nun die gute Prognose dieser Subgruppe auf seltene FLT3-Mutationen oder auf das Vorhandensein der CBF-Translokationen zurückzuführen ist, ist nicht geklärt.

C/EBP α -Mutationen, die bei normalem Karyotyp als prognostisch günstige Mutationen einzustufen sind (Frohling et al. 2004), zeigten in einer Untersuchung von Preudhomme et al. 2002 keine Assoziation mit FLT3-ITD-Mutationen.

Betrachtet man einen möglichen Zusammenhang zwischen FLT3-ITD-Mutationen und Mutationen im Mixed lineage leukemia (MLL)-Gen findet sich eine kontroverse Datenlage in der Literatur. Während Frohling et al. 2002 keine Unterschiede im FLT3-Mutationsstatus von MLL-Tandemduplikation (TD)-positiven und -negativen Patienten nachweisen konnten, so beschreiben Libura et al. 2003 in 50 % aller MLL-TD-positiven Patienten eine FLT3-ITD-Mutation, jedoch nur in 15% der Patienten mit MLL-Translokation. Steudel et al. konnten 2002 in 33 % aller MLL-TD-positiven Patienten eine FLT3-Mutation nachweisen.

2.5. Prognostische Bedeutung der FLT3-Mutationen

FLT3-ITD-Mutationen stellen einen unabhängigen prognostischen Faktor bei Erwachsenen mit AML dar.

In einer von Kottaridis et al. 2001 publizierten Studie an 854 Patienten im Rahmen der United Kingdom Medical Research Council AML 10 und 12 Trials, wiesen 231 Patienten (entsprechend 27%) eine FLT3-ITD-Mutation auf. Bei diesen Patienten war das Vorkommen einer FLT3-ITD-Mutation vergesellschaftet mit höheren Leukozyten- und Blastenzahlen ($p < 0,001$), mit geringeren Remissionsraten ($p = 0,05$), einem verminderten krankheitsfreiem Überleben ($p < 0,001$), reduziertem ereignisfreiem Überleben ($p < 0,001$) und einem vermindertem Gesamtüberleben ($p < 0,001$).

Bei Kindern mit AML zeigen sich ähnliche Verhältnisse. In einer Studie mit 91 Patienten im Rahmen der Children's Cooperative Group (CCG) zeigten 17% eine FLT3-ITD-Mutation. Betrachtet man die Remissionsraten, gelang in der FLT3-ITD-positiven Gruppe eine Remissionsinduktion in 40 % der Fälle, während in der FLT3-ITD-negativen Gruppe in 73 % eine Remission induziert werden konnte. Vergleicht man das Gesamtüberleben nach 8 Jahren, so lag dies in der Gruppe mit FLT3-ITD-Mutation bei 13%, in der Gruppe ohne FLT3-ITD-Mutation bei 50 % ($p = 0,02$) (Meshinchi et al. 2001).

Was die prognostische Bedeutung von FLT3-TKD-Mutationen anbetrifft, haben Studien von Frohling et al. 2002 keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben bei Vergleich von FLT3-TKD-Mutationen mit FLT3-Wildtyp gezeigt ($p = 0,63$). Thiede et al. konnten 2002 ein statistisch signifikant vermindertes Gesamtüberleben ($p = 0,015$) nur in einer Subgruppe von jüngeren Patienten (<60 Jahre) mit Zuordnung zur intermediären zytogenetischen Risikogruppe zeigen.

2.6. Signaltransduktion in AML-Zelllinien in Abhängigkeit vom FLT3-Mutationsstatus

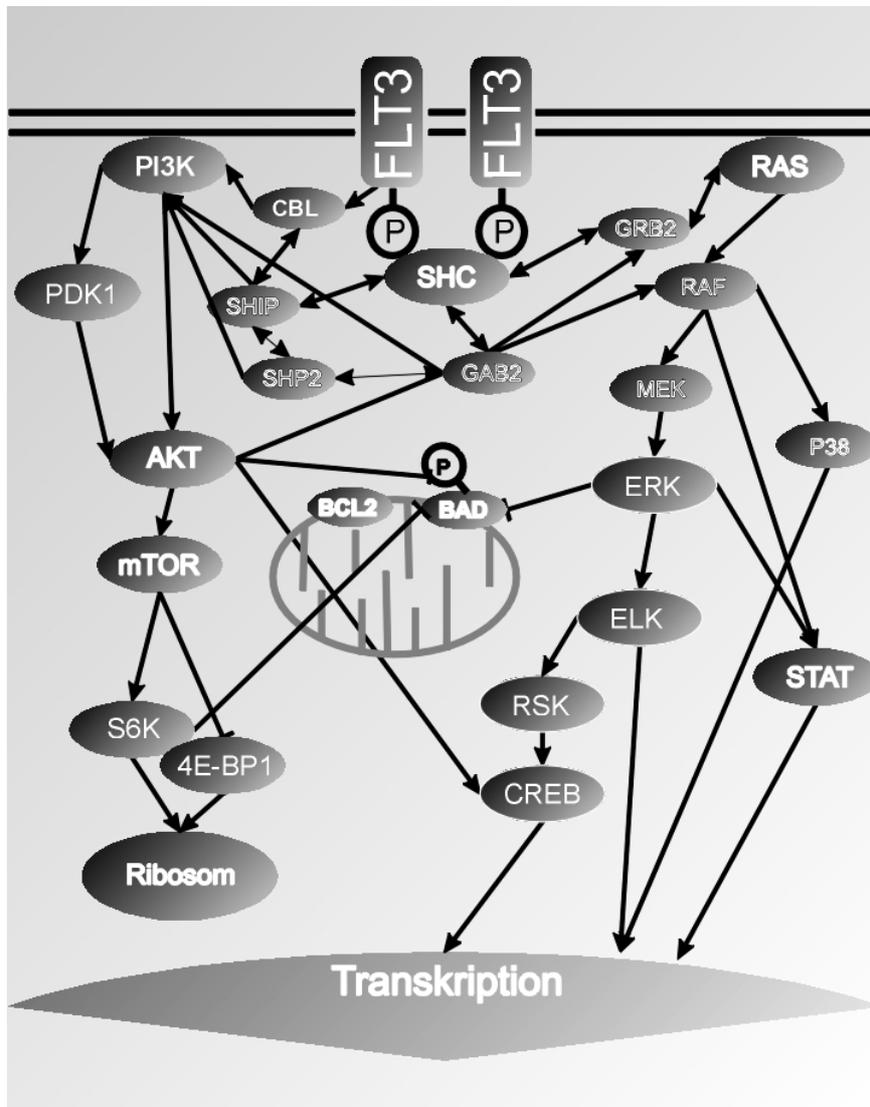


Abb. 3: FLT3-Signaltransduktion: Bindung von FL führt zu Aktivierung des PI3-Kinase- und RAS-Signalweges via **SHC** (SH2-domain containing proteins). Weiter sind **SHIP** (SH2-domain-containing-protein-phosphatase), **SHP2** (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2), **CBL** (ein Protoonkogen), **GAB2** (GRB2-bindendes Protein) involviert. Aktivierte PI3-Kinase stimuliert **PDK1** (3-phosphoinositid-dependent protein kinase 1), **AKT** und **mTOR** (mammalian target of rapamycin), womit die Transkription und Translation entscheidender Regulatorgene über **S6K** (p70S6-Kinase)-Aktivierung und Hemmung des **4E-BP1** (eukaryotischen Initiierungsfaktor 4E-bindenden Proteins) reguliert wird. PI3Kinase-Aktivierung blockiert darüberhinaus Apoptose durch **BAD**-Phosphorylierung. FLT3 kann über **GRB2** **RAS** aktivieren. Dieses stimuliert nachgeschaltete Effektorproteine wie **RAF**, **MEK**, **ERK**, **RSK**. Diese aktivieren wiederum **CREB** (cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein), **ELK** und **STAT**-Moleküle (signal transducer and activators of transcription), die ihrerseits die Transkription proliferationsassoziierter Gene induzieren (Stirewalt et Radich 2003).

Abb. 3 zeigt der FLT3-Rezeptortyrosinkinase nachgeschaltete Signalwege. Wie bereits anfangs beschrieben handelt es sich bei FLT3 um eine Rezeptortyrosinkinase der Gruppe III. Eine Aktivierung der Wildtyp-Rezeptortyrosinkinase durch ihren endogenen Liganden FL führt zu Rezeptordimerisierung, Autophosphorylierung in trans-Position, Phosphorylierung intrazellulärer Substrate sowie letztendlich zur Rezeptorinternalisierung.

Untersuchungen an mit einer FLT3-ITD-Mutation transfizierten Cos7-Zellen zeigten eine vom Liganden FL unabhängige Rezeptordimerisierung und Phosphorylierung (Kiyoi et al. 1998).

In der Zelllinie Ba/F3, bei der es sich um eine Interleukin-3 abhängige B-Vorläufer-Zelllinie der Maus handelt, sowie in der ebenfalls Wachstumsfaktor-abhängigen murinen Zelllinie 32D (Mizuki et al. 2000) führte die Transfektion mit FLT3-ITD zu wachstumsfaktorunabhängiger Proliferation sowie zur Phosphorylierung intrazellulärer Substrate wie STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5), MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase), AKT (Proteinkinase B), SHC (Src homology 2 domain-containing protein), Cbl (Ubiquitin-Ligase, die an der Downregulation von Transmembranrezeptoren beteiligt ist), Vav (Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor für Rho-Familie der GTPasen) und SHP-2 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2) (Kiyoi et al. 2002, Zhang et al. 1999).

Während diese FLT3-ITD-induzierten Veränderungen einen proliferationsfördernden Effekt zeigen, wird darüberhinaus eine differenzierungshemmende Funktion der FLT-ITD-Mutationen beschrieben. So wird durch FLT3-ITD-Blockade eine in 32D-Zellen supprimierte Differenzierung wiederhergestellt (Zheng et al. 2002).

Ungeachtet der Tatsache, dass eine verminderte Differenzierung auch Merkmal einer starken Zellproliferation sein kann, haben Studien von Mizuki et al. 2003 gezeigt, dass die mit myeloischer Differenzierung assoziierten Marker C/EBP α (CCAATT/enhancer binding protein α) und PU.1 in FLT3-ITD-Mutation-exprimierenden Zellpopulationen reduziert sind.

Interessant ist die Tatsache, dass unabhängig der Länge und Position der FLT3-ITD-Mutation immer eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors auftritt. Eine mögliche Erklärung hierfür wird in einer autoinhibitorischen Funktion der juxtamembranen Region, in der die Mutationen liegen, gesehen. Kommt es in dieser juxtamembranen Region zu Mutationen, unabhängig von ihrer Länge, führen die sterischen Veränderung dieser Domäne zum Verlust der Autoinhibition (Disinhibition) und somit zur konstitutiven Aktivierung der FLT3-Rezeptortyrosinkinase (Kiyoi et al. 2002, Griffith et al. 2004).

Hinsichtlich der konstitutiven Aktivierung durch Punktmutationen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne von FLT3 werden ähnliche Mechanismen wie bei der konstitutiven Aktivierung durch die D816-Mutation des Stammzellfaktorrezeptors c-kit vermutet (Till et al. 2001). Es handelt sich hierbei um Punktmutationen, die im Sinne von Missense-Mutationen zum Austausch einer Aminosäure führen (Tab.1). Die infolge Mutation substituierten Aminosäurepositionen sind im Wildtyp Teil einer Aktivierungsschleife, die im inaktiven Zustand des Rezeptors die Bindung von ATP als Substrat für die Rezeptorphosphorylierung verhindert bzw. limitiert. Kommt es infolge Punktmutationen zu entsprechenden Aminosäuresubstitutionen kann die Aktivierungsschleife nicht mehr die ATP-Bindungstasche blockieren. Das ATP hat damit ligandenunabhängig Zugang zur Rezeptortyrosinkinase und es kommt ebenfalls zur konstitutiven Rezeptoraktivierung.

Auch bei den Punktmutationen in der zweiten Tyrosinkinasedomäne zeigt sich bei Transfektion von Cos7-Zellen die konstitutive Rezeptorphosphorylierung sowie bei Transfektion von 32D-Zellen der Verlust der IL-3-Abhängigkeit (Yamamoto et al. 2001).

In vivo Studien an Mäusen haben in der Vergangenheit eindrucksvoll die zellbiologischen Auswirkungen der FLT3-Mutationen gezeigt. So führte die Injektion FLT3-ITD-positiver 32D-Zellen in Mäuse zu leukämieähnlichen Krankheitsbildern (Mizuki et al. 2000).

Weitere Studien brachten jedoch die Erkenntnis, dass FLT3-Mutationen alleine nicht zur Induktion einer Leukämie ausreichen. Wurden beispielsweise FLT3-ITD-Mutationen mittels retroviralem Transfer in normales Knochenmark eingeführt, und diese Zellen in Mäuse transplantiert, so entwickelten diese Mäuse zwar ein myeloproliferatives Krankheitsbild, jedoch keine Leukämie. Wurden hingegen transgene PML/RAR α -positive Mäuse transplantiert, war die Zeitdauer bis zum Auftreten einer Akuten Promyelozyten Leukämie (APL) deutlich vermindert sowie die Häufigkeit der Entwicklung einer APL erhöht (Kelly et al. 2002). Hier zeigt sich die Notwendigkeit des Auftretens mehrerer Mutationen im Sinne der sog. „two-hit“-Hypothese zur Induktion einer Leukämie. Im hier beschriebenen Fall ist es die Mutation des Transkriptionsfaktors PML in Form des t(15;17) Translokationsproduktes PML/RAR α , die zu einem Differenzierungsstop führt, kombiniert mit dem proliferativen und antiapoptischen Stimulus einer FLT3-ITD-Mutation.

2.7. FLT3-Inhibitoren

Die Suche nach neuen, selektiv wirksamen pharmakologischen Substanzen zur Behandlung der Leukämien haben in den letzten Jahren zur Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren geführt. So ist es heute möglich, bei der Behandlung der Philadelphia-Chromosom positiven CML auf den spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor STI571 bzw. Imatinib (Handelsname: Glivec[®]) und mittlerweile weitere Substanzen zurückzugreifen. Diese Medikamente blockieren selektiv die abl-Tyrosinkinase, die infolge der Translokation t(9;22) mit dem Gen für bcr (breakpoint cluster region) fusioniert und damit konstitutiv aktiv ist.

Betrachtet man den hohen Anteil FLT3-Wildtyp- sowie FLT3-ITD-Mutation positiver Leukämiepatienten sowie die schlechte Prognose der Patienten mit FLT3-ITD-Mutation, erscheint es notwendig, auch hier selektive Inhibitoren zu entwickeln und zu untersuchen.

Das Tyrphostin AG1296 beispielsweise hemmt in FLT3-ITD-transfizierten Ba/F3-Zellen die konstitutive Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase sowie die Phosphorylierung downstream gelegener Effektorproteine wie STAT5A, STAT5B, Erk, CBL, VAV und SHP2 (Tse et al. 2002).

Teller et al. zeigten 2002, dass die Bis(1H-2-2indolyl)-1-Methanon-Derivate D-64406 und D-65476 in TEL-FLT3-transfizierten Ba/F3-Zellen antiproliferativ wirken. Desweiteren werden die Autophosphorylierung des Rezeptors sowie die Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) in EOL-1-Zellen (Zelllinie einer AML M4Eo, die konstitutiv FLT3-Wildtyp exprimiert) gehemmt. Werden FLT3-ITD-transfizierte 32D-Zellen mit D-64406 bzw. D-65476 inkubiert, kann eine erhöhte Rate an strahleninduzierter Apoptose beobachtet werden.

Die Indolinone SU5416 und SU5614 wurden 2003 von der Arbeitsgruppe um Spiekermann untersucht. Hier konnten anhand FLT3-ITD-transfizierter Ba/F3 Zellen sowie anhand der FLT3-ITD-positiven Zelllinie MV4-11 gezeigt werden, dass beide Substanzen in diesen Zelllinien Apoptose, Zellzyklus- und Wachstumsstillstand zu induzieren vermögen.

Andere FLT3-Inhibitoren werden mittlerweile in klinischen Studien der Phasen I und II evaluiert. So zum Beispiel die Indolocarbazol-Derivate PKC412 und CEP-701 in Phase II Studien bei Patienten mit rezidivierter oder therapierefraktärer AML mit FLT3-Mutationen. Bei oraler Gabe von CEP-701 zeigten die Patienten im Knochenmark und im peripheren Blut

eine Verminderung der Blastenzahlen, die mit einer in vivo-Inhibition der FLT3-Phosphorylierung assoziiert war (Smith et al. 2004).

In einer Phase II Studie mit PKC412 (N-benzoylstaurosporin) zeigten 70% der Patienten eine periphere Blastenreduktion von mindestens 50%, weiterhin sank bei 6 Patienten der Blastenanteil im Knochenmark um 50% (Stone et al. 2004).

3. Aufgabenstellung

Vor dem Hintergrund einer ca. 30%igen Prävalenz von FLT3-ITD-Mutationen bei AML sowie der Korrelation des Mutationsstatus mit erhöhten Blastenzahlen, verminderten Remissionsraten sowie einem reduzierten Gesamtüberleben sollten im Rahmen dieser Arbeit FLT3-ITD-positive Leukämiezellen näher charakterisiert werden. Anhand von in vitro Inkubationsversuchen mit einem FLT3-Inhibitor und Differenzierungsinduktoren wie ATRA und Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor (G-CSF) sollten Erkenntnisse über mögliche zukünftige Therapieoptionen gewonnen werden.

Ein Hintergrund für die Auswahl der Substanzen stellt die Hypothese dar, dass zur Entstehung einer AML neben Mutationen in einem die Proliferation steuernden Gen zusätzlich die Differenzierung des hochproliferativen Zellklons durch eine zweite, die Differenzierung alterierende Mutation gehemmt werden muß („two hit“-Hypothese). Entsprechend sind Substanzen, die das für die Proliferation verantwortliche Gen hemmen, in Kombination mit Substanzen, die zur Ausdifferenzierung der Zellen führen, ein vielversprechender Ansatz für eine Kombinationstherapie. Bestes Beispiel für die Wiederherstellung der Zelldifferenzierung ist die Behandlung der durch die Translokation t(15;17) PML-RAR α charakterisierte Promyelozytenleukämie mit Hilfe von ATRA oder Arsentrioxid.

Als Modellsysteme dienten Zelllinien der Akuten Myeloischen Leukämie FAB-Subtyp M5, wobei die Zelllinie THP-1 mit nicht mutiertem Rezeptorstatus als Wildtypzelllinie und somit biologische Kontrolle fungierte. Die Zelllinien MOLM-13 - mit FLT3-ITD-Mutation in einem Allel - sowie MV4-11 mit homozygotem FLT3-ITD-Mutationsstatus standen im Fokus des Interesses. Weitere Untersuchungen wurden an MONO-MAC-6, einer Zelllinie mit FLT3-V592A-Punktmutation vorgenommen. Die Prävalenz dieser Mutation ist deutlich niedriger und beschränkt sich auf Einzelbeschreibungen (Stirewalt et al. 2004).

Mit Hilfe der Immunpräzipitation von FLT3 mit nachfolgendem Immunoblot gegen FLT3 und phosphorylierte Tyrosine sollte der Phosphorylierungsstatus der einzelnen Zelllinien untersucht werden und rezeptorassoziierte Signalmoleküle nachgewiesen werden. Zuvor sollte mit durchflußzytometrischer Färbung die Expression von FLT3 gezeigt werden.

Die Charakterisierung der Zelllinien nach Inkubation mit dem FLT3-Inhibitor D-65476, mit ATRA, G-CSF sowie Kombinationen von ATRA und G-CSF mit D-65476 sollte zunächst am Durchflußzytometer erfolgen. Methodisch kam hier der Nachweis von Oberflächenantigenen als Marker einer möglichen Differenzierungsinduktion, Zellzyklusanalysen durch Kernfärbung mit Propidiumiodid, Apoptoseanalysen mittels Annexin-V-Assay bzw.

Propidiumjodidfärbung sowie Proliferationsuntersuchungen mit Hilfe des CFSE-Assay zur Anwendung.

An die durchflußzytometrisch gewonnenen Informationen schlossen sich Untersuchungen der der FLT3-Rezeptortyrosinkinase nachgeschalteten Signalwege an, wobei Expressionslevel mittels Western-Blot und Aktivierungszustände mittels Antikörpern gegen phosphorylierte Signalmoleküle im Western-Blot untersucht werden sollten. Zur Bestimmung des mRNA-Gehaltes kam die semiquantitative PCR zum Einsatz. Von den untersuchten nachgeschalteten Signalmolekülen sei hier insbesondere Phospho-Akt erwähnt, weiterhin sollten die in AML mit myeloischer Differenzierung assoziierten Transkriptionsfaktoren PU.1 und C/EBP α nachgewiesen werden.

Aufgrund der durchflußzytometrisch erhobenen Daten richtete sich das Interesse vor allem auf die Steuerung der Apoptose.

Von besonderer Relevanz zeigte sich die Familie der IAP (Inhibitors of apoptosis) und hier insbesondere von Survivin, dessen Expressionsverhalten im Verlauf von 48h dargestellt wurde. Mit Hilfe von Substanzen mit definierter Wirkung auf den Zellzyklus wie L-Mimosine und Nocodazole sollten in den untersuchten Zelllinien Zellzyklusverschiebungen induziert werden und die Abhängigkeit der Survivin-Expression von der Zellzyklusverteilung der Zellpopulation beschrieben werden. Als weitere Vertreter der IAP-Familie war die Expression von Livin und XIAP in Abhängigkeit von D-65476, ATRA und G-CSF näher zu untersuchen. Weiterhin erfolgten Immunoblots gegen einzelne Vertreter der Proteinfamilie der Bcl2-verwandten Proteine, wie z.B. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S und Bax.

4. Materialien und Methoden:

A Materialien:

	Hersteller
1kb Ladder	Invitrogen
Acrylamid	Roth
APS	Roth
Aprotinin	Roche Diagnostics GmbH
ATRA	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma
Bradford-Reagenz	Sigma
Bromphenolblau	Roth
Cruz Marker™ Molecular Weight Standards sc-2035	Santa Cruz Biotechnology
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
D-65476	Prof. Böhmer, Jena
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Ethidiumbromid	Roth
Blotpapier	Biorad
FCS	Biochrom KG
FL	R&D Systems Inc.
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
G-CSF	R&D Systems Inc.
HEPES	Sigma
Hyperfilm	Amersham Bioscience
Immuno-Blot PVDF Membran 0,2 µm	Biorad
Isoton II	Beckman Coulter
Leupeptin	Roche Diagnostics GmbH

2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Milchpulver – Blotting Grade	Roth
MLV reverse Transkriptase (Superscript II)	Invitrogen
NaCl	Roth
NaF	Roth
Na-o-Vanadate	Calbiochem
oligo-d(T)-Primer	Roche
Pepstatin	Roche Diagnostics GmbH
Pefabloc SC (AEBSF=4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, hydrochloride)	Boehringer Mannheim
PBS	Invitrogen Life Technologies
Protein A-Sepharose	Sigma
Random hexamer primer	Invitrogen
Rainbow Marker RPN 756	Amersham Biosciences
RNAsin	Invitrogen
RNEasy Total Kit	Qiagen
RPMI 1640 + GlutaMAX I	Invitrogen
SDS	Sigma
Taq DNA-Polymerase inkl. Puffer	Qiagen
Temed	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trizma® Base (Tris)	Sigma
Tween® 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma
ZnCl	Sigma

Antikörper für Western-Blot/Immunpräzipitation:

Antikörper:	Hersteller:	Spezies	eingesetzte Verdünnung/Menge	MW
Akt	Santa Cruz	Schaf	1:1000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	60 kDa
β-Aktin	Santa Cruz	Ziege (polyklonal)	1:1000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	41,7 kDa
Bax	Santa Cruz	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	23 kDa
Bcl-2	Santa Cruz	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	26 kDa
Bcl-X	BD Pharmingen	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	Bcl-X _L 26 kDa, Bcl-X _S 17 kDa
C/EBP α (14AA)	Santa Cruz	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 in PBS + 3% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	42 kDa, 30 kDa
FLT-3	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1 % Tween® 20	~160 kDa (glykosyliert), ~130 kDa
p44/p42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1:1000 in PBS + 5% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	44 kDa, 42 kDa
Phospho-Akt (Ser 473)	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1:1000 in PBS + 5% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20 für 12 h bei 4°C	60 kDa
Phospho-Tyrosin (4G10)	Cell Signaling Technology	Maus	1:2000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	---
PU.1 (Spi-1)	Santa Cruz	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 entspr. 0,2 µg IgG/ml PBS + 3% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	40 kDa
SHP-1 (C-19)	Santa Cruz	Kaninchen (polyklonal)	1:4000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	68 kDa
SHP-2 (N-16)	Santa Cruz	Kaninchen (polyklonal)	1:1000 in PBS + 1% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	68 kDa
Survivin (6E4)	Cell Signaling Technology	Maus (monoklonal)	1:500 in PBS + 5% nonfat dry milk + 0,1% Tween® 20	16 kDa

FACS-Reagenzien/Kit's:

Antikörper	Hersteller:
CD 135-PE	Beckman Coulter
CD 11b/Mac-1-APC	Becton Dickinson
CD 14-PE	Becton Dickinson

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	BD Biosciences, Pharmingen
CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit	BD Biosciences, Pharmingen

Primer:

Gen	Primer fw	Primer rv
Livin	5'-GTCCCTGCCTCTGGGTAC-3'	5'-CAGGGAGCCCACTCTGCA-3'
Survivin	5'-CGACCCCATAGAGGAACATA-3'	5'-AGAGAAGCAGCCACTGTTAC-3'
XIAP	5'-GGGGTTCAGTTTCAAGGACA-3'	5'-CGCCTTAGCTGCTCTTCAGT-3'
β-Aktin	5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'	5'-GAACTTTGGGGGATGCTCGC-3'

B Methoden:**4.1. Beschreibung der Zelllinien:**

Zelllinie	THP-1
Herkunft	Isolation aus peripherem Blut eines einjährigen Jungen mit AML-Rezidiv (1978)
Differenzierung	monozytär
Oberflächenmarkerprofil	CD13+, CD14+, CD15+, CD68+, CD4+, CD3neg., CD19neg., CD33+, CD34neg., HLA-DR+
Zytogenetik	94(88-96)<4n>XY/XXY, -Y, +1, +3, +6, +6, -8, -13, -19, -22, -22, +2mar, add(1)(p11), del(1)(q42.2), i(2q), del(6)(p21)x2-4, i(7p), der(9)t(9;11)(p22;q23)i(9)(p10)x2, der(11)t(9;11)(p22;q23)x2, add(12)(q24)x1-2, der(13)t(8;13)(p11;p12), add(?18)(q21)

Zelllinie	MOLM 13
Herkunft	Isolation aus peripherem Blut eines 20-jährigen Patienten mit sek. AML M5a aus MDS-RAEB
Differenzierung	monoblastär (AML M5a)
Oberflächenmarkerprofil	CD4+, CD13+, CD15+, CD33+, CD3 neg., CD14 neg., CD19 neg., HLA-DR neg.
Zytogenetik	51(48-52)<2n>XY, +8, +8, +8, +13, del(8)(p1?p2?), ins(11;9)(q23;p22p23), +19

Zelllinie	MV4-11
Herkunft	Isolation aus peripherem Blut eines 10-jährigen Jungen mit AML M5 bei Erstdiagnose
Differenzierung	monozytär

Oberflächenmarkerprofil	CD4+, CD13+, CD15+, CD33+, CD34+, CD68+, HLA-DR+; CD3 neg., CD5 neg., CD8 neg., CD10 neg., CD14 neg., CD19 neg., CD21 neg., CD25 neg., CD37 neg., CD138 neg.
Zytogenetik	48(46-48)<2n>XY, +8, +18, +19, -21, t(4;11)(q21;q23)

Zelllinie	MONO-MAC-6
Herkunft	Isolation aus peripherem Blut eines 64-jährigen Mannes mit AML-M5b-Rezidiv
Differenzierung	monozytär
Oberflächenmarkerprofil	CD13+, CD14+, CD15+, CD33+, CD68+, HLA-DR+, CD3 neg., CD19 neg., CD34 neg.
Zytogenetik	84-90<4n>XX/XXX, -Y, +6, +7, -12, -13, -13, -16, -16, +2mar, t(9;11)(p22;q23)x2, add(10)(p11)x2, add(12)(q21), del(13)(q13q14)der(13)t(13;14)(p11;q12)x2, der(17)t(13;17)(q21;p11)x2

4.2. Zellkultur und Zellzahlbestimmung

Ausgangspunkt der Zellkultivierung waren bei flüssigem Stickstoff in -196°C gelagerte Kryokulturen der jeweiligen Zelllinien. Nach Entnahme der Kryokulturen aus den entsprechenden Aufbewahrungscontainern erfolgte das vorsichtige Auftauen der Zellsuspensionen im lauwarmen Wasserbad, Zentrifugation bei 1000 U/min und Resuspension in RPMI 1640 um zytotoxisches DMSO zu entfernen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte dann, je nach benötigter Zellzahl in Zellkulturflaschen mit jeweils 25 cm², 75 cm² bzw. 175 cm² Oberfläche mit jeweils 8 ml, 20 ml und 50 ml Suspension bei 37°C Temperatur und 5 % CO₂-Anteil.

Die Zellen wurden ca. alle 3 Tage im Verhältnis 1:2 – 1:4 gesplittet und so je nach Zelllinie in Konzentrationsbereichen zwischen $0,1 \times 10^6$ und $2,0 \times 10^6$ /ml in Kultur gehalten. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum verwendet. Antibiotischer Schutz wurde durch Zusatz von Gentamicin, einem Aminoglykosid-Antibiotikum, gewährleistet.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte maschinell am Counter Z1. Hierzu wurden 50 μ l der Zellsuspension zu 20 ml isotonischer Lösung entsprechend einem Verhältnis von 1:400 pipettiert und gemessen. Nach Multiplikation konnte so die absolute Zellzahl bestimmt werden.

Das Meßprinzip am Counter Z1 basiert auf der Änderung des elektrischen Widerstands, die bei nichtleitenden Partikeln in einer Elektrolytlösung auftritt. Mittels eines Manometersystems wird die Zellsuspension zwischen zwei Platinelektroden angesaugt, jeder Partikel (Zelle) erzeugt eine Widerstandsänderung proportional seines Volumens, die, elektronisch verstärkt, vom Computer aufgezeichnet wird.

4.3. Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie erlaubt durch Erfassung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht die Beurteilung einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie und gibt bei Einsatz von Fluorochromen und Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern Auskunft über den Besatz der Zelloberfläche mit bestimmten Antigenen, über Konzentration intrazellulärer Proteine oder auch über den Gehalt einer Zelle an Kern-DNA. Durch elektronische Registrierung der Fluoreszenzsignale und Darstellung in Histogrammen und Dot Plots lassen sich so gesamte Zellpopulationen hinsichtlich der untersuchten Parameter charakterisieren.

Im Durchflußzytometer emittiert ein Argon-Laser Licht der Wellenlänge $\lambda=488$ nm. Dieses Licht trifft auf eine mittels hydrodynamischer Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom isolierte Zelle und wird entsprechend gestreut. Dabei ist das in der optischen Achse gemessene sogenannte Vorwärts-Streulicht (forward scatter=fsc) proportional der Größe der Zelle, wobei das im Winkel von 90° gemessene Seitwärts-Streulicht (sideward scatter=ssc) Auskunft über die innere Komplexität und Granularität einer Zelle gibt. Ist die Zelle mit Fluorochromen beladen, sei es durch direkte oder aber antikörpervermittelte Bindung, absorbiert das Fluorochrom die Energie des Laserlichtes, wird auf ein entsprechend höheres

energetisches Niveau gehoben und gibt diese Energie in Form von Wärme und Emission von Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge wieder ab. Unter Berücksichtigung der Autofluoreszenz einer Zelle ist das emittierte Fluoreszenzlicht proportional der Menge an gebundenen Fluorochrom-Molekülen.

Durch Verwendung verschiedener Fluorochrome kann in bis zu drei Wellenlängenbereichen (vier bei Zuschaltung eines zweiten Lasers) gleichzeitig gemessen werden.

Die Detektoreinheit FACSCalibur ist mit einem Apple-Macintosh verbunden und läßt sich über die Software CellQuest steuern. Üblicherweise werden pro Messung zwischen 10000 und 20000 Events (Zellen) registriert, was die Charakterisierung der Zellpopulation ermöglicht.

Fluoreszenzkanal	Fluorochrom mit Emission in entsprechendem Kanal
Kanal 1	FITC (Fluoreszeini <u>s</u> o <u>t</u> hiocyanat)
Kanal 2	PE (Phyco <u>e</u> rithrin), PI (Propidium <u>i</u> odid)
Kanal 3	PerCP (Peridin <u>i</u> n-Chlorophyll-Protein-Komplex) 7-AAD (7-Amino <u>a</u> ctinomycin <u>D</u>)
Kanal 4	APC (Allophycoc <u>y</u> anin)

Tab. 2: Fluoreszenzkanäle des Durchflußzytometers und Beispiele für Fluorochrome

4.3.1. Analyse von Zelloberflächenmarkern

Die Untersuchung der Zelllinien auf bestimmte Oberflächenproteine wie z.B. die FLT3-Rezeptortyrosinkinase sowie auf Oberflächenmarker der myelomonozytären Differenzierung wie z.B. CD11b war erforderlich, um Aussagen über die FLT3-Expression auf den einzelnen Zelllinien und eine eventuelle inhibitorabhängige Downregulation, sowie über eine mögliche monozytäre Differenzierung bei bestimmten Inkubationsbedingungen treffen zu können.

Um unspezifische Autofluoreszenz der Zellen sowie unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen, wurde je Ansatz eine Autofluoreszenzkontrolle bzw. eine sog. Isotypkontrolle mitgeführt. Die Autofluoreszenzkontrolle beinhaltete keinen Antikörper, die Isotypkontrolle bestand aus Zugabe eines Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers ohne Epitopbindungsstelle, der eine eventuelle unspezifische Bindung des Antikörpers sichtbar machen sollte.

Für jede Messung wurden 5×10^5 Zellen benötigt, die zweimal mit PBS gewaschen wurden (Zentrifugation bei 1000 U/min). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde überstehendes PBS sorgfältig abgenommen, und die Zellen in 190 μ l PBS (180 μ l bei Zusatz von 2 verschiedenen Antikörpern) resuspendiert. Nach Zusatz von 10 μ l des jeweiligen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers wurde für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurde erneut zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt erfolgte die Abnahme des Überstandes und nach Resuspension in 1 ml PBS die Messung am FACSCalibur.

4.3.2. Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklus-Analyse basiert auf dem Prinzip der stöchiometrischen Bindung von Propidiumiodid (PI) an isolierte Kern-DNA mit anschließender Detektion des Fluoreszenzsignals durch ein FACS-System.

Zur Zellzyklus-Analyse wurde das CycleTest™ PLUS DNA Reagent Kit der Firma Becton Dickinson verwendet. Mittels eines nichtionischen Detergenz werden bei diesem Kit die Lipidbestandteile der Zellmembran aufgelöst, anschließend Zytoskelett und Kernproteine durch Trypsin proteolytisch verdaut, störende zelluläre RNA durch RNase A gespalten und die nukleäre DNA mit Hilfe von Spermin stabilisiert. Hinzugegebenes Propidiumiodid bindet stöchiometrisch an die Kern-DNA und emittiert Fluoreszenz-Licht im Wellenlängenbereich zwischen 580 und 650 nm, was in Kanal 2 des FACSCalibur erfaßt werden kann.

Bei dieser Methode der Bestimmung der Zellzyklusverteilung können jedoch häufig zwei Zellkerne der G₁-Phase Aggregate bilden und als sogenannte „doublets“ durchflußzytometrisch als 1 Zellkern mit dem höheren DNA-Gehalt der G₂/M-Phase gemessen werden, mit entsprechender Verschiebung des Histogramms zugunsten der G₂/M-Phase. Beseitigen läßt sich dies, indem in einem Dotplot FL2-Area gegen FL2-Width, die breiteren „doublets“ (im Dotplot rechts der Hauptpopulation) durch entsprechendes Gaten in der Histogrammdarstellung nicht mehr berücksichtigt werden (Abb. 4).

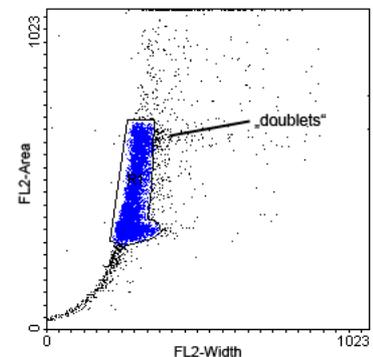


Abb. 4: Beispiel für die Selektion (blaue Events) von MONO-MAC-6-Zellen mittels Gate um Dupletten (rechts der blauen Zellpopulation) von der Messung auszuschließen

Das nach Gaten resultierende Histogramm gibt wie in Abb. 5 beschrieben Auskunft über die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation. Dabei repräsentiert ein erster Peak im Histogramm die Zellen im Stadium der G₁-Phase mit einfachem DNA-Gehalt. Ein zweiter Peak im Histogramm rechts davon steht für Zellen im Stadium der G₂/M-Phase mit doppeltem DNA-Gehalt. Zwischen den beiden Peaks werden Zellen erfaßt, die sich zwischen einfachem und doppeltem DNA-Gehalt im Stadium der S-Phase befinden.

Vor Anwendung des Kits wurden die Zellen einem 3 maligen Waschschrift mit jeweils Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min, Verwerfen des Überstandes und Resuspension in PBS unterzogen. Durch Zellkonzentrationsbestimmung wurde die absolute Zellzahl im Pellet auf 5×10^5 Zellen eingestellt.

Als nächstes erfolgte nun die Solubilisierung membranärer Strukturen sowie der Verdau zellulärer Proteine mittels Trypsin und Detergenzien durch Zugabe von 250 µl Lösung A des Kits unter vorsichtiger Resuspension des Pellets. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je Ansatz 200 µl von Lösung B hinzugegeben, wieder vorsichtig geschüttelt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser zweiten Inkubation sorgte der in Lösung B enthaltene Trypsin-Inhibitor für die Begrenzung des proteolytischen Verdaus und die ebenfalls enthaltene RNase A für den Abbau von RNA-Molekülen, die die Messung aufgrund ihrer PI-Bindung beeinflussen würden. Danach wurden durch Zugabe von 200 µl Lösung C die isolierten DNA-Stränge mittels Propidium-Iodid bei 4°C unter Lichtabschluß für 10 min gefärbt. Unmittelbar vor der Messung am Durchflußzytometer mußten störende zelluläre Reste durch Filtration über einen 35 µm Filter abgetrennt werden. Die Analyse der Zellzyklusverteilung erfolgte nach Erfassung am FACSCalibur mittels der Windows-Software WinMDI 2.9 zur Analyse von FACS-Datensätzen.

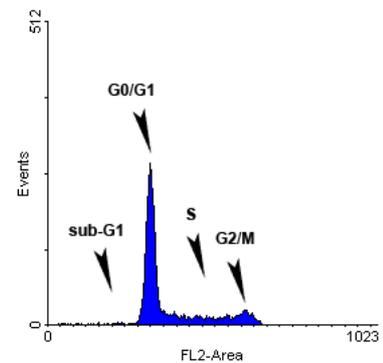


Abb. 5 : Verteilung der Zellzyklusphasen im FL2-Area-Histogramm

4.3.3. Annexin V/PI-Apoptose-Assay

Die Detektion apoptotischer Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose mittels Annexin V beruht auf dem Verlust der asymmetrischen Verteilung von Phospholipiden innerhalb der zweischichtigen Zellmembran.

In lebenden hämatopoetischen Zellen zeigt sich eine asymmetrische Verteilung der verschiedenen Membranphospholipide auf die beiden Schichten der Zellmembran. So finden sich auf dem äußeren, dem Extrazellulärraum zugewandten Anteil der Zellmembran überwiegend die Phospholipide Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, während auf dem inneren Teil hauptsächlich Phosphoethanolamin und Phosphatidylserin vertreten sind (Op den Kamp 1979). Apoptoseeintritt führt zum Verlust dieser Asymmetrie mit Auftreten von Phosphatidylserin auf der äußeren Schicht der Zellmembran (Fadok et al. 1992).

Da Annexin V Ca^{2+} -abhängig an negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin bindet, kann es, an ein Fluorochrom gebunden, zur durchflußzytometrischen Detektion von Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose verwendet werden.

In dem von BD Pharmingen bezogenen Apoptosis Detection Kit II ist Annexin V mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugiert und kann somit durchflußzytometrisch gemessen werden. Mittels des Vitalfarbstoffes PI, der erst bei aufgehobener Membranintegrität nach intrazellulär gelangen kann und sich dann stöchiometrisch an die DNA bindet, können parallel sogenannte „spätapoptotische“ Zellen einer Zellpopulation identifiziert werden. Demgegenüber sind „frühapoptotische“ Zellen aufgrund der noch intakten Zellmembran PI-negativ.

Nach Kultur der Zellen wurden diese zweifach mit kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min) und mit im Kit enthaltenen Annexin-Bindungspuffer (Ca^{2+} -haltig) auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml Puffer resuspendiert. 100 μl dieser Suspension wurden zusammen mit 5 μl Annexin V-FITC sowie 5 μl PI für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert. Nach Zusatz von 400 μl Bindungspuffer je Ansatz erfolgte die durchflußzytometrische Messung innerhalb von 60 min.

4.3.4. CFSE Proliferations-Assay

Häufig angewandte, klassische Proliferations-Assays beruhen auf der Messung des ^3H -Thymidin-Uptakes während der Zellproliferation. Eine neuere durchflußzytometrische

Methode bedient sich des Carboxyfluorescein Succinimidyl Esters (CFSE), einem Fluorochrom, das nach Permeation der Zellmembran intrazellulär an Proteine bindet, um dann nach jeder Mitose eine Halbierung der Fluoreszenzintensität zu zeigen (Fulcher und Wong 1999).

Nach Vorbereitung der Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation in 0,25 μM CFSE bei einer Zelldichte von $2 \times 10^6/\text{ml}$ und 37°C für 10 min. Nach dreimaligem Waschen mit Kulturmedium wurden die Zellen in 6-well-Platten für 96 h mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml ausgesät.

Am Tag der Messung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und daraufhin am Durchflußzytometer untersucht.

4.4. Proteinbiochemie

4.4.1. Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung wurde die Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen entnommen und bei Raumtemperatur mit 1000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde jeweils dreimal mit eiskaltem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Zellsediment in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 6000 U/min für zwei Minuten wurde der Überstand sorgfältig und möglichst vollständig mit einer Pipette abgenommen, ohne jedoch das Sediment zu berühren. Auf das Sediment wurde dann der vorbereitete Proteinlysepuffer (PLP) gegeben. Die Menge bewegte sich hierbei je nach Sedimentgröße bzw. Anzahl der Zellen im Sediment zwischen 100 und 500 μl PLP. Nach gründlichem Vortexen der Zellen wurden diese für 30-45 min auf Eis belassen, alle 10 min gevortext und damit lysiert. Es folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 15000 U/min und 4°C . Der die Proteine enthaltende Zentrifugatüberstand wurde abgenommen, entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

Proteinlysepuffer	
HEPES pH 7.4	50mM
Triton	1 %
Glycerol	10 %
NaCl	150 mM
NaF	25 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
ZnCl	50 μ M
Na-o-vanadate	1 mM
Aprotinin	0,3 μ M
Leupeptin	1 μ g/ml
Pepstatin	1 μ M
Pefabloc	0,4-4 mM

4.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford 1976). Es wurden zu 800 μ l Bradford-Reagenz 3 μ l Proteinlysat bzw. bei hohen Konzentrationen im Proteinlysat 3 μ l eines mit PLP verdünnten Lysates hinzugefügt und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die zügige Messung mittels Photometer. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Konzentration wurde nach Bildung des arithmetischen Mittels der Absorptionen aus einer Standardgeraden ermittelt.

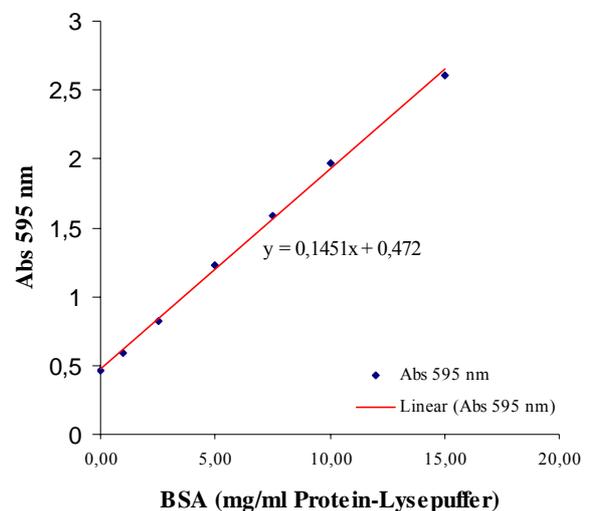


Abb. 6 : Standardgerade; dargestellt auf der Abszisse die BSA-Konzentration der untersuchten Probe, auf der Ordinate die Absorption bei $\lambda=595\text{nm}$

Eine Standardgerade wurde erstellt, indem Rinderserumalbumin in PLP in verschiedenen Konzentrationen aufgelöst und die Absorption der einzelnen Konzentrationen photometrisch

detektiert wurde. Die Verteilung der Absorption zeigte in dem vom Hersteller empfohlenen Konzentrationsbereich einen annähernd linearen Zusammenhang (Abb. 6) und erlaubte damit durch Messung der Absorption einer Probe bei $\lambda=595\text{nm}$ auf die Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe rückzuschließen.

4.4.3. Probenvorbereitung für Western Blots

Entsprechend der Proteinkonzentration im Zellysat wurden gleiche Mengen Protein entnommen und die Volumina mit PLP angeglichen. Daraufhin wurden die Proben mit einem vierfach konzentrierten SDS-Probenpuffer 1:4 verdünnt und 5 min bei 95°C auf dem Thermoblock erhitzt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt von 30 s bei 10000 U/min wurden die Proben auf die vorbereiteten Polyacrylamidgele aufgetragen.

4 x SDS - Probenpuffer	
Tris-HCl pH 6.8 (ml)	250 mM
SDS	8 %
Glycerol	40 %
DTT	0,4 M
Bromphenolblau	0,04 %
ddH ₂ O	

4.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zum Einsatz kam die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli 1970) mit der Biorad Mini-PROTEAN[®] 3 Cell-Elektrophoreseapparatur. Je nach Molekulargewicht des Zielproteins wurden Trenngele mit Konzentrationen zwischen 7,5 % und 12,5 % mit folgender Zusammensetzung vorbereitet.

Trenngel/Sammelgel (für 2x 1,5 mm Gele)	4%	7,5%	10%	12,5%
Acrylamidlg. 40 % (ml)	0,66	2,9	3,8	4,7
Aqua dest. (ml)	4,28	8,3	7,2	6,4
4 x Trenngel-Puffer 1,5 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	---	3,8	3,8	3,8
4 x Sammelgel-Puffer 0,5 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	1,66	---	---	---
10 % (w/v) SDS (µl)	66	150	150	150
APS 10% (µl)	33,4	75	75	75
TEMED (µl)	3,3	5	5	5

Dabei wurden APS und TEMED erst kurz vor dem Eingießen in die Elektrophoreseapparatur zugegeben, um eine verfrühte Polymerisation zu vermeiden. In diesem Zusammenhang war es wichtig, die APS-Stammlösung wöchentlich frisch anzusetzen, um eine bessere Gelpolymerisation und damit ein schärferes Trennergebnis sicherzustellen.

Es wurden pro Gel 7 ml der vorbereiteten Trenngellösung benötigt. Die Trenngele wurden mit 1 ml Aqua dest. überschichtet, um Luftblasen zu entfernen und das Gel vor dem Sauerstoff der Umgebungsluft abzuschirmen, der die Polymerisation verzögert. Nach 30 min wurde das Wasser mit Filterpapier abgenommen und das Sammelgel zugegeben. In das Sammelgel wurde vorsichtig, um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden, ein Kamm mit 10 bzw. 15 Zähnen eingeführt. Nach Abschluß der 30-minütigen Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur überführt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wurde aus dem Sammelgel gezogen und die Taschen vorsichtig mit Laufpuffer gespült, um Gelreste zu entfernen.

10 x Laufpuffer	
Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (w/v)
ddH ₂ O	auf 1 l

Probenauftrag und Gellauf:

Pro Geltasche wurden 20 µl der vorbereiteten Proben aufgetragen. Bei hochkonzentrierten Proben wurden mitunter 15 µl geladen, umgekehrt bei schwacher Detektion im Western Blot auch 25 µl, die Proteinmenge der geladenen Proben waren jedoch in allen Taschen eines Geles immer gleich.

Um Aussagen über das Molekulargewicht der untersuchten Proteine zu gewinnen, wurden Molekulargewichtsmarker (Rainbow Marker RPN 756, Amersham Biosciences; Cruz Marker sc-2035, Santa Cruz Biotechnology) mitgeführt. Als Negativkontrolle fungierte mit vierfach Ladungspuffer 1:4 verdünnter PLP.

Die Gelelektrophorese wurde bei konstantem Strom und variabler Spannung in 75 min durchgeführt, wobei pro Gel die Stromstärke $I = 30 \text{ mA}$ betrug, entsprechend zwei Gele parallel $I = 60 \text{ mA}$. Die Spannung U bewegte sich bei diesen Bedingungen zwischen 80 und 160 Volt.

4.4.5. Western Blot

Nach Abschluß der Gelelektrophorese wurden die Gele der Elektrophoreseapparatur entnommen, die Sammelgele mittels Skalpell abgetrennt und für 15 min in Blotpuffer (nach Bjerrum et al. 1986) belassen.

Blotpuffer:	
Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,0375 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)
ddH ₂ O	to 1 l

Das Filterpapier und die PVDF-Membran wurden auf ein Format von 8,3 x 5,3 cm zugeschnitten und in Blotpuffer gelegt, wobei die PVDF-Membran zuvor in Methanol 1 min aktiviert wurde. Ein Western Blot setzte sich wie folgt zusammen:

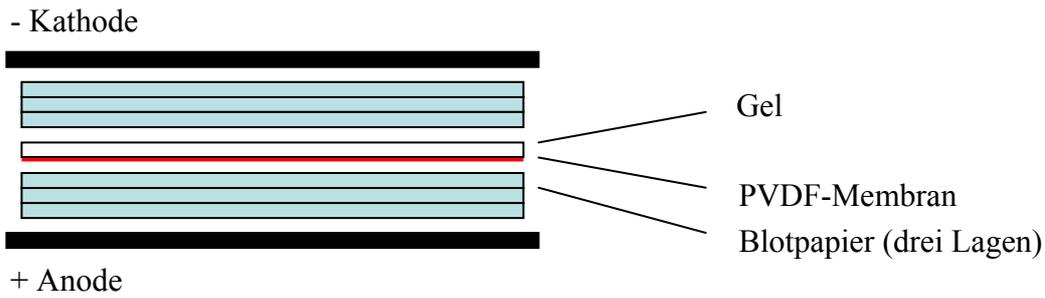


Abb. 7 : Anordnung des Westernblots in der Semidry-Apparatur

Auf die Anode wurden drei Lagen Filterpapier gelegt. Dabei war es besonders wichtig, eventuell eingeschlossene Luftblasen, die den Transfer beeinträchtigen, mittels eines Glasröhrchens aus den Filterpapieren zu walzen. Auf die der Anode zugewandten Filterpapiere folgten die PVDF-Membran, das Gel und weitere drei Lagen an Filterpapier, jeweil nach Auswalzen von Luftblasen.

Der Elektrotransfer der negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und damit PVDF-Membran dauerte unter konstanten Strombedingungen und variabler Spannung 90 Minuten, wobei pro cm^2 Gelfläche $0,8 \text{ mA}$ zugrundegelegt wurden, entsprechend bei einem Gel der oben erwähnten Maße $8,3\text{cm} \times 5,3\text{cm} \times 0,8 \frac{\text{mA}}{\text{cm}^2} \approx 35\text{mA}$ pro Gel.

Meist erfolgte der Transfer von 2 oder 4 Gelen simultan im Sinne einer Parallelschaltung der Blotstapel mit entsprechender Verdopplung bzw. Vervierfachung des als konstant eingestellten Stromwertes. Die Spannungsbegrenzung wurde wie vom Hersteller empfohlen auf 25 V eingestellt, um einer Beschädigung der Blotapparatur vorzubeugen.

Blockierungslösung:	
PBS	1x
Tween® 20	0,1%
Magermilchpulver	5% (w/v)

PBS-T:	
PBS	1x
Tween® 20	0,1%

Nach abgeschlossenem Western Blot wurden die PVDF Membranen aus der Semidry-Apparatur entnommen, kurz in Aqua dest. geschwenkt und in Blockierungslösung für mindestens 1 Stunde belassen, um unspezifische Antikörperbindung an die PVDF-Membran zu vermeiden. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper für eine Stunde. Pro Membran kamen 5 ml PBS-T + 1% Milchpulver und einer bestimmten Menge an Antikörper zum Einsatz. Hierauf folgten drei Waschschriffe à zehn Minuten, bevor die Membran wiederum für eine Stunde mit dem sekundären, an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten, Antikörper inkubiert wurde. Die Zusammensetzung der Antikörperlösung war entsprechend der des primären Antikörpers. Nach weiteren drei Waschschriffen à zehn Minuten wurde die Membran für eine Minute in ECL-Lösung geschwenkt, in Folie luftblasenfrei eingepackt und je nach Signalstärke für einen Zeitraum zwischen zehn Sekunden und 15 min in einer Filmkassette einem ECL-Hyperfilm exponiert. Im Anschluß wurde der Film für kurze Zeit in Entwicklungs- und danach in Fixierlösung geschwenkt.

Das Prinzip der Immundetektion beruht darauf, dass der primäre Antikörper spezifisch an ein Epitop des auf der PVDF-Membran immobilisierten Zielproteins bindet. Der sekundäre Antikörper bindet speziesspezifisch an die F_c-Komponente des primären Antikörpers und erlaubt durch seine Konjugation mit dem Enzym Meerrettichperoxidase die Detektion mittels Chemilumineszenz. Hierbei wird das in der ECL-Lösung vorhandene Luminol peroxidasevermittelt und unter katalytisch wirksamen Phenolen oxidiert und damit auf ein energetisch höheres Niveau gehoben, von dem es unter Emission von Licht der Wellenlänge $\lambda=428$ nm auf das energetische Ausgangsniveau zurückkehrt. Das emittierte Licht belichtet den Film in der Kassette.

4.4.6. Immunpräzipitation von FLT3

Zur Darstellung des Phosphorylierungsstatus der FLT3-Rezeptortyrosinkinase erfolgte die Immunpräzipitation mit anschließendem Immunoblot gegen FLT3 und Phosphotyrosin.

In Kultur gehaltene Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden aus den Zellkulturflaschen entnommen und jeweils dreimal in RPMI 1640-Medium gewaschen. Dieser dreimalige Waschschrift hatte zum Ziel, von den Zellen gebildete Zytokine und Wachstumsfaktoren mit parakriner Wirkung aus der Zellsuspension zu entfernen. Vielfach ist es auch üblich, Zellen zwölf Stunden serumfrei zu kultivieren, um solche Störwirkungen auszuschließen. Da jedoch

nicht ausgeschlossen werden kann, dass Zellen im serumfreien „Hungerzustand“ Signalwege induzieren können, die einem physiologischen Zustand der Zelle nicht entsprechen, wurde oben beschriebenes Vorgehen gewählt.

Die Zellen wurden nach dem Waschen auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und zu je 2 ml auf separate Tubes verteilt, anschließend für 30 min bei 37°C mit dem FLT3-Inhibitor D-65476 (Endkonzentration 1µM bzw. 3 µM) oder seinem Lösungsmittel DMSO (0,1% v/v) inkubiert. Danach wurde ein Teil der Proben mit FL (40 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert. Die übrigen Proben wurden parallel ohne Hinzugabe von FL inkubiert.

	IP-Kontrolle	1	2	3	4	5	6
D-65476 (30 min)	-	-	1µM	3µM	-	1µM	3µM
FL (10 min)	-	-	-	-	40ng/ml	40ng/ml	40ng/ml

Tab. 3: Inkubationsbedingungen; die Zelllinien wurden zunächst für 30 min mit D-65476 in unterschiedlicher Konzentration inkubiert, darauf folgte die 10-minütige Inkubation mit FL

Die Stimulation mit FL wurde durch den Zusatz von eiskaltem PBS gestoppt. Um Phosphataseaktivitäten zu unterbinden, wurde dem PBS 1 mM Na-o-vanadate als Phosphataseinhibitor zugesetzt.

Nach zweimaligem Waschen, Abzentrifugieren und Elimination des Überstandes erfolgte die 30-minütige Lyse auf Eis, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt von 15000 U/min über 20 Minuten bei 4°C.

Währenddessen wurde die Protein-A-Sepharose vorbereitet. Etwa eine Messerspitze Protein-A-Sepharose wurde in Lysepuffer aufgequollen, daran schlossen sich 3 Waschschrte an, um enthaltenes Cyanogenbromid zu entfernen. Anschließend wurden die Tubes vorbereitet, in denen die Immunpräzipitation stattfinden sollte. Hierzu wurden pro Tube 400 µl Lysepuffer vorgelegt sowie 25µl der Protein-A-Sepharose-Suspension hinzugefügt. Vor jedem Pipettierschritt wurde hierzu gevortext, um ein Absetzen der Protein-A-Sepharose und damit ungleiche Verteilung auf die Tubes zu verhindern.

Den vorbereiteten Tubes wurde dann nach erfolgter Zentrifugation der Lysatüberstand sowie mit Ausnahme der IP-Kontrolle 1 µg eines gegen FLT3 gerichteten Antikörpers zugesetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Das Tube mit der

Immunpräzipitationskontrolle sollte unspezifische Bindungen an die Protein-A-Sepharose zeigen bzw. ausschließen.

Nach nächtlicher Inkubation bei 4°C auf dem Drehrad wurden die Immunpräzipitate am Folgetag fünfmalig mit Waschpuffer gewaschen, um unspezifische Bindungen an die Protein-A-Sepharose sowie die restlichen Proteine im Lysat auszuwaschen.

Das nach dem letzten Waschschrift verbliebene Sediment wurde in 75 µl Waschpuffer aufgenommen und mit 25 µl 4 x Probenpuffer versetzt, daraufhin für 5 min bei 95°C auf dem Thermoblock erhitzt.

Danach erfolgte die SDS-Gelelektrophorese sowie Western Blot wie oben beschrieben.

Waschpuffer	
HEPES pH 7.4	50 mM
Glycerol	10 %
NaCl	150 mM
NaF	25 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Na-o-vanadate	1 mM

4.5. Molekularbiologie

4.5.1. RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung aus den Zellkulturen wurde der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet, der auf der Lyse mittels Guanidin-Isothiocyanat (GITC)-Puffer und der Bindung der RNA an eine Silica-Gel-Membran basiert.

Die der Kultur entnommenen Zellen wurden einmal in PBS gewaschen, der nach Zentrifugation entstandene Überstand abgenommen und verworfen. Je Ansatz wurden maximal 3-4 x 10⁶ Zellen verwendet, um eine Überladung der Bindungssäulen zu vermeiden, was Ausbeute und Reinheitsgrad der RNA beeinträchtigt hätte.

Zu dem Zellsediment wurden 500 µl RNA-Lysepuffer (Buffer RLT mit 1:100 (v/v) β-Mercaptoethanol) zugesetzt und das Sediment mit der Pipette aufgelöst. Zur

Homogenisierung des Lysats, also der Zerkleinerung hochmolekularer DNA sowie Zellwandbestandteilen, wurde das Lysat auf QIAshredder® Säulen pipettiert und 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde daraufhin mit 500 µl 70%igem Ethanol versetzt, um das Bindungsvermögen der RNA an die Silica-Gel-Membran zu verbessern. In zwei Schritten wurde dieses Gemisch auf die RNeasy Mini-Säulen aufgetragen und jeweils 15s bei 10 000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die an der Silicagel-Membran haftende RNA durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und Zentrifugation bei 10000 U/min für 15s sowie zweimalige Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation bei identischen Bedingungen gewaschen. Der letzte Zentrifugationsschritt dauerte 2 min, um das im RPE-Puffer enthaltene Ethanol möglichst vollständig aus der Silicagel-Membran zu entfernen, und damit Interferenzen bei der Weiterverarbeitung der RNA zu vermeiden. In einem letzten Arbeitsgang wurde die RNA durch Pipettieren von 30-50 µl RNase freiem Wasser auf die Membran der Säulen und anschließende Zentrifugation bei 14000 U/min für 1 min eluiert.

4.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion (= optische Dichte) bei 260 nm photometrisch durchgeführt.

$$c_{RNA} \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = E_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Dabei ist zu beachten, dass nur Werte zwischen 0,1 und 1 aussagekräftig sind und Werte außerhalb dieses Bereiches mit Meßfehlern verbunden sind.

Die zu bestimmende RNA-Probe wurde 1:100 verdünnt (3 µl RNA-Probe; 297 µl RNase freies Wasser) und in eine Quarzküvette überführt. Neben der Extinktion bei 260 nm wurde

auch die Extinktion bei 280 nm bestimmt, da nach Bildung des Quotienten $\frac{E_{260nm}}{E_{280nm}}$ Aussagen

über die Reinheit der RNA-Probe möglich sind. So weist eine proteinfreie RNA-Probe Quotienten zwischen 1,5 - 2 auf.

4.5.3. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA je Ansatz verwendet. Unterschiedliche RNA-Konzentrationen wurden mit RNase freiem Wasser so eingestellt, dass in 8,5 µl 1 µg RNA enthalten war. Der Ansatz wurde daraufhin für 5 min auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstruktur aufzulösen und so eine optimale Primer-Bindung zu gewährleisten. Zu den 8,5 µl RNA-Probe wurden 11,5 µl des unten beschriebenen Reaktionsansatzes gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die einstündige Inkubation bei 37°C. Durch Inkubation über 8 min bei 95°C auf dem Thermoblock wurde die cDNA-Synthese durch Hitzedeaktivierung der reversen Transkriptase beendet. Die erhaltene cDNA wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

cDNA-Reaktionsansatz	
Tris-HCl pH 8,3	50 mM
KCl	75 mM
MgCl ₂	3 mM
DTT (100 mM)	10 mM
oligo-dT-Primer	16 µM
Random Primer	0,15 µg/µl
dNTP-Mix	250 µM je dNTP
RNAsin	1 U/µl
MMLV-Reverse-Transkriptase	10 U/µl

4.5.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die semiquantitative Analyse der Expression verschiedener Gene erfolgte mittels RT-PCR. Mittels PCR konnten die synthetisierten cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Vom Verfahren her gelingt die Amplifikation der DNA durch Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase und der zyklischen Wiederholung der zur Amplifikation notwendigen Schritte (Denaturierung der DNA, Primer-Annealing, DNA-Polymerisation). Die hier durchgeführten PCR-Untersuchungen waren semiquantitativer Natur. Wie im Western-Blot wurde als „house-keeping“-Gen β-Aktin verwendet, um eine gleichmäßige Beladung der Gele zu zeigen.

Reaktionsansatz der PCR	
Aqua dest.	18,3 µl
10 x Taq-Puffer	2,5 µl
fw-Primer (10 µM)	0,5 µl
rev-Primer (10 µM)	0,5 µl
dNTP's (2,5 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	2 µl
Taq-Polymerase (1 Unit)	0,2 µl
cDNA	1 µl

Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklenanzahl
β-Aktin	95°C/30sec	60°C/30sec	72°C/20sec	28
Livin	95°C/30sec	62°C/30sec	72°C/20sec	35
Survivin	95°C/30sec	62°C/30sec	72°C/20sec	35
XIAP	95°C/30sec	60°C/30sec	72°C/20sec	30

Tab. 4: PCR-Bedingungen in Abhängigkeit von der zu amplifizierenden cDNA

4.5.5. Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50 x)	
Tris-Base	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA pH 8,0	100 ml
dd H ₂ O	auf 1000 ml

Proben-Puffer (5 x)	
Sucrose	40 % (w/v)
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,001 % (w/v)

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Größe erfolgte durch Anwendung der Agarose-Gelelektrophorese. Es wurden 1%- oder 2%ige (w/v) Agarose-Gele mit Tris-Acetat-EDTA (TAE) als Puffersystem verwendet. Nach Abwiegen der Agarose und Auflösen in TAE-Puffer wurde das Gemisch in der Mikrowelle bis zum Erhalt einer klaren Gelflüssigkeit erwärmt. Nach Hinzugabe von Ethidiumbromid im Volumenverhältnis 1:50 000 wurde die Gelflüssigkeit vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Ethidiumbromids zu erreichen. Danach wurde die Gelflüssigkeit in die Gelapparatur gegossen.

Nach Aushärten des Gels und Entfernung des Kammes wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und das PCR-Produkt, zuvor mit 5fach Probenpuffer im Verhältnis 1:5 vermischt, in die Geltaschen aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung dauerte bei konstantem Stromfluß von $I=200$ mA ca. 45 min. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

5. Ergebnisse:

5.1. FLT3-Expression und -Phosphorylierung in Abhängigkeit von FL und D-65476

Zunächst wurden die verwendeten Zelllinien auf die Expression von FLT3 untersucht. Hierzu wurde ein Phycoerythrin-konjugierter FLT3-Antikörper (FLT3-PE) verwendet und gefärbte Zellen gegen eine mitgeführte Isotyp-Kontrolle (PE-konjugierter Antikörper ohne FLT3-Spezifität) in Kanal 2 am Durchflußzytometer gemessen. Abb. 8 zeigt die entsprechenden Histogramme der Zelllinien THP-1, MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6, wobei schwarz konturierte Histogramme die Isotyp-Kontrolle darstellen, während die rot konturierten Histogramme die FLT3-positiven Zellen repräsentieren.

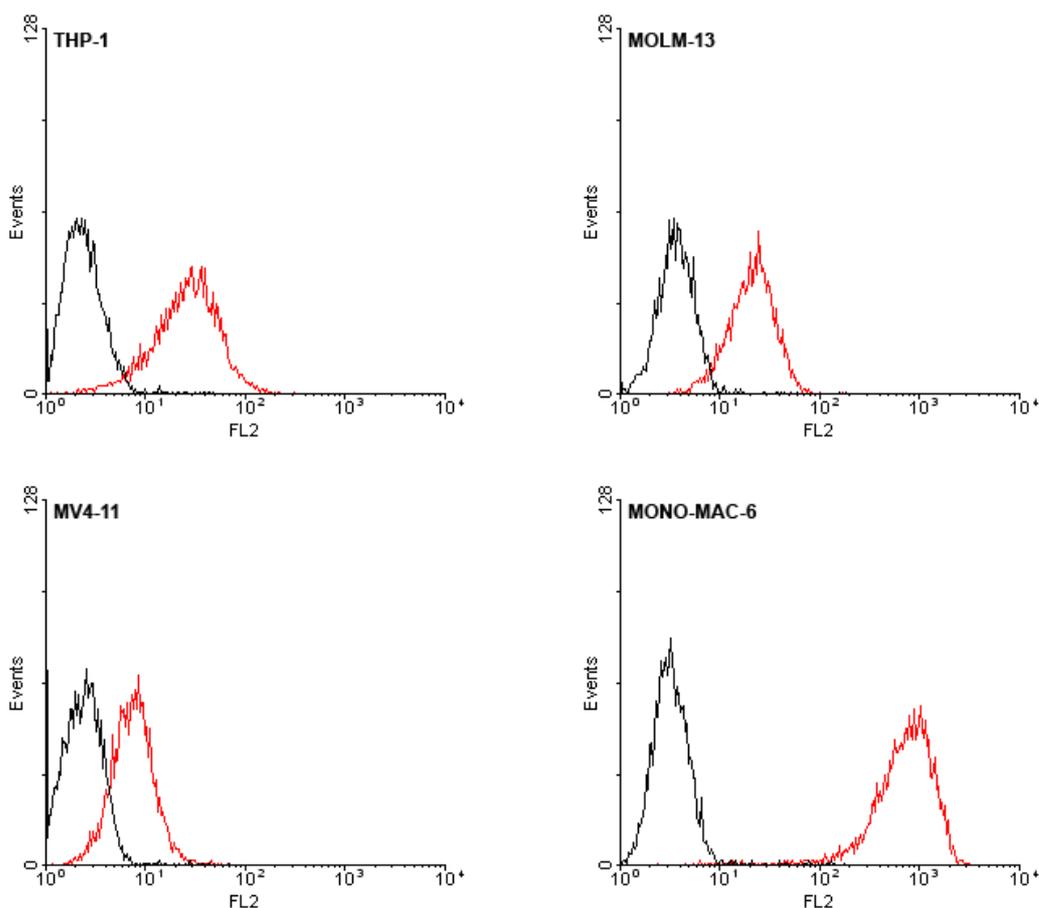


Abb. 8: FLT3-Expression: Untersuchung der Zelllinien THP-1 (Wildtyp-FLT3), MOLM-13 (FLT3-ITD), MV4-11 (FLT3-ITD) und MONO-MAC-6 (FLT3-V592A-Mutation). Rot konturiert dargestellt sind die Zellen nach Inkubation mit einem PE-konjugierten, gegen FLT3-gerichteten Antikörper, schwarz konturiert dargestellt sind Zellen, die lediglich mit der Isotyp-Kontrolle gefärbt wurden; Abszisse – relative Fluoreszenzintensität in Kanal 2, Ordinate – erfaßte Ereignisse; Dargestellt die Rechtsverschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten als Zeichen der FLT3-Expression auf der Zelloberfläche

Wie Abb. 8 veranschaulicht, zeigen die Zelllinien THP-1 (FLT3-Wildtyp), MOLM-13, MV4-11 (beide FLT3-ITD) sowie MONO-MAC-6 (V592A-Punktmutation) nach Inkubation mit einem FLT3-PE-konjugierten Antikörper eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität im logarithmischen Größenmaßstab nach rechts und sind damit deutlich FLT3-positiv.

Mit Hilfe der Immunpräzipitation von FLT3 konnten im anschließenden Immunoblot gegen phosphorylierte Tyrosinreste Aussagen über den Phosphorylierungsstatus von FLT3 unter Ruhebedingungen, nach Stimulation mit FL sowie nach Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor D-65476 gewonnen werden.

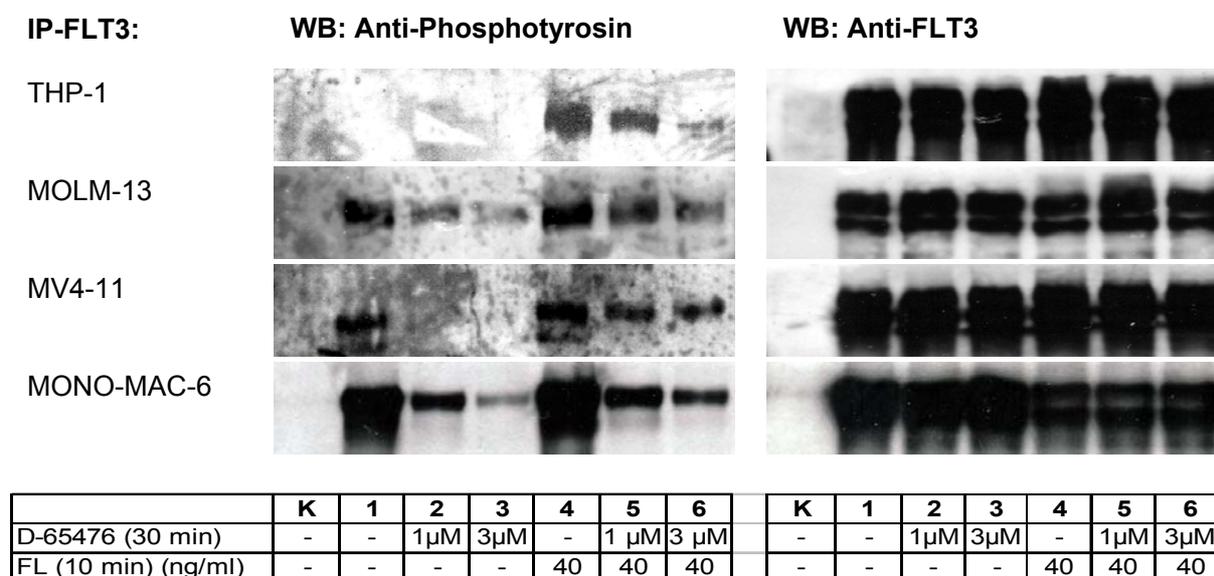


Abb. 9: Immunpräzipitation der FLT3-Rezeptortyrosinkinase: Kulturen der untersuchten Zelllinien wurden mit D-65476 für 30 min und anschließend für 10 min mit FL wie in der oben dargestellten Tabelle inkubiert. Es folgte die Immunpräzipitation von FLT3 und Western Blots mit Anti-Phosphotyrosin und Anti-FLT3 (Ladungskontrolle). In den Western Blots mit Anti-Phosphotyrosin zeigte sich eine von der D-65476 Konzentration abhängige Abnahme der Phosphorylierung, FL konnte die Phosphorylierung auf ein höheres Level steigern, hatte jedoch keinen Einfluß auf die konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung durch D-65476. *K* Immunpräzipitations-Kontrolle (Lysat + Protein A-Sepharose ohne FLT3-Antikörper)

Hierzu erfolgte die Immunpräzipitation der Rezeptortyrosinkinase mittels eines FLT3-spezifischen Antikörpers und Protein-A-Sepharose. Das Immunpräzipitat wurde per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und ein Immunoblot gegen FLT3 und Phosphotyrosin angefertigt. Die Blots gegen FLT3 dienten als Nachweis eines gleichmäßigen Proteinauftrags auf das Gel und bestätigten darüberhinaus die durchflußzytometrische Messung der FLT3-Expression.

Die Immunoblots gegen phosphorylierte Tyrosinreste der FLT3-Rezeptortyrosinkinase zeigten in den FLT3-ITD-positiven Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 sowie in der V592A-Punkmutation-tragenden Zelllinie MONO-MAC-6 eine deutliche konstitutive Ruhephosphorylierung, die durch Inkubation mit FLT3-Ligand noch gesteigert werden konnte. Die FLT3-Wildtyp-exprimierende Zelllinie THP-1 zeigte keine konstitutive Rezeptorphosphorylierung. Hier konnte nur nach Inkubation mit FLT3-Ligand eine Rezeptorphosphorylierung detektiert werden.

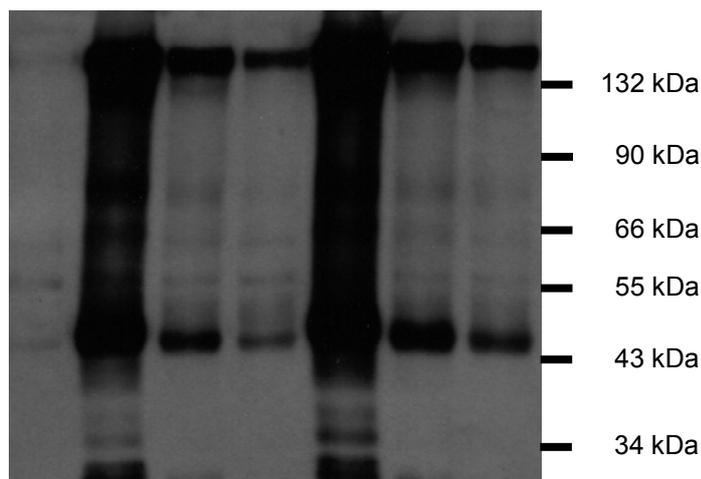
Das Bis(1H-2-indolyl)methanon D-65476 induzierte in den untersuchten Konzentrationen von 1 μ M bzw. 3 μ M in allen vier untersuchten Zelllinien eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der Rezeptorphosphorylierung (Abb. 9).

5.2. Interaktion von FLT3 und nachgeschalteten Signalmolekülen in Abhängigkeit von FL und D-65476

Zur weiteren Charakterisierung der Inhibitoreffekte auf FLT3 erfolgte die Immunpräzipitation von FLT3 und Western Blots gegen mögliche FLT3-assoziierte Proteine. Als Modellzelllinie wurde MONO-MAC-6 gewählt.

IP: FLT3

WB: P-Tyrosin



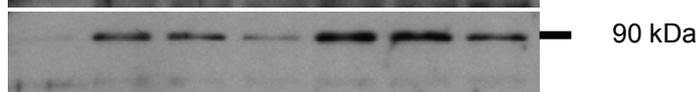
WB: SHP-1



WB: SHP-2



WB: p85



WB: FLT3



	K	1	2	3	4	5	6
D-65476 (30 min)	-	-	1 μ M	3 μ M	-	1 μ M	3 μ M
FL (10 min) (ng/ml)	-	-	-	-	40	40	40

Abb. 10: Immunpräzipitation der FLT3-Rezeptortyrosinkinase in MONO-MAC-6 und Western Blot gegen mögliche FLT3-assoziierte Proteine: Phosphotyrosin-Reste, SHP-1, SHP-2, p85 (PI3Kinase-Adapterprotein), Anti-FLT3 (Ladungskontrolle).

Nachweis von SHP-1 im Westernblot, allerdings Nachweis des Proteins auch in der IP-Kontrolle, so dass eine unspezifische Bindung nicht ausgeschlossen werden konnte. Nachweis von SHP-2 mit von D-65476 abhängiger Abnahme der FLT3-Bindung. Auch p85 zeigte eine D-65476 abhängige Bindung an FLT3. Im Western Blot gegen FLT3 konnte eine gleichmäßige Immunpräzipitation von FLT3 in den unterschiedlichen Ansätzen nachgewiesen werden.

K Immunpräzipitations-Kontrolle (Lysat + Protein A-Sepharose ohne FLT3-Antikörper)

Die Inkubation von MONO-MAC-6 mit D-65476 konnte den Phosphorylierungsstatus der FLT3-Rezeptortyrosinkinase konzentrationsabhängig reduzieren. Zusätzliche Inkubation mit FLT3-Ligand steigerte die Rezeptorphosphorylierung, jedoch ohne Einfluß auf die konzentrationsabhängige Reduktion der Phosphorylierung durch D-65476 (Abb. 10).

Als nächstes erfolgte ein Western Blot gegen die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2. Für SHP-2 wurde eine Assoziation mit FLT3 über das Adapterprotein Grb2 sowie eine FLT3-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung beschrieben (Zhang et al. 1999). Im Bereich von 70 kDa zeigte sich nach Inkubation mit einem SHP-2 spezifischen Antikörper ein wenn auch schwaches Signal, das konzentrationsabhängig von D-65476 abgeschwächt wurde. Auch im Blot gegen phosphorylierte Tyrosinreste war in diesem Molekulargewichtsbereich eine von der Inhibitorkonzentration abhängige Reduktion von phosphorylierten Tyrosinresten zu verzeichnen, passend zu den von Zhang et al. 1999 beschriebenen Daten über eine FLT3-Ligand abhängige Phosphorylierung von SHP-2.

Im Western Blot mit einem SHP-1 spezifischen Antikörper ließ sich SHP-1 nachweisen, dabei jedoch auch in der IP-Kontrolle ohne Zusatz eines FLT3-Antikörpers, so dass eine unspezifische Bindung an Protein-A-Sepharose nicht auszuschließen und somit keine sichere Aussage über eine Bindung von SHP-1 an FLT3 zu treffen ist.

5.3. Einfluß von ATRA, G-CSF und D-65476 auf Zelldifferenzierung, Zellzyklus-verteilung, Apoptose und Proliferationsverhalten

Ein Modell zur Pathogenese der AML stellt die sogenannte „two hit“-Theorie dar. Danach ist zur Entstehung und Manifestation einer AML die Aquisition von mindestens zwei Mutationen notwendig. Vereinfachend werden diese Mutationen zwei Klassen von Onkogenen zugeordnet, zum einen einer Klasse von Genen mit Funktionen in Proliferation und Apoptose, zum anderen einer Klasse von Genen, die für die Differenzierung einer Zelle eine entscheidende Rolle spielen. Treten in diesen beiden Klassen Mutationen auf, können hochproliferative Zellklone mit mangelnder Fähigkeit zur Differenzierung entstehen. Gleichwohl dieses Modell eine Vereinfachung darstellt, zeigt es Ansatzpunkte für zwei gezielte Therapiestrategien der AML, zum einen die selektive Inhibition einer mutierten Rezeptortyrosinkinase in Form der FLT3-ITD- bzw. V592A-Mutation (Klasse I-Mutation), zum anderen die Induktion von Differenzierung durch Retinolsäurederivate (z.B. ATRA) oder G-CSF (Klasse II).

Um Einzelwirkungen sowie synergistische Effekte einer kombinierten Behandlung zu untersuchen, erfolgte die Inkubation der genannten Zelllinien nach folgendem Schema über jeweils 48 Stunden: 1. DMSO 0,1 % (v/v) (Kontrolle), 2. D-65476 1 µM, 3. ATRA 100 nM,

4. D-65476 1 μM kombiniert mit ATRA 100 nM, 5. G-CSF 60 ng/ml, 6. D-65476 1 μM kombiniert mit G-CSF 60 ng/ml.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde nach 48h die Expression von Oberflächemarkern analysiert. Hierbei war es möglich, mittels des Zelloberflächenmoleküls CD11b (=MAC1) als Indikator myeloischer Differenzierung Aussagen über eine Differenzierungsinduktion zu treffen.

Zur Zellzyklusanalyse wurde die präparierte Zellkern-DNA mit Propidiumjodid gefärbt. Nach Histogrammdarstellung der Fluoreszenzintensität in Kanal 2 des Durchflußzytometers konnten Zellzyklusverschiebungen veranschaulicht werden.

Zur Apoptosedetektion wurde der Annexin-V-Assay herangezogen, das Proliferationsverhalten der kultivierten Zellen konnte mit Hilfe des CFSE-Assays gemessen werden.

5.3.1. Zelldifferenzierung

Wie in Tab. 5 und exemplarisch für THP-1 in Abb. 11 gezeigt, exprimierte lediglich die FLT3-Wildtyp-tragende Zelllinie THP-1 nach Inkubation mit ATRA das Zelloberflächenantigen CD11b (MAC-1) als Marker myeloischer Differenzierung. G-CSF führte in THP-1 nur zu einer geringen Expressionsteigerung von CD11b.

In den Zelllinien mit FLT3-Mutation konnten weder ATRA noch G-CSF CD11b induzieren. Auch der Zusatz des FLT3-Inhibitors D-65476 hatte keinen differenzierungsinduzierenden Effekt.

% CD11b +	DMSO	D-65476	ATRA	D-65476/ ATRA	G-CSF	D-65476/ G-CSF
	0,1 %	1 μM	100 nM		60 ng/ml	
THP-1	7,70	7,10	52,70	48,00	12,00	13,50
MOLM-13	3,80	2,00	4,00	3,80	2,30	3,70
MV4-11	0,70	1,10	1,00	1,40	0,90	1,10
MM-6	1,77	1,83	1,50	1,57	3,83	3,93

Tab. 5: FACS-Untersuchungen auf Expression von CD11b (Mac-1): Tabellarische Darstellung der Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Experimente. Hervorgehoben ist die in THP-1 beobachtete ATRA abhängige Zunahme der CD11b Expression, die von D-65476 unbeeinflusst bleibt. In MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6 konnten keine, durch die untersuchten Substanzen und deren Kombination mediierten Effekte nachgewiesen werden.

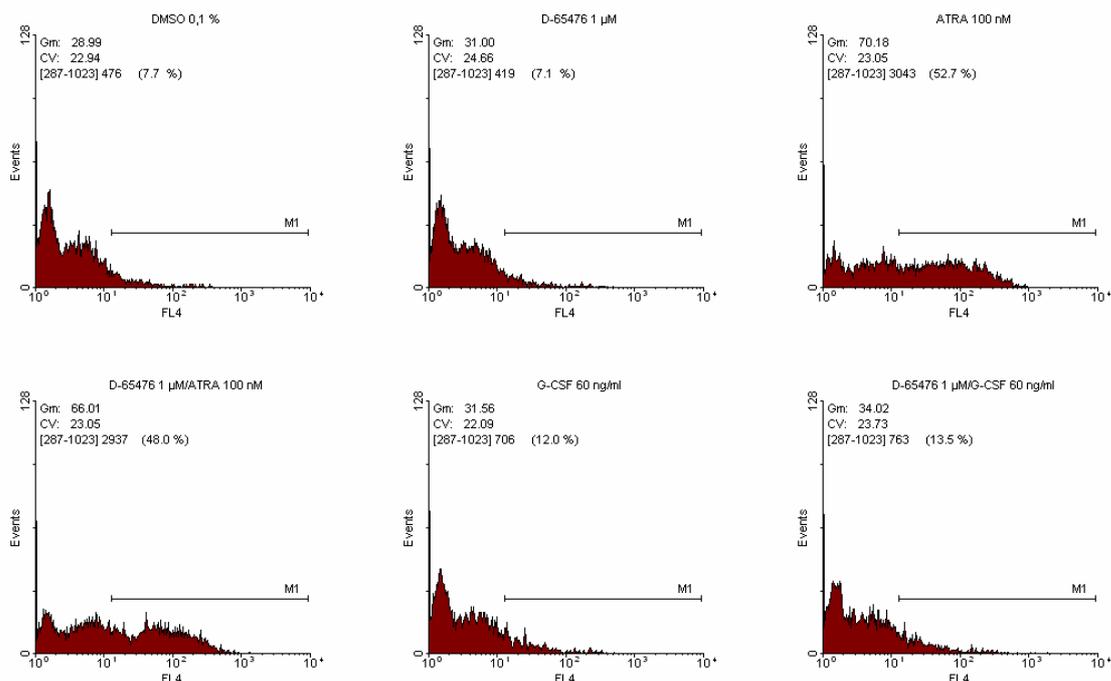


Abb. 11: FACS-Untersuchungen auf Expression von CD11b (Mac-1) als Marker myeloischer Differenzierung zeigten in THP-1 eine ATRA-abhängige Differenzierung. In MOLM-13, MV4-11, MONO-MAC-6 konnte keine Differenzierungsinduktion nachgewiesen werden. Exemplarische Darstellung der Histogramme einer repräsentativen Untersuchung für THP-1.

5.3.2. Zellzyklus

Tab. 6 zeigt die Mittelwerte der Zellzyklus-Verteilung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. In der Wildtyp-Zelllinie THP-1 war eine ATRA-abhängige Verschiebung des Zellzyklus von in Teilung befindlichen Zellen (zusammengefaßt als S/G₂/M) in Richtung G₁-Phase zu verzeichnen. Dabei hatte D-65476 keinen zusätzlichen Einfluß.

Gegensätzlich stellte sich die Situation in den FLT3-ITD-tragenden Zelllinien MOLM-13 und MV-4-11 dar. Hier zeigte sich in Abhängigkeit von der Inkubation mit D-65476 eine deutliche Abnahme der sich in Teilung befindlichen Zellfraktion, wobei dieser Effekt insbesondere in MOLM-13 durch ATRA noch verstärkt werden konnte.

In der FLT3-V592A-Mutation tragenden Zelllinie MONO-MAC-6 hingegen konnte die Kombination aus D-65476 und ATRA keine zusätzliche Zellzyklusverschiebung im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit D-65476 induzieren.

Analoge Untersuchungen wurden für G-CSF und D-65476 durchgeführt. Hier schien in FLT3-mutierten Zelllinien die Kombination aus G-CSF und D-65476 die durch alleinige D-65476 Inkubation hervorgerufenen Zellzyklusverschiebungen in Richtung G₀/G₁ abzuschwächen.

In Abb. 12 wird die Zellzyklusverteilung von MOLM-13 mittels Histogrammdarstellung eines repräsentativen Experiments veranschaulicht.

THP-1				MOLM-13			
	sub-G1	G0/G1	S/G2/M		sub-G1	G0/G1	S/G2/M
1	4,1	58,0	38,0	1	10,2	50,1	40,0
2	3,6	55,6	36,4	2	15,0	72,8	12,5
3	8,3	74,3	17,6	3	11,5	53,3	35,5
4	9,1	73,8	17,2	4	18,6	78,3	3,6
5	5,0	58,1	37,1	5	8,3	54,5	37,3
6	5,5	57,7	37,1	6	11,7	59,0	29,5
S/G2/M (D-65476 vs. ATRA)			p 0,004	S/G2/M (D-65476 vs. D-65476/ATRA)			p 0,04
MV4-11				MonoMac-6			
	sub-G1	G0/G1	S/G2/M		sub-G1	G0/G1	S/G2/M
1	15,4	48,7	36,2	1	25,0	53,3	21,8
2	21,2	64,8	14,1	2	46,7	43,5	10,1
3	20,6	50,4	29,3	3	29,6	50,1	20,6
4	21,0	69,4	9,8	4	58,1	31,8	10,5
5	12,4	53,8	34,0	5	10,8	61,6	27,9
6	15,7	65,8	18,7	6	29,3	56,1	15,0
S/G2/M (D-65476 vs. D-65476/ATRA)			p 0,28	S/G2/M (ATRA vs. D-65476/ATRA)			p 0,04

Tab. 6: Zellzyklusverteilung von THP-1, MOLM-13, MV4-11, MONO-MAC-6 in Abhängigkeit von D-65476, ATRA, G-CSF und Kombinationen nach 48h Inkubation (1. DMSO 0,1 % (v/v) (Kontrolle), 2. D-65476 1 µM, 3. ATRA 100 nM, 4. D-65476 1 µM/ATRA 100 nM, 5. G-CSF 60 ng/ml, 6. D-65476 1 µM/G-CSF 60 ng/ml). Tabellarisch dargestellt für jede Zelllinie in der ersten Spalte die Inkubationsbedingung, in den folgenden Spalten die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten für sub-G1-, G0/G1-, und S/G2/M-Anteil; p-Werte zeigen das Signifikanz-Niveau (Student's t-test) der verglichenen Bedingungen

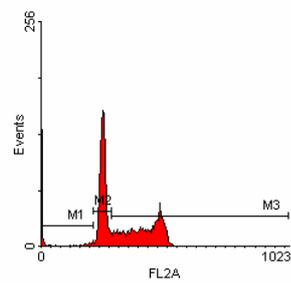
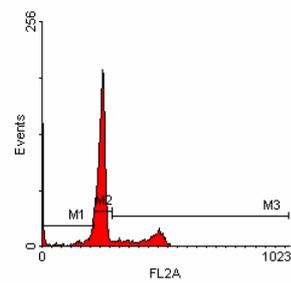
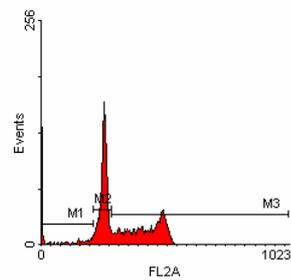
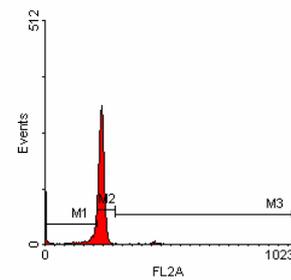
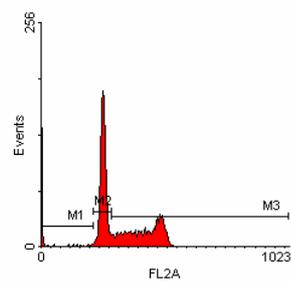
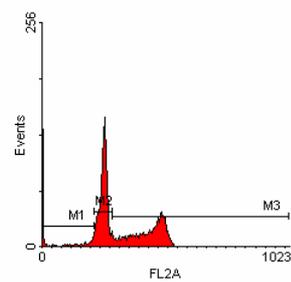
MOLM-13**DMSO****D-65476****ATRA****D-65476/ATRA****G-CSF****D-65476/G-CSF**

Abb. 12: Zellzyklusverteilung von MOLM-13 in Abhängigkeit von D-65476, ATRA, G-CSF und Kombinationen; Histogrammdarstellung eines repräsentativen Experiments; Deutlich erkennbar die Linksverschiebung des Histogrammes in Richtung G0/G1-Anteil (1. Peak) in Abhängigkeit von D-65476; Verstärkung der Linksverschiebung durch Kombination von D-65476 mit ATRA

5.3.3. Apoptose

In den folgenden Diagrammen ist die relative Häufigkeit Annexin-V-positiver Zellen aufgeführt. Annexinpositivität, hervorgerufen durch Desintegration der zweischichtigen Zellmembran mit konsekutiver Verlagerung von Phosphatidylserin in den äußeren Membrananteil und Bindung von Annexin im Komplex mit Calcium, ist Zeichen eines „frühen“ Apoptosestadiums.

In THP-1 fällt auf, dass wiederum nur ATRA signifikante Effekte im Sinne einer nahezu Verdopplung apoptotischer Zellen induzieren konnte (p 0,02). Zusätzliches D-65476 konnte keine weitere Steigerung der Apoptose hervorrufen. D-65476 scheint analog den Untersuchungen bezüglich des Differenzierungsmarkers CD11b und des Zellzyklus keine zusätzlichen Effekte zu induzieren.

Betrachtet man die Zelllinie MOLM-13 wurde durch D-65476 die im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen deutlich erhöhte Apoptoserate (p 0,02) durch Hinzunahme von ATRA mehr als verdreifacht (p 0,03). G-CSF hingegen hatte keinen derartigen Effekt.

In MV4-11 bewegte sich der Anteil apoptotischer Zellen nach alleiniger D-65476 oder ATRA-Behandlung auf vergleichbarem Niveau. Die im Vergleich zu alleiniger D-65476-Behandlung erhöhte Apoptoserate bei Kombinationsbehandlung mit D-65476/ATRA zeigte eine im Vergleich zu MOLM-13 moderate Steigerung.

In MONO-MAC-6 fiel die zusätzliche ATRA-vermittelte Steigerung der Apoptose noch geringer aus.

In MV4-11 und MONO-MAC-6 wurde durch G-CSF wie schon bei MOLM-13 eine D-65476 induzierte Apoptose vermindert.

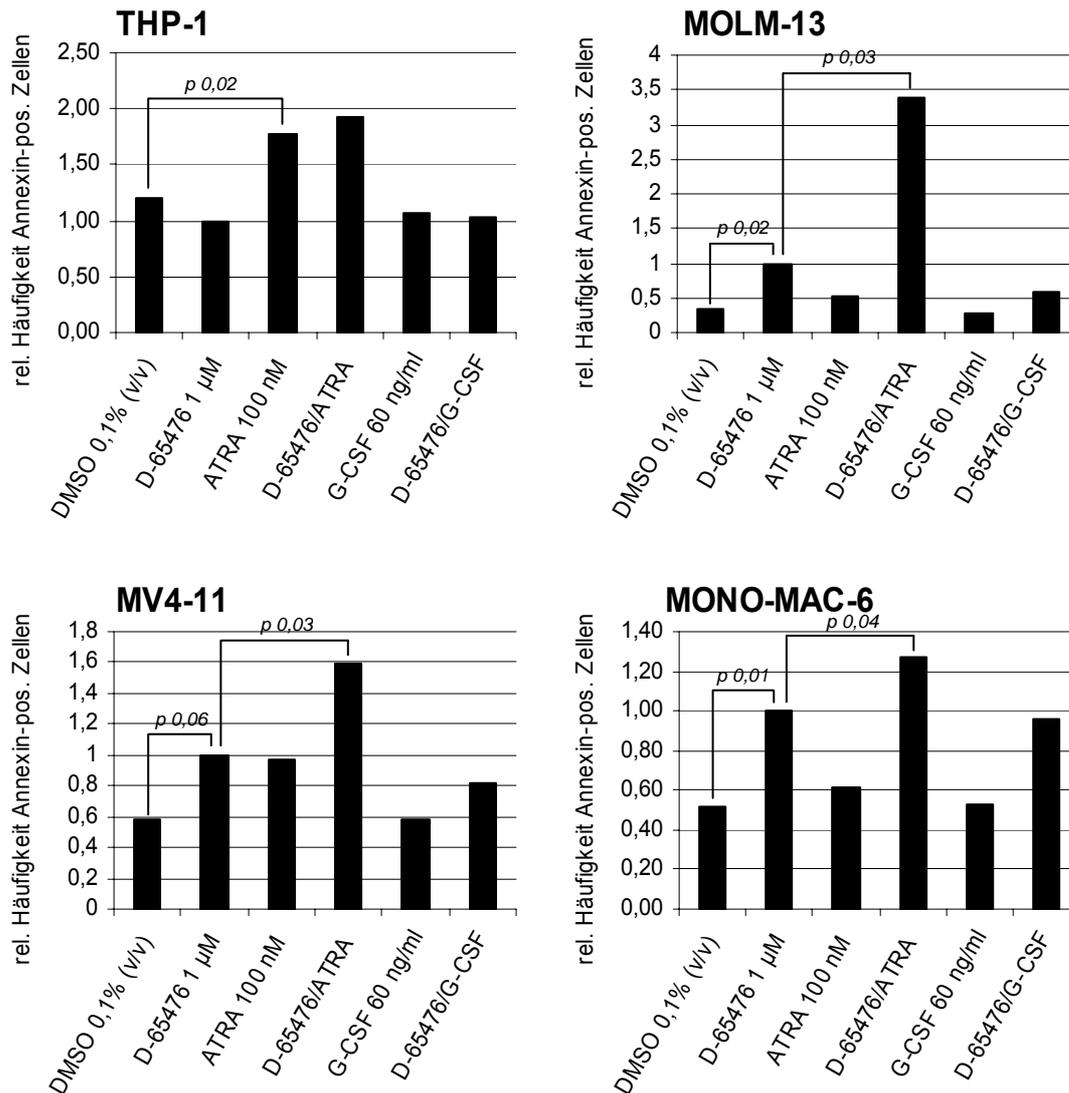


Diagramm 1: Apoptoseanalyse in THP-1, MOLM-13, MV-4-11, MONO-MAC-6 mittels Annexin-V-Färbung: Die Zelllinien wurden für 48h wie aufgeführt inkubiert, nach Färbung mit Annexin V wurde der relative Anteil Annexin V-positiver Zellen am Durchflußzytometer bestimmt. Der apoptotische Relativanteil bei D-65476-Inkubation wurde 1, der Apoptoseanteil der übrigen Inkubationsbedingungen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Balkendiagramme veranschaulichen die in den FLT3-Mutation-tragenden Zelllinien durch D-65476 induzierte Apoptose, die insbesondere in MOLM-13 durch zusätzliche Inkubation mit ATRA noch gesteigert werden konnte.

5.3.4. Proliferation

Mit Hilfe des CFSE-Assays wurde das Proliferationsverhalten der Zelllinien untersucht. Vor 48h-Inkubation mit den untersuchten Substanzen und deren Kombinationen wurden die Zellen mit CFSE markiert. Jeder Zellteilungsvorgang nach CFSE-Markierung zieht eine Halbierung des CFSE-Gehaltes einer Zelle und damit der Fluoreszenzintensität nach sich. Demnach entspricht in der folgenden Abbildung ein nach links zu niedriger Fluoreszenzintensität verschobenes Histogramm einer erhöhten proliferativen Aktivität.

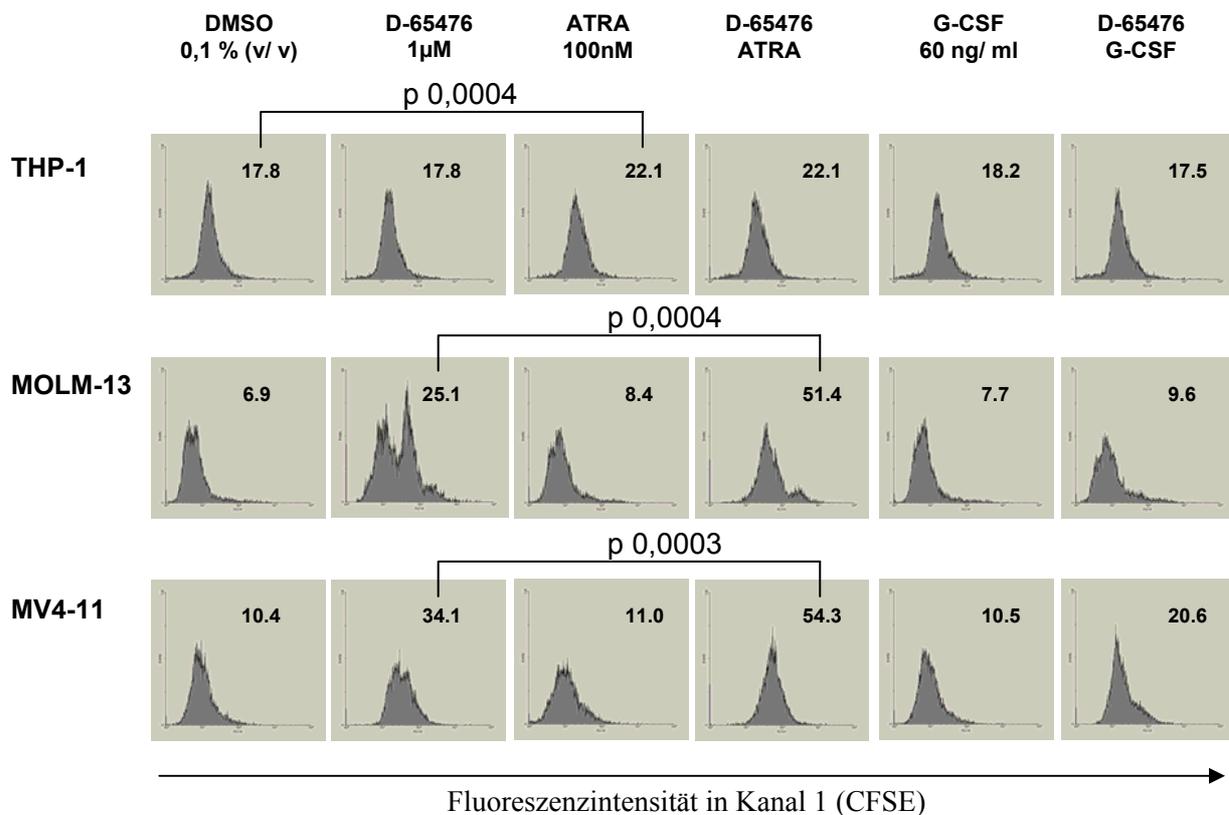


Abb. 13: Proliferationsverhalten im CFSE-Proliferationsassay: Nach CFSE-Markierung der Zelllinien erfolgte die Inkubation über 48h mit D-65476, ATRA, G-CSF und deren Kombinationen wie oben aufgeführt. Nach Ablauf der 48h wurde per Durchflußzytometer die Fluoreszenz in Kanal 1 gemessen. Je höher das Proliferationsverhalten einer Zellpopulation, desto geringer stellt sich der CFSE-Gehalt der einzelnen Zelle dar (Halbierung des CFSE-Gehaltes der Zelle mit jeder Zellteilung). In der Histogrammdarstellung entsprechen nach links verschobene Histogramme einer verminderten Fluoreszenz und damit erhöhten Proliferations-(Teilungs-)Rate der Zellen; rechts oben angegeben ist jeweils die durchschnittliche mittlere Fluoreszenz in Kanal 1 aus 3 repräsentativen Experimenten

In THP-1 konnte ATRA eine diskrete, jedoch signifikante Reduktion der Proliferationsaktivität (p 0,0004) bewirken. In den FLT3-ITD-positiven Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 induzierte D-65476 eine deutliche Reduktion des Proliferationsverhaltens, signifikant verstärkt durch die zusätzliche Inkubation mit ATRA (MOLM-13 p 0,0004; MV4-11 p 0,0003).

Betrachtet man weiterhin, wie in Diagramm 2 dargestellt, die nach 48 h Inkubation gemessenen Zelldichten, werden hier analoge Unterschiede sichtbar. Während die Zelldichten von THP-1 lediglich durch ATRA signifikant reduziert wurden (p 0,01), zeigten sich für MOLM-13 und MV4-11 signifikante Abnahmen der Zelldichte in Abhängigkeit von D-65476. Die Hinzunahme von ATRA konnte zusätzliche signifikante Effekte bezüglich der Reduktion der Zelldichte induzieren (MOLM-13: p 0,0003; MV4-11: p 0,002).

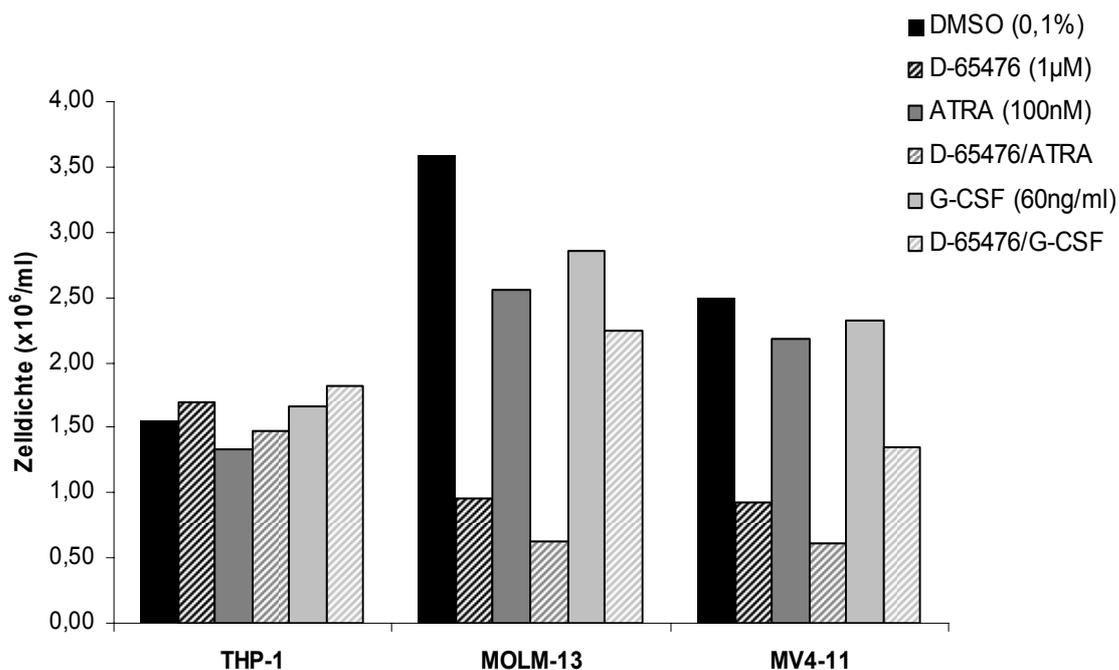
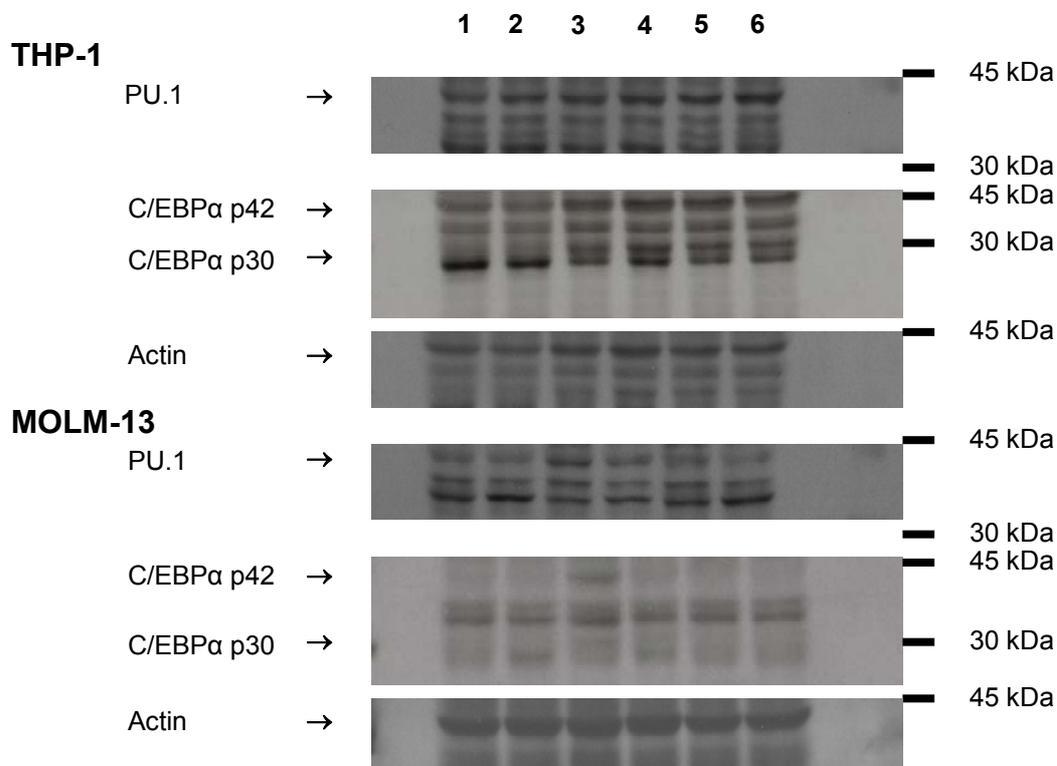


Diagramm 2: Zelldichte nach 48 h Inkubation: Aufgeführt sind die gemessenen Zelldichten der Zelllinien THP-1, MOLM-13 und MV4-11 nach 48 h Inkubation mit D-65476, ATRA, G-CSF und deren Kombinationen. D-65476 kann in den FLT3-ITD-Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 eine signifikante Reduktion der Zelldichte induzieren, zusätzlich kann die Kombination mit ATRA eine weitere Reduktion bewirken. Diese Effekte sind in der Wildtyp-Zelllinie THP-1 nicht nachweisbar, hier kann lediglich ATRA eine Abnahme der Zelldichte induzieren.

5.4. Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PU.1 in Abhängigkeit von ATRA, G-CSF und D-65476

Im Kontext der myeloischen Differenzierung spielen die Transkriptionsfaktoren PU.1 und C/EBP α eine bedeutende Rolle. PU.1 zeigt im Rahmen der Differenzierung der myeloischen Zellen eine Expressionszunahme. Die beiden Spleißvarianten von C/EBP α sind während der gesamten Myelopoese exprimiert (Bjerregaard et al. 2003). Es wurden die Zelllinien THP-1, MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6 unter den beschriebenen Bedingungen für 48 h inkubiert und im folgenden mittels Western Blot die Expression der Transkriptionsfaktoren studiert.



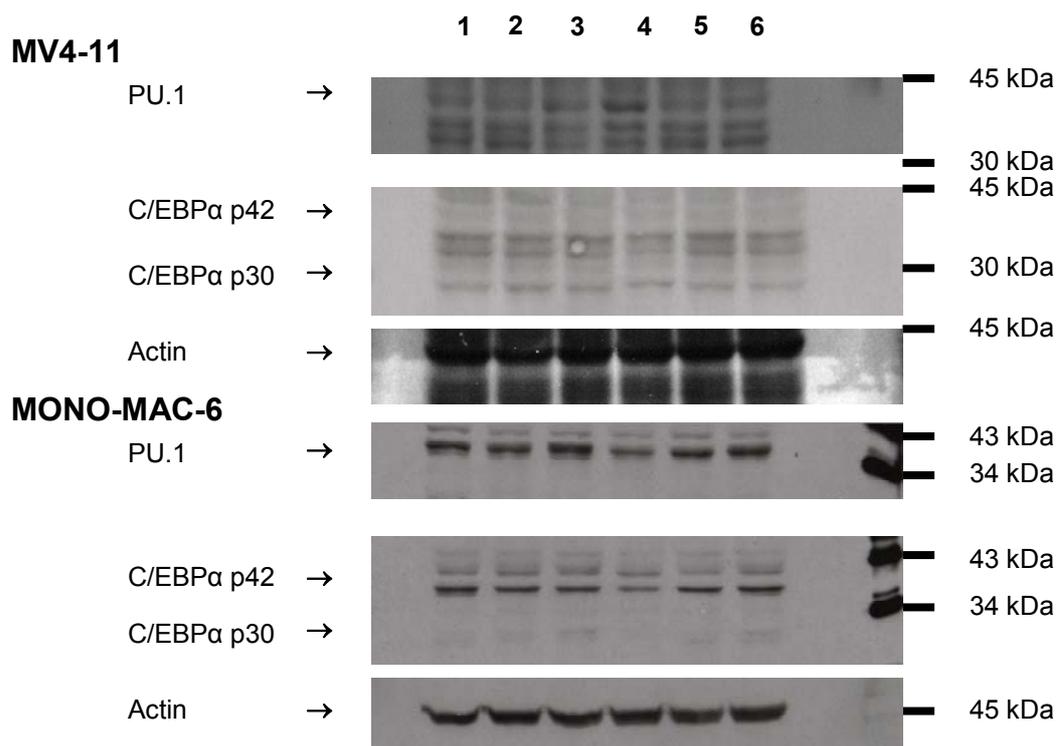


Abb. 14: Western Blot C/EBPα (42 kDa, 30 kDa), PU.1 (40 kDa), β-Aktin (Ladungskontrolle) in THP-1, MOLM-13, MV4-11, MONO-MAC-6: Die Zelllinien wurden für 48h mit 1. DMSO 0,1%, 2. D-65476 1μM, 3. ATRA 100 nM, 4. D-65476/ATRA, 5. G-CSF 60 ng/ml, 6. D-65476/G-CSF inkubiert. Nach SDS-PAGE erfolgte ein Immunoblot mit den entsprechenden Antikörpern. β-Aktin diente dem Nachweis einer gleichmäßigen Gelbelastung. In MOLM-13 ließ sich eine stärkere PU.1- und C/EBPα-Expression nach ATRA-Behandlung verzeichnen. In MV-4-11 zeigte sich lediglich nach D-65476/ATRA-Inkubation eine diskret angehobene Expression von PU.1. In MONO-MAC-6 war nach D-65476/ATRA-Inkubation bei PU.1 als auch bei den C/EBPα-Spleißvarianten eine abgeschwächte Expression nachweisbar.

Insgesamt waren die Western Blots durch ein hohes Hintergrundsignal und den Nachweis unspezifischer Banden gekennzeichnet, wahrscheinlich infolge mangelnder Spezifität der polyklonalen Antikörper (Abb. 14). In THP-1 führte die Inkubation mit ATRA, unabhängig von D-65476 zu einem gering erhöhten Signal für die kürzere (Repressor)-Spleißvariante des C/EBPα – Proteins. Keine Auswirkungen wurden bei der p42 Spleißvariante von C/EBPα sowie bei PU.1 gesehen.

In MOLM-13 konnte ATRA sowohl bei PU.1 als auch bei beiden Spleißvarianten von C/EBP α ein höheres Expressionsniveau induzieren. Dies jedoch nur in Abwesenheit von D-65476, die Kombination von ATRA und D-65476 zeigte hingegen eine Expression wie in der Kontrolle mit DMSO.

In der Zelllinie MV4-11 war nur für die Kombination ATRA und D-65476 ein geringer Effekt im Sinne einer stärkeren PU.1-Expression zu sehen, das C/EBP α -Signal blieb unter allen untersuchten Bedingungen gleich.

In MONO-MAC-6 fiel auf, dass sowohl bei PU.1 als auch bei C/EBP α in seinen beiden Spleißvarianten eine geringere Expression nach kombinierter ATRA/D-65476 Inkubation auftrat.

5.5. Phosphorylierung von Akt (Ser473) in Abhängigkeit von ATRA, FL und D-65476

Auf der Suche nach möglichen Ursachen der D-65476/ATRA vermittelten Apoptose wurde zuerst der PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg untersucht. Akt oder Proteinkinase B ist als wichtiger antiapoptotischer Signaltransduktionsweg in vielen Tumorzellen konstitutiv aktiv. Aufgrund der schwierigen Detektion der basalen Akt-Phosphorylierung wurde auf das bisher angewandte Inkubationsschema verzichtet und folgender Ansatz gewählt. Die Zelllinien wurden für 48 h entweder mit DMSO (Kontrolle) oder ATRA inkubiert. Darauf folgte die Hemmung von FLT3 durch 30 minütige Inkubation mit D-65476, gefolgt von einer 10 minütigen Stimulation mit FL. Hierbei zeigte sich eine jeweils von FL abhängige Phosphorylierungszunahme von Akt, die durch D-65476 Behandlung supprimiert werden konnte. Die Veränderungen waren unabhängig von einer vorhergehenden Inkubation mit DMSO oder ATRA, so dass hier keine ATRA vermittelten Effekte nachzuweisen waren (Abb. 15).

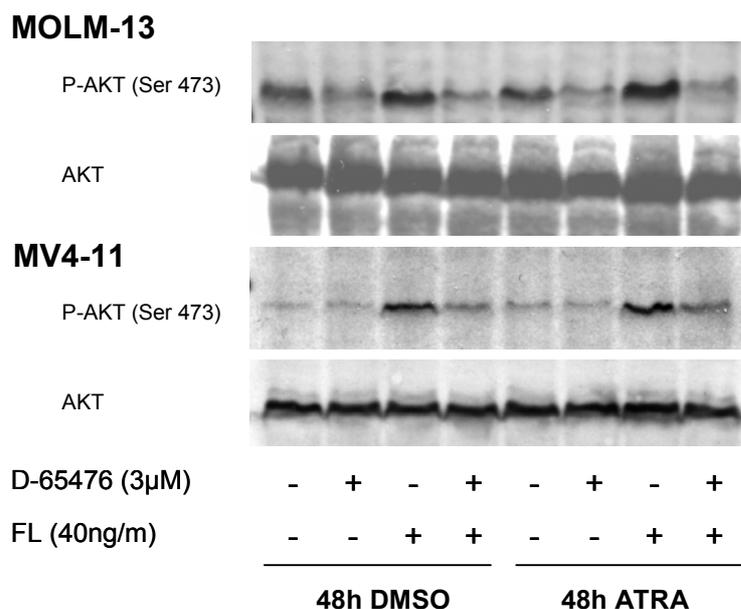


Abb. 15: Western Blot Phospho-Akt, Akt in MOLM-13 und MV4-11: Die Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 wurden mit DMSO oder ATRA für 48 h vorbehandelt. Darauf folgte die sequentielle Inkubation mit D-65476 für 30 min und FL für 10 min. Es zeigte sich unabhängig der Vorbehandlung mit DMSO oder ATRA eine vergleichbare FL-bedingte Zunahme der Akt-Phosphorylierung, die durch D-65476 supprimiert werden konnte. Es konnten somit keine ATRA-abhängigen Effekte auf die Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

5.6. Expression von Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S und Bax in Abhängigkeit von ATRA und D-65476

Nachdem kein Einfluß von ATRA auf die Phosphorylierung von Akt nachgewiesen werden konnte, erfolgten weitere Experimente zur Untersuchung der gesteigerten Apoptose bei Koinkubation von D-65476 und ATRA. Dazu wurde die Proteinexpression verschiedener Bcl-2-Proteine untersucht.

Die Familie der Bcl-2-Proteine umfaßt eine Gruppe sowohl antiapoptotisch (u.a. Bcl-2, Bcl-X_L) als auch proapoptotisch (u. a. Bcl-X_S, Bax) wirkender Proteine. Die in Abb. 16 dargestellten Western-Blots zeigen die Expression dieser Vertreter in Abhängigkeit von D-65476 und ATRA nach 48h Inkubation.

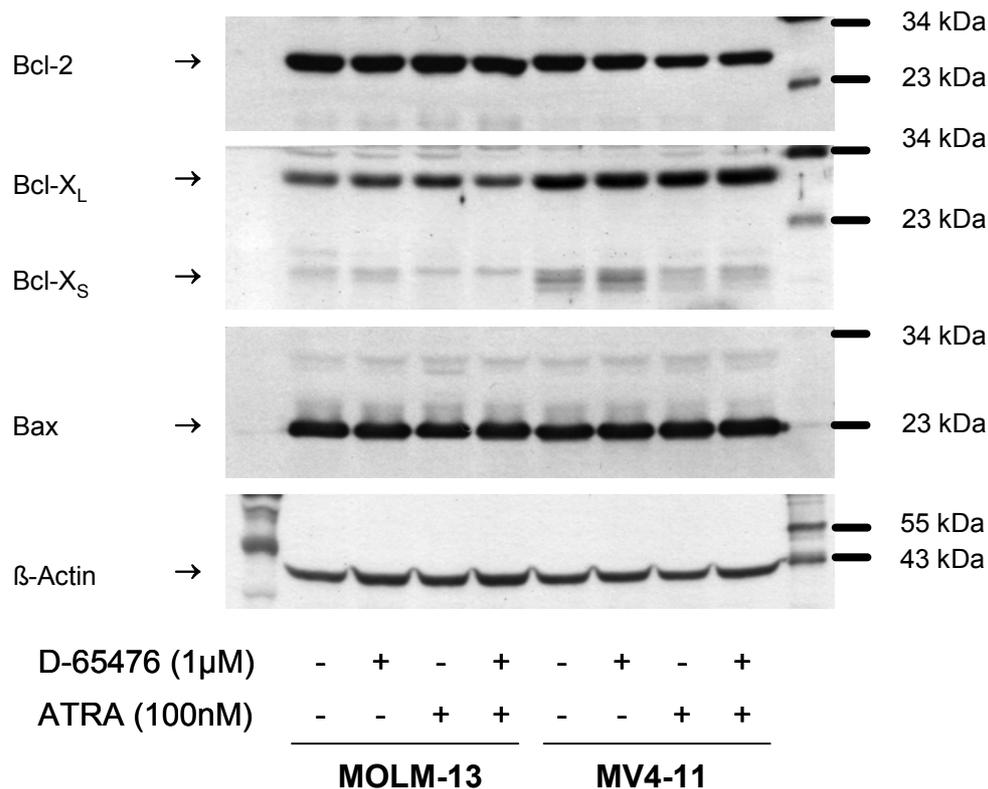


Abb. 16: Western Blot Bcl-2 (26 kDa), Bcl-X_L (26 kDa), Bcl-X_S (17 kDa), Bax (23 kDa) in MOLM-13 und MV4-11: Die Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 wurden nach dem in der Abbildung aufgeführten Schema mit D-65476, ATRA und der Kombination beider Substanzen für 48 h inkubiert und nach SDS-PAGE Western Blots angefertigt. Es zeigte sich eine von D-65476 und ATRA unabhängige, gleichmäßige Expression von Bcl-2, Bcl-X_L und Bax. Bcl-X_S zeigte eine ATRA-abhängige Downregulation in beiden Zelllinien. β-Aktin diente als Kontrolle einer gleichmäßigen Gelbeladung.

Hierbei konnte eine deutliche Bcl-2 Expression sowohl in MOLM-13 als auch in MV4-11 detektiert werden. Diese war unabhängig von der jeweiligen Inkubationsbedingung. Auch Bcl-X_L, dessen Expression in Leukämien beschrieben wurde (Campos et al. 1999) zeigte eine von der jeweiligen Inkubation unabhängige Expression. Bcl-X_S, die von der Aminosäuresequenz kürzere und proapoptotisch wirksame Variante von Bcl-X, zeigte eine ATRA-abhängige Downregulation ihrer Expression in MOLM-13 und MV4-11. Dies spricht für einen antiapoptotischen Effekt von ATRA zumindest bei isolierter Betrachtung von Bcl-X_S. Bax, ein weiterer proapoptotischer Vertreter dieser Proteinfamilie, zeigte ebenfalls eine deutliche Expression. Diese stellte sich jedoch vollkommen unabhängig von D-65476 oder ATRA dar. β-Aktin als „house-keeping“-Gen zeigte als Äquivalenzkontrolle die gleichmäßige Proteinbeladung der Gele.

5.7. Expression von Survivin, Livin und XIAP in Abhängigkeit von ATRA, G-CSF und D-65476

Als weitere mögliche Effektoren einer D-65476 und ATRA vermittelten Apoptoseinduktion wurde die Proteinfamilie der „Inhibitors of apoptosis“ (IAP) untersucht. IAP können durch Caspasebindung mittels ihrer BIR(baculovirus-IAP-Repeat)-Domäne eine, sowohl extrinsisch über FAS/TNF α , als auch eine intrinsisch über den mitochondrialen Signalweg initiierte Apoptose hemmen (de Graaf et al. 2004). Als wichtige Vertreter dieser Proteinfamilie in der Onkogenese sind Survivin, Livin und XIAP zu nennen.

Zunächst wurde die Transkription der verschiedenen Gene auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 17). Hierbei zeigte sich in der FLT3-Wildtyp tragenden Zelllinie THP-1 eine sowohl von D-65476 also auch von ATRA und G-CSF unabhängige Transkription von Survivin. Betrachtet man die FLT3-Mutation tragenden Zelllinien MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6, zeigte insbesondere MOLM-13 bei Kombination von D-65476 und ATRA eine nahezu vollständige Hemmung der Survivin-Transkription. Auch D-65476 allein konnte eine reduzierte Transkription bewirken, ATRA allein zeigte hingegen keinen Effekt.

Im Gegensatz zu deutlichen Unterschieden im Transkriptionslevel von Survivin fielen die Veränderungen der Livin-mRNA-Transkription geringer aus. Deutlich sichtbar in der Agarose-Gelelektrophorese waren zwei im UV-Licht leuchtende Banden, die die zwei Spleißvarianten der Livin-mRNA repräsentieren. Beide Spleißvarianten wirken antiapoptotisch (Ashhab et al. 2001). In THP-1 konnten analog zur Survivin-Transkription keine Transkriptionsunterschiede detektiert werden. In MOLM-13, in MV4-11 sowie in MONO-MAC-6 konnte jedoch bei Koinkubation mit D-65476 und ATRA eine Downregulation der leichteren Livin-mRNA-Variante festgestellt werden.

Als weiterer Vertreter der IAP-Familie wurde XIAP untersucht. Eine XIAP-Expression ist in AML-Blasten beschrieben worden (Tamm et al. 2000). Seine Expression korrelierte hierbei negativ mit dem Remissionsstatus und der Überlebenswahrscheinlichkeit. In den untersuchten Zelllinien zeigte sich jedoch, unabhängig vom mutierten oder unmutierten FLT3-Rezeptorstatus, eine konstante, von den jeweiligen Inkubationsbedingungen ebenfalls unabhängige XIAP-Transkription.

Zur Kontrolle des Auftrags gleicher DNA-Mengen wurde jeweils parallel eine RT-PCR mit Primern für das „house-keeping“-Gen β -Aktin durchgeführt, die konstante β -Aktin-Signale in allen Gelbanden zeigte.

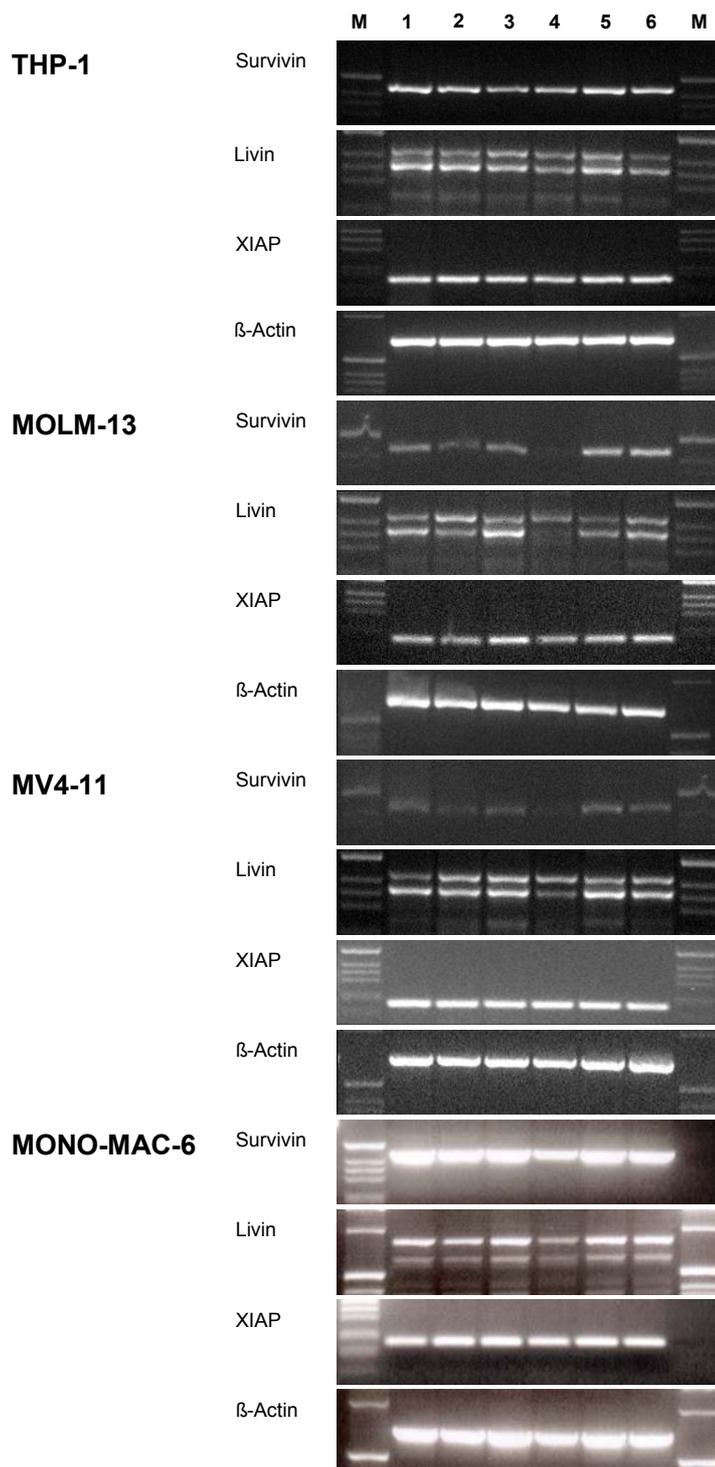


Abb.17: RT-PCR Survivin, Livin, XIAP, β -Aktin: Nach 48 h Inkubation mit 1. DMSO 0,1%, 2. D-65476 1 μ M, 3. ATRA 100 nM, 4. D-65476/ATRA, 5. G-CSF 60 ng/ml, 6. D-65476/G-CSF wurde aus den kultivierten Zelllinien mRNA isoliert und cDNA hergestellt. Anschließend erfolgte die PCR für Survivin, Livin, XIAP und β -Aktin sowie die elektrophoretische Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese. Es zeigte sich eine Hemmung der Survivin-Transkription in MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6 in Abhängigkeit von der Inkubation mit D-65476 sowie bei zusätzlicher ATRA Koinkubation. Auch die leichtere Livin-Spleißvariante wurde in den Zelllinien mit FLT3-Mutation in Abhängigkeit von D-65476/ATRA vermindert transkribiert. Die Transkription von XIAP blieb hingegen unabhängig von Mutationsstatus der Zelllinie und Inkubationsbedingung konstant. M 1 kB Ladder

Aufgrund der gezeigten Transkriptionsunterschiede der IAP's auf mRNA-Ebene wurde die Expression der antiapoptotischen Proteine Survivin und Livin im Western Blot untersucht. Hierbei sollte überprüft werden, ob veränderte mRNA-Transkriptionslevel auch tatsächlich mit Veränderungen der Proteinexpression und damit der biologischen Aktivität einhergehen. Nach Optimierung der Inkubationsbedingungen der Antikörper wurden Western Blots gegen Survivin und Livin angefertigt (Abb. 18).

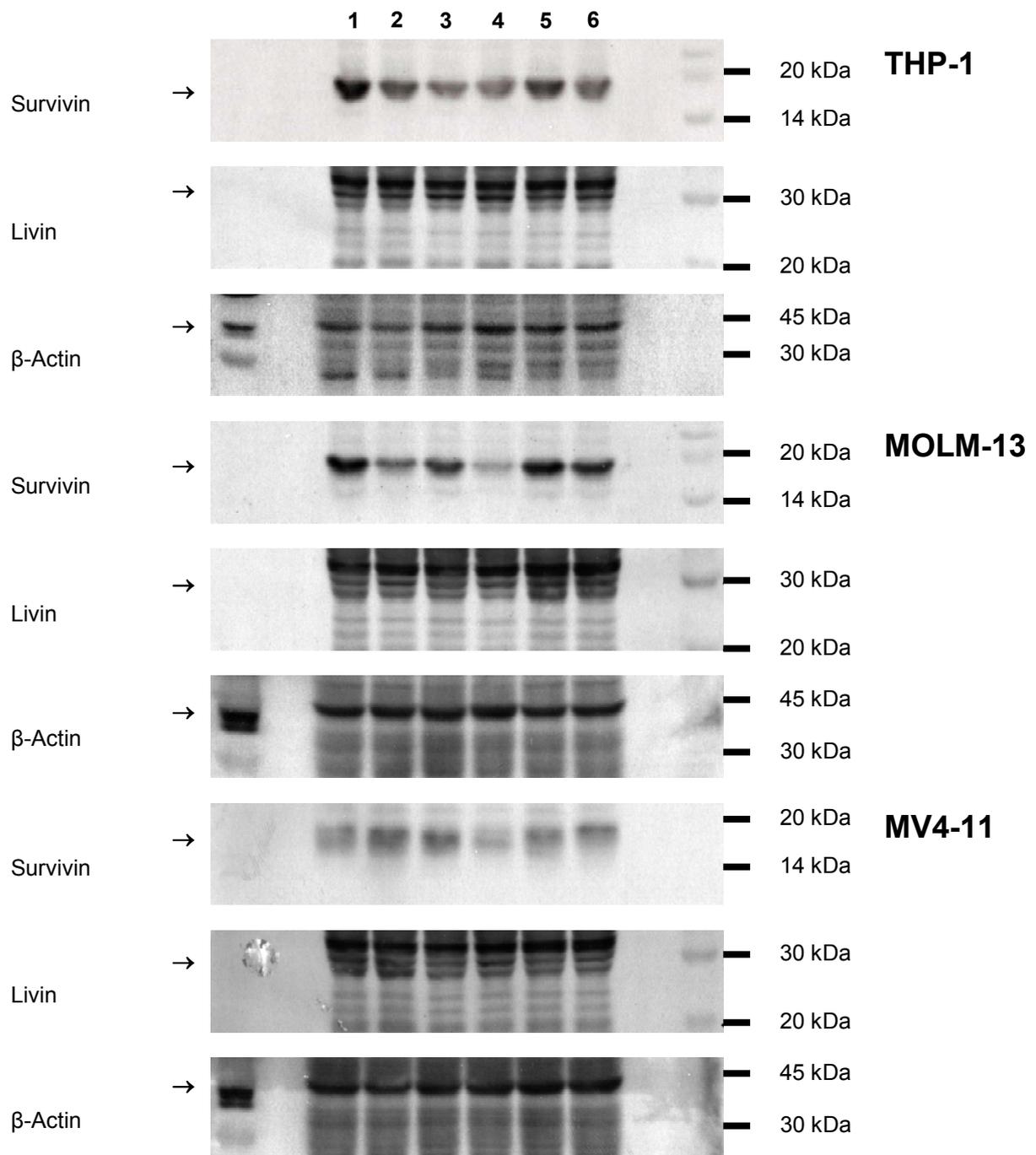
Im Immunoblot gegen Survivin mit einem Molekulargewicht von 16,5 kDa konnte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers eine einzelne Bande detektiert werden. Survivin war in allen untersuchten Zelllinien unabhängig vom FLT3-Mutationsstatus nachweisbar und deutlich exprimiert. In THP-1 zeigte sich eine weitgehend konstante Expression, allenfalls war eine leichte Suppression des Signals in den ATRA-behandelten Proben zu sehen. In MOLM-13 war eine deutliche Minderung der Survivinexpression bei Kombinationsbehandlung mit D-65476 und ATRA zu beobachten. Während D-65476 alleine schon geringe Effekte im Sinne einer Signalreduktion induzieren konnte, hatte die alleinige Behandlung mit ATRA keinen Effekt. Nur die Kombination beider Substanzen führte zu einer deutlich supprimierten Expression. G-CSF und die Kombination aus D-65476 und G-CSF zeigten weitgehend identische Expressionslevel mit der Tendenz einer verminderten Survivin-Expression bei Koinkubation.

In MV4-11 zeigte sich ein im Vergleich zu MOLM-13 weitgehend identisches Bild, jedoch war bei alleiniger D-65476 Inkubation keine reduzierte Expression zu sehen.

MONO-MAC-6 hingegen zeigte wiederum sowohl bei alleiniger D-65476 Inkubation als auch bei kombinierter Anwendung von D-65476 und ATRA eine reduzierte Expression ähnlich den Beobachtungen in MOLM-13. ATRA allein hatte hier keinen Effekt.

Im Gegensatz zur Survivin-Detektion konnte bei Inkubation der Blots mit einem polyklonalen Livin-Antikörper nur ein sehr unspezifisches Signal mit mehreren Banden detektiert werden. Dieses Signal zeigte bei aller Unspezifität eine konstant bleibende Intensität, so dass die Reduktion der kürzeren Spleißvariante auf mRNA-Ebene nicht auf Protein-Ebene reproduziert werden konnte.

In den durchgeführten Blots gegen β -Aktin war in allen untersuchten Proben ein vergleichbares Signal zu sehen, so dass von einer gleichmäßigen Beladung der Acrylamid-Gele ausgegangen werden konnte.



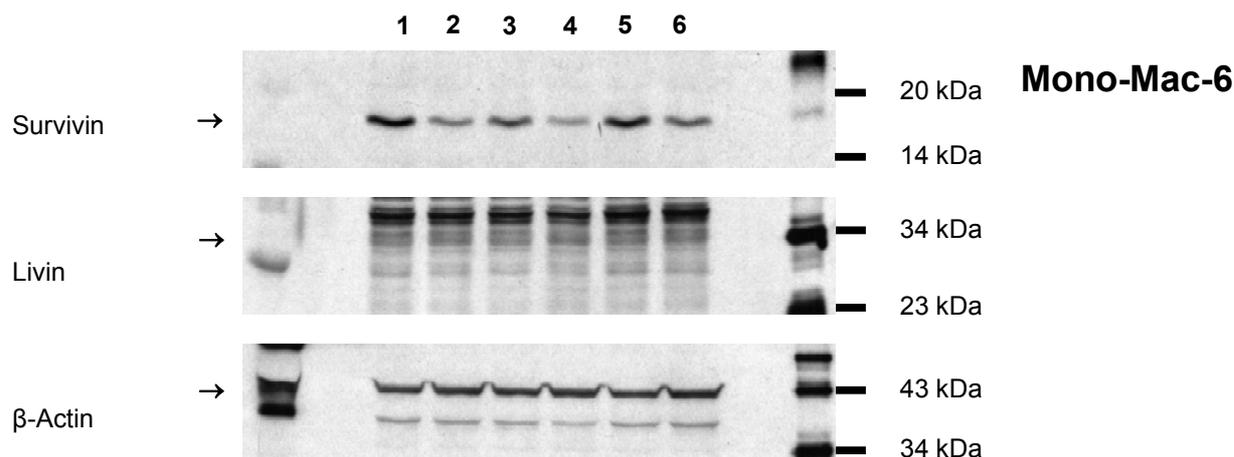


Abb.18: Western Blot Survivin und Livin in THP-1, MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6: Nach 48 h Inkubation mit 1. DMSO 0,1%, 2. D-65476 1µM, 3. ATRA 100 nM, 4. D-65476/ATRA, 5. G-CSF 60 ng/ml, 6. D-65476/G-CSF wurden Proteinlysate hergestellt und nach Auftrennung mittels SDS-PAGE Western Blots mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

In MOLM-13 und MONO-MAC-6 zeigte sich sowohl nach D-65476 Inkubation, als auch nach kombinierter Inkubation mit D-65476/ATRA eine Downregulation der Survivinexpression. In MV-4-11 war lediglich nach Koinkubation mit beiden Substanzen eine Downregulation feststellbar. Die Livin-Detektion war durch ein hohes Hintergrundsignal belastet und konnte keine Expressionsunterschiede zeigen.

Western Blots gegen β -Aktin konnten die gleichmäßige Beladung der Gele bestätigen.

5.8. Kinetik der Survivinexpression in MV4-11 und MOLM-13 in Abhängigkeit von ATRA und D-65476

Im folgenden wurde die Survivin-Expression in den beiden Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 im Verlauf von 48 h untersucht (Abb. 19). Hierbei wurden von den jeweils mit D-65476 bzw. ATRA inkubierten Ansätzen nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Zellen entnommen und Proteinlysate hergestellt. Hintergrund dieses Experiments war, ob sich D-65476- bzw. ATRA-induzierte Veränderungen sehr rasch nach Behandlung mit den beiden Substanzen ergeben und damit eher auf eine veränderte Signaltransduktion zurückzuführen sind, oder ob die beobachteten Veränderungen Ergebnisse eines veränderten Transkriptionsprogrammes mit der Notwendigkeit der längerwährenden Neusynthese von Proteinen darstellen.

Betrachtet man zunächst die Zelllinie MOLM-13, so veränderte sich die Survivin-Expression in den ersten 12h nach Inkubationsbeginn nicht. Erst nach 24h war eine verminderte Expression bei Koinkubation mit D-65476/ATRA angedeutet, die erst nach 48h deutlich vermindert war.

In MV4-11 war schon nach 24h eine deutliche, von D-65476 abhängige Reduktion der Survivin-Expression nachzuweisen, die sich auch nach 48h nicht wesentlich änderte.

Festzuhalten ist, dass die D-65476/ATRA induzierte Survivin-Expressionsänderung erst mit einer gewissen Latenz (48h bei MOLM-13, 24h bei MV4-11) zu detektieren war.

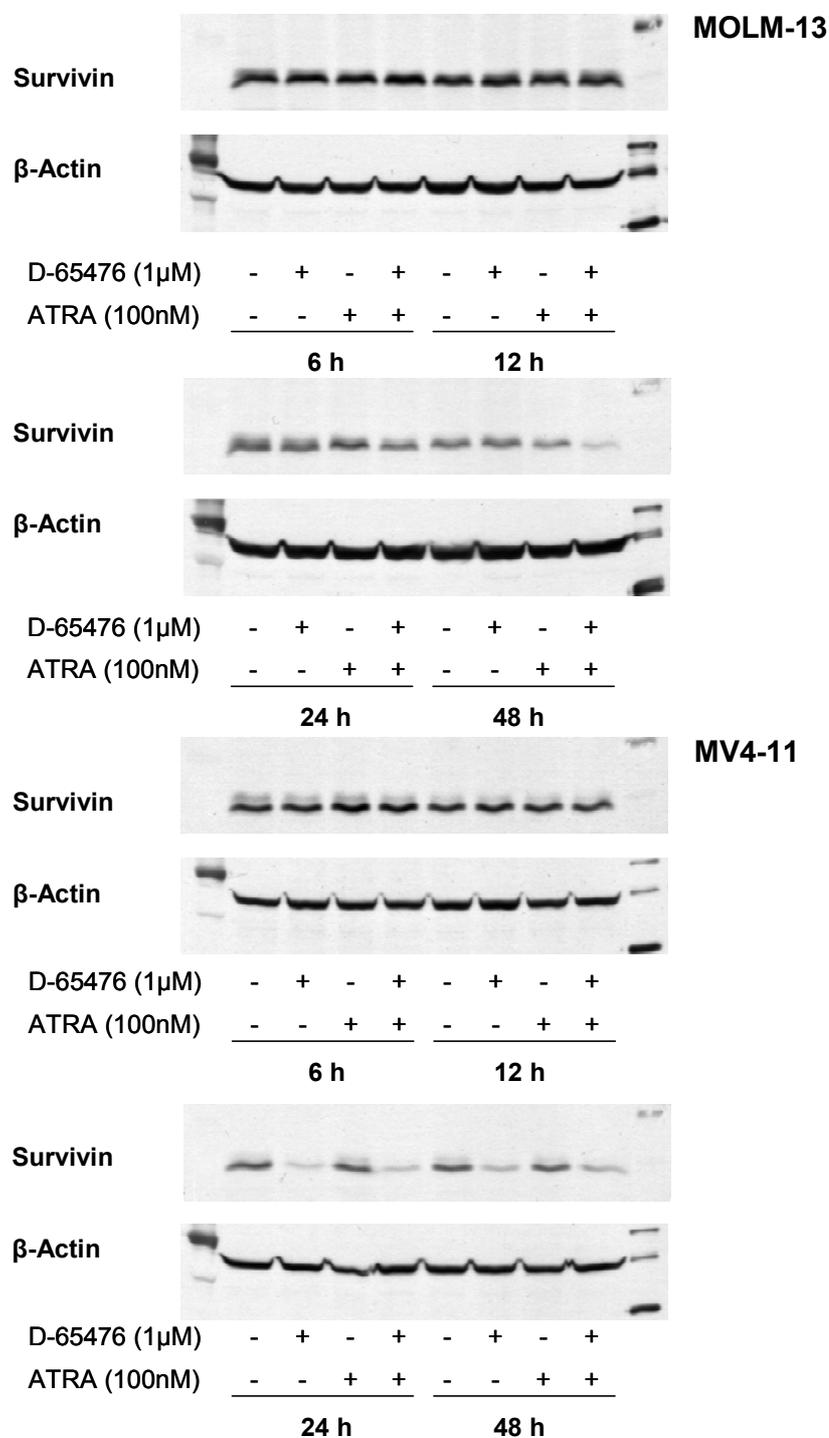


Abb.19: Survivin-Expression in MOLM-13 und MV4-11 im Verlauf von 48 h: Western Blot nach Inkubation mit D-65476, ATRA und deren Kombination im Verlauf von 48h wie unter den Western Blots aufgeführt. In beiden Zelllinien ließ sich eine D-65476/ATRA-induzierte Downregulation der Survivin-Expression erst nach frühestens 24 h nachweisen. β -Aktin als Äquivalenzkontrolle

5.9. Untersuchung auf zellzyklusabhängige Regulation von Survivin in MOLM-13 und MV4-11

Für das Protein Survivin wird in mehreren Quellen eine zellzyklusabhängige Expression beschrieben (Li et al. 1999). Es stellt sich somit die Frage nach Ursache und Wirkung. Ist der Auslöser für eine verstärkte Apoptose und Zellzyklus-Arrest eine D-65476/ATRA vermittelte Survivin-Downregulation oder ist die Survivin-Downregulation ein Begleitphänomen einer D-65476/ATRA vermittelten Verschiebung des Zellzyklus.

Um eine zellzyklusabhängige Survivin-Expression in den untersuchten Modell-Zelllinien zu überprüfen, wurden die Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 mit Substanzen behandelt, die bestimmte Zellzyklusverschiebungen hervorrufen können. Dabei handelt es sich um die Substanzen L-Mimosine und Nocodazole. L-Mimosine behandelte Zellpopulationen zeigen eine Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus. Für diese Phase ist eine verminderte Survivin-Expression beschrieben. Nocodazole wiederum bewirkt eine Verschiebung des Zellzyklus in Richtung G₂/M-Phase, eine Phase der verstärkten Survivin-Expression.

Wurden die beiden FLT3-ITD-Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 mit L-Mimosine in einer Konzentration von 400 µM inkubiert, so konnte hier, im Einklang mit der Literatur (Watson et al. 1991), eine deutliche Umverteilung des Zellzyklus in Richtung G₁ in der durchflußzytometrischen Analyse festgestellt werden (Abb. 20). Bei Inkubation mit Nocodazole in einer Konzentration von 40 ng/ml für 48 h konnte entsprechend eine umgekehrte Verteilung in Richtung G₂/M-Phase beobachtet werden. Diese war deutlicher ausgeprägt in MOLM-13, während in MV4-11 die Kontrolle bereits einen höheren G₂/M-Anteil im Vergleich zur Nocodazole-behandelten Population aufwies (Abb. 20). Hinsichtlich der Survivin-Expression zeigte der Western-Blot in MOLM-13 angedeutet eine geringere Expression bei Inkubation mit L-Mimosine, deutlicher ausgeprägt in MV4-11. Bei Nocodazole-Inkubation wiesen beide Zelllinien wieder eine leicht angehobene Survivin-Expression auf (Abb. 21c). Die beiden Substanzen bewirkten jedoch keine alleinigen Zellzyklusverschiebungen, vielmehr war auch eine deutliche Apoptoseinduktion durchflußzytometrisch zu messen (siehe Abb. 21a Abszisse: Propidiumjodid positiv; Ordinate: Annexin positiv; Abb. 21b).

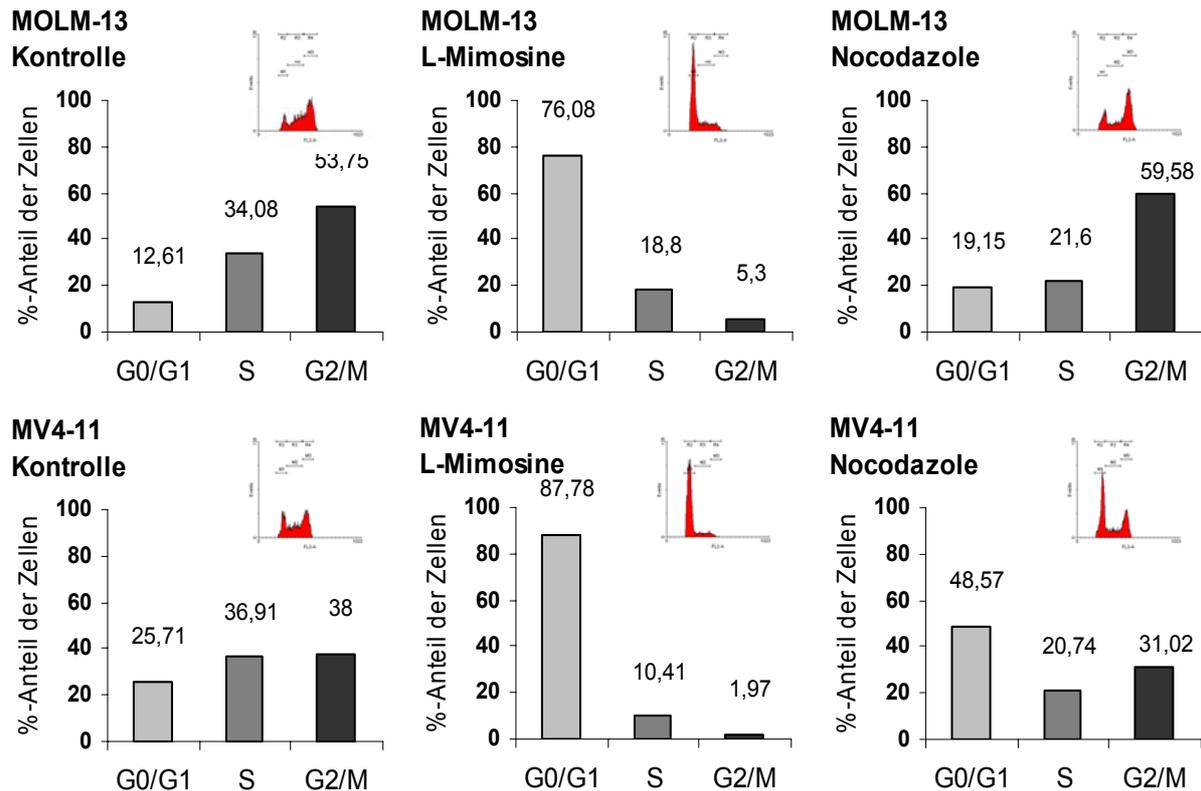


Abb. 20: Zellzyklusverteilung in MOLM-13 und MV4-11 in Abhängigkeit von L-Mimosine, Nocodazole: Die Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 wurden 48 h mit L-Mimosine 400 μ M bzw. Nocodazole 40 ng/ml inkubiert. Nach Propidiumiodid-Färbung wurde die Zellzyklusverteilung durchflußzytometrisch bestimmt. Histogramm Daten der Zellzyklusverteilung sind als Inlet dargestellt. Die Balkendiagramme veranschaulichen die Zellzyklusverteilung auf die 3 Phasen G0/G1, S und G2/M.

L-Mimosine konnte in beiden Zelllinien eine deutliche Zellzyklusverschiebung zugunsten der G0/G1-Phase induzieren. Nocodazole zeigte lediglich in MOLM-13 eine Umverteilung des Zellzyklus in Richtung G2/M, in MV4-11 war der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase nach Nocodazole-Behandlung niedriger als in der Kontrolle.

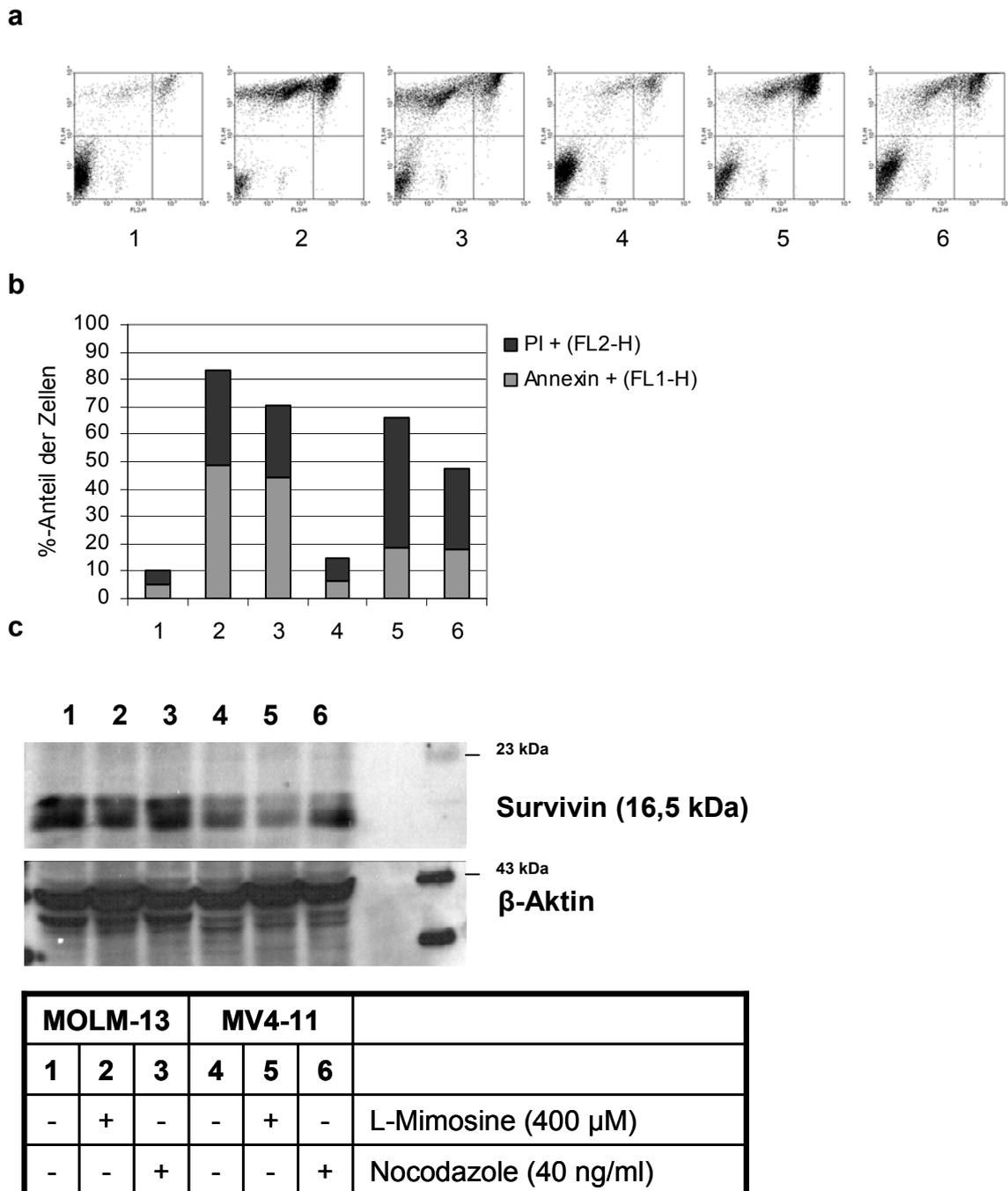


Abb. 21: Apoptoseinduktion in MOLM-13 und MV4-11 nach 48 h Inkubation mit L-Mimosine und Nocodazole (1. MOLM-13 Kontrolle, 2. MOLM-13 L-Mimosine, 3. MOLM-13 Nocodazole, 4. MV4-11 Kontrolle, 5. MV4-11 L-Mimosine, 6. MV4-11 Nocodazole): **a** Dargestellt sind die Dot-Plots nach durchflußzytometrischer Messung Annexin V- und Propidiumiodid-gefärbter Zellen. Hierbei stellen sich PI-positive Zellen im rechten unteren Quadranten dar, Annexin V positive Zellen im linken oberen Quadranten. Doppelt positive Zellen stellen sich entsprechend im oberen rechten Quadranten dar. **b** Balkendiagramm des Anteils Annexin V-/PI-positiver Zellen. Es zeigt sich in beiden Zelllinien eine, die Zellzyklusverschiebung begleitende, deutliche Apoptoseinduktion durch die untersuchten Substanzen, insbesondere durch L-Mimosine **c** Western Blot gegen Survivin: Nach Inkubation der Zelllinien mit L-Mimosine/Nocodazole wurden Proteinlysate hergestellt und nach SDS-PAGE ein Western Blot angefertigt. Hier zeigte sich, in MOLM-13 angedeutet und in MV4-11 deutlich sichtbar, eine L-Mimosine vermittelte Survivin-Downregulation. Ein Western Blot gegen β -Aktin bestätigte die gleichmäßige Gelbeladung.

6. Diskussion

Zur Charakterisierung FLT3-abhängiger Signaltransduktionswege wurden die Zelllinien THP-1 als FLT3-Wildtyp-tragende Zelllinie, MOLM-13 und MV4-11 als Stellvertreter der Zelllinien mit Mutation in Form einer internen Tandemduplikation (ITD) sowie MONO-MAC-6 als Zelllinie mit einer Punktmutation in der juxtamembranen Domäne ausgewählt. Hierbei handelt es sich allesamt um Zelllinien, die von Patienten mit AML FAB-Subtyp M5 isoliert wurden. Mit Hilfe dieser Zellkulturmodelle sollte in Inkubationsversuchen der Einfluß des FLT3-Inhibitors D-65476 sowie von Differenzierungsinduzierenden Substanzen wie ATRA und G-CSF auf Zellbiologie und Signaltransduktion hin untersucht werden.

Die untersuchten Zelllinien waren schon zuvor bezüglich ihrer FLT3-Expression und ihres Mutationsstatus charakterisiert worden (Quentmeier et al. 2003, Spiekermann et al. 2003). Mittels Oberflächenmarkierung durch einen fluorochromassozierten FLT3-Antikörper konnte die Expression der Rezeptortyrosinkinase auf den Zelllinien in Kultur bestätigt werden und damit eventuell vorhandene Expressionsveränderungen aufgrund von Zellkulturbedingungen ausgeschlossen werden. Die Immunpräzipitation der FLT3-Rezeptortyrosinkinase mit Darstellung im Western Blot bestätigte diese durchflußzytometrisch erhobenen Daten. In Einklang mit von Teller et al. 2002 publizierten Daten konnte hier eine nach Inkubation mit dem Bis-indolyl-methanon D-65476 konzentrationsabhängige Abnahme der Rezeptortyrosinphosphorylierung detektiert werden. Zusätzliche Inkubation mit FL verstärkte entsprechend die Rezeptorphosphorylierung, beeinträchtigte die konzentrationsabhängige Wirkung von D-65476 jedoch nicht.

Zusammenfassend konnte in diesen Untersuchungen sowohl die Expression der FLT3-Rezeptortyrosinkinase als auch die konzentrationsabhängige Wirksamkeit von D-65476 auf die Rezeptorphosphorylierung bestätigt werden.

In der Zelllinie MONO-MAC-6 wurden nach Immunpräzipitation zusätzliche Western Blots durchgeführt, um FLT3-assoziierte Proteine zu untersuchen. Dabei konnten die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 nachgewiesen werden. Von Zhang et al. wurde 1999 schon für SHP-2 eine Bindung an FLT3 über Grb2 und eine FLT3-abhängige Tyrosinphosphorylierung beschrieben. Interessanterweise zeigte sich eine von D-65476 konzentrationsabhängige Bindung von SHP-2 an FLT3 mit einer Abnahme der SHP-2-Bindung bei erhöhter D-65476-Konzentration. Ob dieser Effekt indirekt über die Hemmung der FLT3-Phosphorylierung oder

direkt über eine kompetitive Verdrängung von SHP-2 durch D-65476 an FLT3 zustande kommt, bleibt offen. Betrachtet man den Western Blot gegen phosphorylierte Tyrosinreste nach D-65476 Inkubation, so zeigte sich hier eine im Bereich des Molekulargewichts von SHP-2 bei 70 kDa liegende, von D-65476 abhängige Abnahme der phosphorylierten Tyrosinreste. Dies korreliert mit den von Zhang et al. 1999 publizierten Daten über eine FLT3-abhängige Phosphorylierung von SHP-2. Die hier durchgeführten Experimente können jedoch nicht beweisen, ob die beschriebene Phosphorylierung wirklich SHP-2 zugeordnet werden kann.

Die im Western Blot gegen SHP-1 detektierte Bande in den Immunpräzipitaten darf nicht als Assoziation von SHP-1 an FLT3 gedeutet werden, da auch in der Kontrolle, in der Protein A-Sepharose ohne FLT3-Antikörper inkubiert wurde, ein SHP-1-Signal nachzuweisen war. Dementsprechend kann eine unspezifische Bindung von SHP-1 an die Protein-A-Sepharose nicht ausgeschlossen werden.

Von Zhang et. al konnte 1999 weiterhin eine Bindung des PI3-Kinase-Adapterproteins p85 an FLT3 in THP-1-Zellen und Baf3/FLT3-Zellen nicht beobachtet werden, eine Assoziation von p85 mit phosphoryliertem SHP-2 wurde jedoch beschrieben. In den vorliegenden Blots ließ sich jedoch eindeutig eine von D-65476 konzentrationsabhängige Assoziation von p85 mit FLT3 dokumentieren. Zu diskutieren ist hier eine, wenn nicht direkte Bindung von p85 an FLT3, dann zumindest eine Assoziation über Adapterproteine oder SHP-2.

Mit Hilfe durchflußzytometrischer Methoden wurde der Einfluß des FLT3-Inhibitors D-65476 alleine und in Kombination mit den differenzierungsinduzierenden Substanzen ATRA und G-CSF auf Proliferation, Apoptose, Zellzyklusverteilung und Differenzierungsinduktion untersucht.

Es zeigte sich in THP-1 ein von D-65476 unabhängiges Verhalten. ATRA hatte eine differenzierungsinduzierende Wirkung auf THP-1, G-CSF war ohne Einfluß auf die CD11b-Expression von THP-1. In den FLT3-ITD-Mutation-tragenden Zelllinien sowie in MONO-MAC-6 zeigten sich keine ATRA- bzw. G-CSF abhängigen Effekte. Auch zusätzliche Inkubation mit D-65476 konnte keine Differenzierung initiieren. Diese Beobachtungen bestätigen zum Teil die bereits in früheren Arbeiten publizierte FLT3-ITD-Mutation-vermittelte Blockade der myeloischen Differenzierung. Zum anderen war jedoch in einer 2002 publizierten Arbeit (Zheng et al. 2002) die Differenzierungsblockade FLT3-ITD transfizierter 32D-Zellen nach Inkubation mit CEP-701, einem FLT3-Inhibitor, aufzuheben bzw. konnte nach Inkubation mit CEP-701 durch Hinzunahme von G-CSF eine myeloische

Differenzierung induziert werden. Zu diskutieren ist, ob FLT3-ITD-Mutationen in dem von Zheng verwendeten murinen 32D-Modell ein stärkeres Gewicht in der Differenzierungsblockade einnehmen als in vom Menschen stammenden Leukämiezelllinien mit zusätzlichen zytogenetischen Aberrationen und möglichem Einfluß auf die myeloische Differenzierung. Potentiell können hier auch inhibitorspezifische Wirkungen eine Rolle spielen.

Ergänzend zu dem durchflußzytometrisch gemessenen Oberflächenmarker einer myeloischen Differenzierung wurden im Western Blot die Expression der mit myeloischer Differenzierung assoziierten Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PU.1 untersucht. PU.1, ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der ets-Transkriptionsfaktoren, zeigt in Expressionsanalysen isolierter Leukozytenpopulationen unterschiedlichen Differenzierungsstadiums eine kontinuierlich mit fortschreitender myeloischer Differenzierung assoziierte Zunahme der Expression. C/EBP α , in seiner als p42-Protein exprimierten aktiven Variante (p30 stellt die N-terminal-verkürzte Repressor-Variante dar) zeigt eine kontinuierliche Expression während der myeloischen Differenzierung (Bjerregaard et al. 2003).

In Arbeiten von Mizuki konnte gezeigt werden, dass die ligandenaktivierte Wildtyp-FLT3-Rezeptortyrosinkinase PU.1 sowie C/EBP α induzieren kann, während FLT3-ITD-Rezeptortyrosinkinasen im 32D-Modell zu einer Suppression der PU.1- und C/EBP α -Expression führen (Mizuki et al. 2003). PU.1 ist nach DeKoter et al. 2002 insbesondere für die Weichenstellung in Richtung monozytäre und B-Lymphozyten-Linie im Kontext der frühen Hämatopoese von Bedeutung. Mit diesen Funktionen wird auch die FLT3-Wildtyp-Rezeptortyrosinkinase in Verbindung gebracht. Eine FLT3-ITD-Mutation-vermittelte PU.1 Suppression könnte zu der bei AML bestehenden Differenzierungsblockade zumindest teilweise beitragen.

C/EBP α , dessen alterierte Funktion – sei es durch Mutation oder Suppression seiner Funktion – ein häufig beobachtetes Merkmal der AML darstellt, ist in seiner Funktion essentiell für die granulozytäre Differenzierung (Wang et al. 2002) und hat darüberhinaus antiproliferative Effekte durch Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen cdk2 und cdk4 (Wang et al. 2001). So finden sich alleine schon in der FLT3-ITD-vermittelten Suppression von C/EBP α die in der „two-hit“-Hypothese beschriebenen Bedingungen für die Entstehung der AML wieder, sowohl die Differenzierungshemmung, als auch die verstärkte, unkontrollierte Proliferation.

Die durchgeführten Western Blots zur Expressionsanalyse von PU.1 und C/EBP α waren insgesamt durch unspezifische Antikörperbindung mit einem hohen Hintergrundsignal belastet und dadurch schwer zu interpretieren. In THP-1 führte die Inkubation mit ATRA, unabhängig ob mit oder ohne D-65476 zu einem erhöhten Signal für die kürzere (Repressor)-Spleißvariante des C/EBP α -Proteins. Keine Auswirkungen wurden bei der p42 Spleißvariante von C/EBP α sowie bei PU.1 gesehen.

In MOLM-13 induzierte ATRA sowohl bei PU.1 als auch bei beiden Spleißvarianten von C/EBP α ein höheres Expressionsniveau, dies jedoch nur in Abwesenheit von D-65476. Die Kombination von ATRA und D-65476 zeigte hingegen Expressionslevel auf Niveau der Kontrolle mit DMSO.

In der Zelllinie MV4-11 war nur für die Kombination ATRA und D-65476 ein geringer Effekt im Sinne einer stärkeren PU.1-Expression zu sehen, das C/EBP α -Signal blieb unter allen untersuchten Bedingungen gleich.

In MONO-MAC-6 fiel auf, dass sowohl bei PU.1 als auch bei C/EBP α in seinen beiden Spleißvarianten eine geringere Expression nach kombinierter Behandlung mit ATRA und D-65476 auftrat.

Zusammenfassend betrachtet sind die mit den Antikörpern gegen PU.1 und C/EBP α durchgeführten Western Blots aufgrund des hohen Hintergrundsignals und der geringen Expressionsunterschiede, die auch durch geringfügig unterschiedliche Beladung der Gele zustande gekommen sein könnten, schwierig zu deuten.

In den Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung der Zellkulturen konnte, analog der Differenzierungsmarkerinduktion, in THP-1 ein ATRA-abhängiger Effekt detektiert werden. In der mit ATRA behandelten Zellpopulationen war – von D-64576 unabhängig – eine Abnahme der sich in Teilung befindlichen Zellfraktion (S-Phase, G₂ und M-Phase) um rund die Hälfte zu verzeichnen, entsprechend war ein erhöhter Anteil von Zellen in der G₀ und G₁-Phase zu beobachten.

In den FLT3-ITD-Mutation-tragenden Zelllinien sowie in MONO-MAC-6 mit einer aktivierenden Punktmutation in der juxtamembranen Domäne zeigte sich eine D-65476-abhängige Abnahme der in Teilung befindlichen Zellfraktion (S, G₂ und M-Phase) zugunsten einer Verschiebung des Zellzyklus in Richtung G₀ und G₁-Phase, sowie einer Zunahme der sub- G₁-Fraktion als Zeichen einer Zunahme apoptotischer Zellen. ATRA konnte in den Zelllinien mit FLT3-Mutation zusätzliche Effekte induzieren. So war in MOLM-13 eine deutliche Abnahme der sich in Teilung befindlichen Zellfraktion zu verzeichnen (D-65476:

12,5%; ATRA/D-65476: 3,6%; $p=0,04$); in MV4-11 fielen hingegen die Unterschiede geringer aus (D-65476: 14,1%; ATRA/D-65476: 9,8%; $p=0,28$), in MONO-MAC-6-Kulturen war bei anteilig gleichbleibendem S/G₂/M-Anteil eine deutliche Umverteilung von Zellen innerhalb der G₀ und G₁-Phase (D-65476: 43,5%; ATRA/D-65476: 31,8%) zur sub-G₁-Fraktion (D-65476: 46,7%; ATRA/D-65476: 58,1%) als Hinweis auf eine Zunahme apoptotischer Zellen zu beobachten.

Parallel zu den durchflußzytometrischen Zellzyklusuntersuchungen wurden Apoptoseuntersuchungen mittels des Annexin-V-Assays durchgeführt. Auch hier zeigte sich ein zu den bisherigen Ergebnissen konkordantes Bild. In der FLT3-Wildtyp-Zelllinie THP-1 konnte D-65476 keine Apoptose induzieren. Lediglich ATRA konnte hier Apoptose induzieren, sichtbar an einer nahezu Verdopplung des Anteils apoptotischer Zellen ($p=0,02$). In MOLM-13 riefen D-65476 und ATRA apoptoseinduzierende Effekte hervor. D-65476 allein führte bereits zu einer Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zu Ausgangsbedingungen ($p=0,02$). Die Kombination mit ATRA führte zu einer mehr als Verdreifachung des Anteils apoptotischer Zellen verglichen mit D-65476 allein ($p=0,03$). In MV4-11 und MONO-MAC-6 zeigte sich ein etwas geringerer ATRA-abhängiger Effekt, die Zunahme apoptotischer Zellen bei kombinierter Behandlung mit D-65476 und ATRA lassen auch hier additive Effekte hinsichtlich der Apoptoseinduktion vermuten.

Zur Ergänzung der durch die Zellzyklusverteilung und Apoptose-Assays erhobenen Daten wurden CFSE-Proliferationsassays durchgeführt. Hierbei korreliert die Fluoreszenzintensität der CFSE-gelabelten Zellen indirekt mit der mitotischen Aktivität. Entsprechend den bisherigen Ergebnissen konnten in THP-1 nur ATRA-abhängige Effekte detektiert werden. In MOLM-13 und MV4-11 wurde die durch D-65476 induzierte verminderte Proliferationsaktivität durch ATRA signifikant verstärkt (MOLM-13: $p=0,0004$; MV4-11: $p=0,0003$). G-CSF hatte in den FLT3-ITD-positiven Zelllinien nur dann einen proliferativen Effekt, wenn die FLT3-Signaltransduktion durch D-65476 blockiert wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Suppression G-CSF-abhängiger Signaltransduktionswege durch die FLT3-Tandemduplikationen.

Der Frage nachgehend, welche Veränderungen für die ATRA-abhängigen Effekte hinsichtlich Apoptose, Proliferation und Zellzyklusverteilung verantwortlich sind, wurde die PI3-Kinase/Akt-abhängige Signaltransduktion in den FLT3-ITD-Zelllinien MOLM-13 und MV4-

11 untersucht. Ishida et al. 2004 zeigten an HL-60-Zellen der akuten Promyelozytenleukämie eine ATRA-abhängige Downregulation der Beta-Isoform der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase einhergehend mit einer ATRA-abhängigen Abnahme der HL-60-Proliferation. Konstitutive PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion, nachgewiesen in Primärkulturen der AML führt zu verminderter Suszeptibilität für Chemotherapeutika wie beispielsweise Cytarabin oder Etoposid. Blockade dieses Signalweges mittels PI3-Kinase- oder Akt-selektiven Inhibitoren stellt die Empfindlichkeit für derartige zytotoxische Substanzen wieder her (Grandage et al. 2005).

Aufgrund der schwierigen Detektion des basalen Phosphorylierungslevels an Serin 473 von Akt wurde folgender Versuchsansatz durchgeführt: Zellkulturansätze der FLT3-ITD-tragenden Zelllinien wurden nach 48h Vorinkubation mit DMSO oder ATRA im folgenden sowohl mit D-65476 und FL allein sowie in Kombination behandelt. Dabei zeigte sich kein ATRA-abhängiger Einfluß auf die D-65476 vermittelten Effekte, insbesondere kein Effekt im Sinne einer verminderten Phosphorylierung von Akt im ATRA-vorbehandelten Ansatz. Hieraus darf gefolgert werden, dass in den untersuchten Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 die ATRA-abhängigen Effekte auf Zellzyklusverteilung, Apoptose und Proliferation wahrscheinlich nicht durch Veränderungen im Akt-Signalweg (Expression, Phosphorylierung) vermittelt werden.

Auf der Suche nach weiteren möglichen Zielproteinen einer durch ATRA verstärkten Apoptoseinduktion wurde die Proteinfamilie der Inhibitors of apoptosis (IAP) näher untersucht. IAP's sind eine Familie von Apoptose-inhibierenden Proteinen mit jeweils einer oder mehreren sog. BIR-Domänen (Baculovirus-IAP-Repeat-Domain). Durch Bindung und damit Hemmung von Caspasen, den Effektorproteinen der Apoptose, ist es diesen Proteinen möglich, hemmend in den Apoptosevorgang einzugreifen und somit die Schwelle einer möglichen Apoptoseinduktion anzuheben (de Graaf et al. 2004).

Survivin, ein bedeutender Vertreter dieser Proteinfamilie, zeigt eine selektive tumorspezifische Expression und ist in differenzierten Geweben nicht zu finden. Neben der Funktion als IAP mit Hemmung der intrinsischen (mitochondrialen) Apoptoseinduktion durch Interaktion und Hemmung der Caspase-9 spielt Survivin in der Zellzyklusregulation eine Rolle (Beltrami et al. 2004).

Zunächst konnte in semiquantitativen PCR-Untersuchungen aus RNA synthetisierter cDNA in allen untersuchten Zelllinien eine Survivin-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Wurde die Zelllinie THP-1 mit D-65476, ATRA und G-CSF nach vorbeschriebenem

Schema für 48 h inkubiert, zeigte sich ein gleichbleibendes Survivin-Signal. Interessanterweise konnte jedoch in den FLT3-mutierten Zelllinien MOLM-13, MV4-11 und MONO-MAC-6 eine D-65476 abhängige Downregulation der Survivin-mRNA beobachtet werden. Darüberhinaus war bei zusätzlicher Inkubation mit ATRA in einer Konzentration von 100 nM eine deutlich sichtbare, zusätzliche Downregulation des Survivin-mRNA-Signals zu sehen. Alleinige G-CSF-Behandlung hatte hingegen auf den Survivin-mRNA-Gehalt keine Effekte, G-CSF konnte jedoch eine D-65476 vermittelte Downregulation auf mRNA-Ebene antagonisieren. Zur Validierung dieser mittels PCR gewonnenen Ergebnisse bzw. Überprüfung, ob Unterschiede des mRNA-Gehaltes sich in entsprechenden Unterschieden der Proteinexpression widerspiegeln und damit biologisch wirksam werden, wurden Western Blots durchgeführt. Survivin konnte in allen untersuchten Zelllinien unabhängig vom FLT3-Rezeptorstatus detektiert werden, was sein Vorkommen und die damit zu vermutende antiapoptotische Rolle innerhalb der untersuchten Zelllinien unterstreicht. Die ATRA- bzw. D-65476-abhängige Downregulation war identisch zu den auf mRNA-Ebene in der PCR beschriebenen Veränderungen.

Carter et al. konnten schon in früheren Experimenten eine ATRA-vermittelte Survivin-Downregulation zeigen (Carter et al. 2001). In den dort untersuchten Bedingungen wurde ATRA jedoch in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt und eine Inkubationszeit von 48 bis 96 h gewählt. Im Unterschied dazu konnte in den jetzigen Untersuchungen schon mit 10% (100nM) der von Carter untersuchten Dosis ein deutlicher Effekt in Kombination mit dem FLT3-Inhibitor D-65476 gesehen werden. ATRA konnte schon in einer Konzentration von 100 nM eine Verstärkung der D-65476-vermittelten Survivin-Downregulation bewirken und die proapoptotische Wirkung von D-65476 unterstützen.

Es bleibt weiterhin zu berücksichtigen, dass Survivin zellzyklusabhängig exprimiert wird, mit verstärkter Expression während der G₂- und M-Phase (Li et al. 2000). Ob die Survivin-Downregulation letztendlich die Folge eines Zellzyklusarrests darstellt oder ob eine verstärkte Apoptose durch eine verminderte Survivin-Expression vermittelt wird und der Zellzyklusarrest ein Sekundärphänomen darstellt, läßt sich nur schwer trennen. Um eine zellzyklusabhängige Expression in den FLT3-ITD-tragenden Zelllinien zu überprüfen, wurden diese mit L-Mimosine oder Nocodazole inkubiert, Substanzen, die eine Zellzyklusverschiebung in Richtung G₀/G₁ (L-Mimosine), beziehungsweise in Richtung G₂/M-Phase (Nocodazole) induzieren (Watson et al. 1991, Akiyama et al. 1999). Hierbei bestätigte sich die zellzyklusabhängige Expression von Survivin mit insbesondere in MV4-11 nach Mimosine-Inkubation verminderter Expression. In MOLM-13 waren die Unterschiede im

Expressionslevel im Western Blot weniger deutlich. Es scheint also auch in den FLT3-ITD-tragenden Zelllinien MOLM-13 und MV4-11, zumindest bei Inkubation mit zellzyklussynchronisierenden Substanzen, ein die Zellzyklusverschiebung begleitender Unterschied im Expressionslevel von Survivin zu existieren. Festzuhalten bleibt jedoch, dass zumindest in MV4-11 durch Hinzunahme von ATRA zu D-65476 eine verstärkte Apoptoseinduktion und Survivin-Downregulation nicht von entsprechend signifikanten, ATRA-abhängigen Zellzyklusverschiebungen begleitet wird.

Im folgenden wurden Survivin-Expressionslevel im Verlauf der 48 h Inkubation mit D-65476 und ATRA in MOLM-13 und MV4-11 bestimmt. In beiden Zelllinien ließ sich frühestens nach 24 h eine D-65476- sowie ATRA-abhängige Downregulation von Survivin beobachten. Dies ist zumindest ein Hinweis dafür, dass am ehesten Prozesse verantwortlich zu machen sind, die einer Neusynthese von Proteinen bedürfen. Eine alleinige, „schnelle“ Änderung der Signaltransduktion, zum Beispiel mit dem Ziel eines verstärkten Survivin-mRNA-Abbaus, erscheint in Anbetracht der gewonnenen Ergebnisse unwahrscheinlich.

Aufgrund der interessanten Ergebnisse bei Untersuchung des IAP Survivin wurden im Hinblick auf mögliche parallel induzierte Veränderungen im Netzwerk der IAP's als weitere Vertreter dieser Proteinfamilie Livin und XIAP untersucht.

Livin wird in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert, höchste Expressionslevel wurden in Melanomzelllinien beschrieben (Kasof et al. 2001). Es existieren zwei Spleißvarianten mit unterschiedlichen biologischen Funktionen. Während beide Varianten in Jurkat T- Zellen im Rahmen der TNF- oder FAS-medierten (extrinsischen) Apoptose antiapoptotisch wirken, ist die als Livin α bezeichnete längere Variante für den Schutz vor einer Staurosporin-medierten Apoptose verantwortlich. Die kürzere Livin β -Variante wirkt einer Etoposid-medierten Apoptose entgegen (Ashhab et al. 2001).

Ähnlich wie bei Survivin zeigte sich auch bei Livin ein konstantes Signal der Livin mRNA beider Spleißvarianten unabhängig der gewählten Inkubationsbedingung in THP-1. In MV4-11, MONO-MAC-6 und insbesondere in MOLM-13 konnte für die Kombination aus D-65476 und ATRA für die kürzere Livin β - Variante eine deutliche Downregulation auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Diese Beobachtung ließ sich jedoch auf Proteinebene bei einer sehr unspezifischen Bindung des Antikörpers mit deutlichem Hintergrundsignal nicht bestätigen.

XIAP wird in vielen Tumorzelllinien exprimiert, beschrieben ist insbesondere seine Expression in Blasten der AML. Sein Expressionsniveau in Blasten von AML-Patienten zeigt eine negative Korrelation mit dem Remissionsstatus und der Überlebenschancen (Tamm et al. 2000). Neben hoher Expressionsraten in Zellen des Morbus Hodgkin (Kashkar

et al. 2003) ist ein erhöhtes XIAP-Expressionslevel mit verstärkter Chemotherapieresistenz und fehlender chemotherapieinduzierter Apoptose assoziiert (Zhang et al. 2002). In den hier durchgeführten PCR-Untersuchungen ließ sich jedoch auf mRNA-Ebene keine Veränderung in der Konzentration der XIAP-mRNA detektieren. Auf ergänzende Untersuchungen mittels Western-Blot wurde daher verzichtet.

Auf der Suche nach weiteren ursächlichen Veränderungen der ATRA/D-65476 vermittelten Apoptoseinduktion wurden neben den IAP's einige Vertreter der Proteinfamilie der Bcl-2 verwandten Proteine im Western Blot untersucht.

Bcl-2, erstbeschrieben in B-Zell-Lymphomen mit t(14;18)-Translokation (Tsujimoto et al. 1984) und damit konstitutiver Aktivierung unter der Kontrolle eines Immunglobulin-Schwerketten-Promotors, führt zu Apoptoseresistenz (Korsmeyer 1992) und wurde auch in Blasten der AML nachgewiesen. In vitro-Inkubationsversuche mit ATRA in einer Konzentration von 500 nM zeigten in AML-Patienten-Proben sowie in der AML-FAB M2-Zelllinie HL-60 eine ATRA-abhängige Downregulation von bcl-2 (Pisani et al. 1997). Eine mögliche Erklärung für additive Effekte wäre beispielsweise eine D-65476 vermittelte Downregulation von Survivin, parallel hierzu eine ATRA abhängige Bcl-2-Downregulation. Neben Bcl-2 spielen noch weitere Vertreter dieser Proteinfamilie in der Pathogenese der AML eine Rolle. Minami et al. 2003 konnten eine durch AG1296, einem weiteren FLT3-Tyrosinkinaseinhibitor, vermittelte Downregulation von Bcl-X_L zeigen. Bcl-X_S, die proapoptotische Spleißvariante des Bcl-X-Gens, wurde als prognostisch günstiger Faktor im Hinblick auf eine Remissionsinduktion beschrieben (Campos et al. 1999).

Interessanterweise konnte in den Zelllinien MOLM-13 und MV-4-11 in den durchgeführten Immunoblots zwar eine deutliche Bcl-2-Expression detektiert werden, Unterschiede im Expressionslevel in Abhängigkeit von D-65476 und ATRA wurden jedoch nicht beobachtet. Möglicherweise spielen in den hier untersuchten Zelllinien des FAB-Subtyps M5 andere Aberrationen im Kontext der Bcl-2 Dysregulation eine Rolle und die Bcl-2-Expression ist von D-65476 und ATRA unabhängig.

Vergleichbar konstant wie die Bcl-2-Expression stellte sich auch die Expression des verwandten Proteins Bcl-X_L unter den untersuchten Bedingungen dar. Überraschenderweise und nicht mit den durchflußzytometrisch erhobenen Daten in Einklang stehend konnte in den Immunoblots auf Bcl-X_S eine ATRA abhängige Downregulation beobachtet werden. Bei isolierter Betrachtung von Bcl-X_S würde ATRA demzufolge das Gleichgewicht des Apoptosenetzwerkes in Richtung Apoptoseresistenz verschieben. Möglicherweise wird dieses

Phänomen durch andere ATRA-induzierte Effekte wie z.B. eine Survivin-Downregulation gegenreguliert.

Neben Bcl-X_S wurde als weiterer proapoptotischer Vertreter dieser Proteinfamilie Bax (Bcl-associated X protein) untersucht, dessen Expressionsniveau im Immunoblot unabhängig von den untersuchten Bedingungen keine Unterschiede zeigte.

Zusammenfassend scheinen Bcl-2 und Bcl-X_L sowohl in MOLM-13 als auch in MV4-11 aufgrund ihres deutlichen Expressionsniveaus eine Rolle in der Kontrolle der Apoptose zu spielen, jedoch nicht in dem Maße, als dass es durch Kombinationsbehandlung mit D-65476 und ATRA nicht möglich wäre, Apoptose in den besagten Zelllinien zu induzieren ohne das Expressionsniveau dieser Proteine im Sinne einer Downregulation zu verändern. Bcl-X_S zeigt ein ATRA-abhängiges Expressionsmuster mit ATRA-induzierter Downregulation. Dies paßt nicht zur proapoptotischen Wirkung von ATRA im Rahmen der übrigen erhobenen Daten. Dieser Sachverhalt wäre jedoch erklärbar durch andere, ATRA-abhängige Effekte auf das Apoptoseverhalten, die einer Bcl-X_S-Downregulation entgegenwirken.

Um den Beweis anzutreten, dass eine Survivin-Downregulation in den FLT3-ITD-exprimierenden Zelllinien verantwortlich ist für den apoptotischen Phänotyp der Zellen, wurde versucht, mittels Survivin-siRNA direkten Einfluß auf die Survivin-mRNA-Konzentration und damit Translation und Expressionsniveau des Proteins zu nehmen. Hierzu wurden zunächst zwei verschiedene Transfektionsstrategien verfolgt, zum einen die der Elektroporation, zum anderen die Transfektion mittels lipophilen mizellaren Transfektionsreagenzien. Leider zeigten sich sowohl bei Elektroporation als auch in den zur Transfektion notwendigen Konzentrationsbereichen des Lipidtransfektionsreagenz eine deutliche Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen, was bei der zu untersuchenden Fragestellung einen nicht zu akzeptierenden Störfaktor darstellt. Darüberhinaus konnte in Kontrollproben mit fluoreszenzmarkierter non-targeted-siRNA fluoreszenzmikroskopisch keine ausreichend transfizierte Zellpopulation detektiert werden.

Interessant wäre zur Klärung der offenen Fragen in Zukunft die stabile Transfektion von Leukämiezelllinien mit einem Survivin-antisense-Oligonucleotid, dessen Expression unter Kontrolle eines Promotors ein- und ausgeschaltet werden könnte. Ähnliche Untersuchungen wurden schon an Non-Hodgkin-Lymphom-Zellen durchgeführt, hierbei zeigte sich eine Oligonucleotid-vermittelte Survivin-Downregulation auf mRNA- und Proteinebene, verbunden mit Wachstumshemmung der Lymphomzellen (Ansell et al. 2004).

Zusammengefasst untermauern die Ergebnisse aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten die Arbeitshypothese, dass die Induktion von Apoptose in FLT3-ITD-positiven AML-Zellen durch gleichzeitige Behandlung mit einem gegen FLT3 gerichteten Tyrosinkinaseinhibitor sowie mit die Differenzierung induzierenden Substanzen wie ATRA gesteigert werden kann. In Anbetracht der Tatsache, dass zur Zeit verschiedene FLT3-Inhibitoren in klinischen Studien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei AML mit aktivierenden FLT3-Mutationen evaluiert werden, könnte später einmal die zusätzliche Gabe von ATRA bei der Behandlung von diesen AML-Patienten die Therapieergebnisse steigern. Selbstverständlich müsste dies dann zunächst in entsprechenden klinischen Studien überprüft werden.

7. Literaturangaben

Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. 2001. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 113 (4):983-988.

Agnes F, Shamon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. 1994. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*, 145 (2):283-288.

Akiyama T, Shimizu M, Okabe M, Tamaoki T, Akinaga S. 1999. Differential effects of UCN-01, staurosporine and CGP 41 251 on cell cycle progression and CDC2/cyclin B1 regulation in A431 cells synchronized at M phase by nocodazole. *Anticancer Drugs*, 10 (1):67-78.

Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, Remstein ED, Bennett CF, Fielding A. 2004. Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 18 (3):616-623.

Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. 2001. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett*, 495 (1-2):56-60.

Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, Duckett CS, Altieri DC. 2004. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem*, 279 (3):2077-2084.

Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D. 1992. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood*, 80 (10):2584-2593.

Bjerregaard MD, Jurlander J, Klausen P, Borregaard N, Cowland JB. 2003. The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood*, 101 (11):4322-4332.

Bjerrum, O. J. and Schafer-Nielsen, C., Analytical Electrophoresis, M. J. Dunn, ed., p. 315; Verlag Chemie, Weinheim, (1986))

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.

Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD. 1995. Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia*, 9 (7):1212-1218.

Campos L, Sabido O, Viallet A, Vasselon C, Guyotat D. 1999. Expression of apoptosis-controlling proteins in acute leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, 33 (5-6):499-509.

Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M. 2001. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood*, 97 (9):2784-2790.

de Graaf AO, de Witte T, Jansen JH. 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: new therapeutic targets in hematological cancer? *Leukemia*, 18 (11):1751-1759.

DeKoter RP, Singh H. 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*, 288 (5470):1439-1441.

Drexler HG. 1996. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, 10 (4):588-599.

Drexler HG, Meyer C, Quentmeier H. 1999. Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, 33 (1-2):83-91.

Esche C, Subbotin VM, Maliszewski C, Lotze MT, Shurin MR. 1998. FLT3 ligand administration inhibits tumor growth in murine melanoma and lymphoma. *Cancer Res*, 58 (3):380-383.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148 (7):2207-2216.

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF. 2005. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 352 (3):254-266.

Frohling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. 2002. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*, 100 (13):4372-4380.

Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. 2004. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*, 22 (4):624-633.

Fulcher D, Wong S. 1999. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunol Cell Biol*, 77 (6):559-564.

Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. 2005. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia*, 19 (4):586-594.

Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. 2004. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*, 13 (2):169-178.

Ishida S, Shigemoto-Mogami Y, Shinozaki Y, Kagechika H, Shudo K, Ozawa S, Sawada J, Ohno Y, Inoue K. 2004. Differential modulation of PI3-kinase/Akt pathway during all-trans

retinoic acid- and Am80-induced HL-60 cell differentiation revealed by DNA microarray analysis. *Biochem Pharmacol*, 68 (11):2177-2186.

Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, Watanabe A, Kikuta A, Tanaka A, Asami K, Sekine I, Mugishima H, Nishimura Y, Koizumi S, Horikoshi Y, Mimaya J, Ohta S, Nishikawa K, Iwai A, Shimokawa T, Nakayama M, Kawakami K, Gushiken T, Hyakuna N, Fujimoto T, et al. 1999. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia*, 13 (1):38-43.

Jiang J, Paez JG, Lee JC, Bo R, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I, Wolpin BM, Jonasova A, Herman P, Fox EA, Boggon TJ, Eck MJ, Weisberg E, Griffin JD, Gilliland DG, Meyerson M, Sellers WR. 2004. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood*, 104 (6):1855-1858.

Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, Jurgensmeier JM. 2003. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med*, 198 (2):341-347.

Kasof GM, Gomes BC. 2001. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem*, 276 (5):3238-3246.

Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. 2002. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*, 99 (1):310-318.

Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, Ley TJ, Gilliland DG. 2002. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (12):8283-8288.

Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, Estey E, Giles F, Feldman E, Ehniger G, Schiller G, Klimek V, Nimer SD, Gratwohl A, Choudhary C, Mueller-Tidow C, Serve H, Gschaidmeier H, Cohen PS, Huber C, Fischer T. 2004. Identification of a novel activating mutation

(Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*.

Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T. 1998. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12 (9):1333-1337.

Kiyoi H, Naoe T. 2002. FLT3 in human hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*, 43 (8):1541-1547.

Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. 2002. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*, 21 (16):2555-2563.

Korsmeyer SJ. 1992. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 80 (4):879-886.

Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. 2001. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 98 (6):1752-1759.

Li F, Altieri DC. 1999. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res*, 59 (13):3143-3151.

Libura M, Asnafi V, Tu A, Delabesse E, Tigaud I, Cymbalista F, Bennaceur-Griscelli A, Villarese P, Solbu G, Hagemeijer A, Beldjord K, Hermine O, Macintyre E. 2003. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood*, 102 (6):2198-2204.

Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, Lyman SD, Broxmeyer HE. 1996. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 10 (6):1012-1018.

Lyman SD, Jacobsen SE. 1998. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, 91 (4):1101-1134.

Lyman SD, Stocking K, Davison B, Fletcher F, Johnson L, Escobar S. 1995. Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci. *Oncogene*, 11 (6):1165-1172.

Matsuo Y, MacLeod RA, Uphoff CC, Drexler HG, Nishizaki C, Katayama Y, Kimura G, Fujii N, Omoto E, Harada M, Orita K. 1997. Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). *Leukemia*, 11 (9):1469-1477.

McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*, 95 (11):3489-3497.

Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, Bernstein ID, Radich JP. 2001. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*, 97 (1):89-94.

Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T. 2003. Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood*, 102 (8):2969-2975.

Minden M, Imrie K, Keating A. 1996. Acute leukemia in adults. *Curr Opin Hematol*, 3 (4):259-265.

Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H. 2000. Flt3

mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*, 96 (12):3907-3914.

Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Bohmer FD, Muller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. 2003. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood*, 101 (8):3164-3173.

Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. 1996. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10 (12):1911-1918.

Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, Avvisati G, Pinazzi MB, Petti MC, Mandelli F, Lo Coco F. 2002. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. *Leukemia*, 16 (11):2185-2189.

Op den Kamp JA. 1979. Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem*, 48:47-71.

Piccaluga PP, Bianchini M, Martinelli G. 2003. Novel FLT3 point mutation in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 4 (10):604.

Pisani F, Del Poeta G, Aronica G, Venditti A, Caravita T, Amadori S. 1997. In vitro down-regulation of bcl-2 expression by all-trans retinoic acid in AML blasts. *Ann Hematol*, 75 (4):145-147.

Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG. 2003. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia*, 17 (1):120-124.

Reed JC. 1996. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt*, (97):72-100.

Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. 1991. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*, 9 (2):380-385.

Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, Birg F, Birnbaum D. 1993. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*, 82 (4):1110-1119.

Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE. 1996. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood*, 87 (4):1317-1325.

Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W. 2002. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100 (1):59-66.

Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. 2005. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106 (12):3733-3739.

Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausers T, Allebach J, Small D. 2004. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 103 (10):3669-3676.

Soekarman D, von Lindern M, Daenen S, de Jong B, Fonatsch C, Heinze B, Bartram C, Hagemeijer A, Grosveld G. 1992. The translocation (6;9) (p23;q34) shows consistent rearrangement of two genes and defines a myeloproliferative disorder with specific clinical features. *Blood*, 79 (11):2990-2997.

Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. 2002. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood*, 100 (9):3423-3425.

Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R, Bagrintseva K, Faber F, Buske C, Schnittger S, Kelly LM, Gilliland DG, Hiddemann W. 2003. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood*, 101 (4):1494-1504.

Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogossova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP. 2004. Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 124 (4):481-484.

Stirewalt DL, Radich JP. 2003. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*, 3 (9):650-665.

Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. 2004. Acute myeloid leukemia patients with an activating mutation in FLT3 respond to a small molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*,

Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, Tsuchida M, Ida K, Hayashi Y. 2004. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*, 103 (3):1085-1088.

Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC. 2000. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res*, 6 (5):1796-1803.

Teller S, Kramer D, Bohmer SA, Tse KF, Small D, Mahboobi S, Wallrapp C, Beckers T, Kratz-Albers K, Schwable J, Serve H, Bohmer FD. 2002. Bis(1H-2-indolyl)-1-methanones as inhibitors of the hematopoietic tyrosine kinase Flt3. *Leukemia*, 16 (8):1528-1534.

Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. 2002. Analysis of FLT3-activating mutations

in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99 (12):4326-4335.

Till JH, Ablooglu AJ, Frankel M, Bishop SM, Kohanski RA, Hubbard SR. 2001. Crystallographic and solution studies of an activation loop mutant of the insulin receptor tyrosine kinase: insights into kinase mechanism. *J Biol Chem*, 276 (13):10049-10055.

Tse KF, Allebach J, Levis M, Smith BD, Bohmer FD, Small D. 2002. Inhibition of the transforming activity of FLT3 internal tandem duplication mutants from AML patients by a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia*, 16 (10):2027-2036.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26 (2):171-176.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226 (4678):1097-1099.

Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, Timchenko NA. 2001. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*, 8 (4):817-828.

Wang QF, Friedman AD. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins are required for granulopoiesis independent of their induction of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 99 (8):2776-2785.

Watson PA, Hanauske-Abel HH, Flint A, Lalande M. 1991. Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at the G1-S phase border. *Cytometry*, 12 (3):242-246.

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. 2001. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97 (8):2434-2439.

Zhang S, Mantel C, Broxmeyer HE. 1999. Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells. *J Leukoc Biol*, 65 (3):372-380.

Zhang S, Broxmeyer HE. 1999. p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 254 (2):440-445.

Zhang J, Li Y, Shen B. 2002. Up-regulation of XIAP by M-CSF is associated with resistance of myeloid leukemia cells to apoptosis. *Leukemia*, 16 (10):2163-2165.

Zheng R, Friedman AD, Small D. 2002. Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations. *Blood*, 100 (12):4154-4161.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. K. Höffken für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit der Durchführung einer experimentellen Promotionsarbeit im Onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Dr. med. Sebastian Scholl für die Betreuung während meiner Promotion. Unter seiner Anleitung hatte ich die Möglichkeit, ein breites methodisches Repertoire zu erlernen, das sich von der Durchflußzytometrie über Proteinbiochemie mit Proteinanalytik und Western Blot bis zu molekularbiologischen Methoden wie PCR und Transfektionsmethoden erstreckte. Die Gespräche und Diskussionen mit ihm waren stets sehr wertvoll und fruchtbar, die Überlassung des Themas sowie Famulaturen auf der hämatologischen Station der Medizinischen Klinik haben maßgeblich zu meinem Wunsch beigetragen, auch in Zukunft klinisch und wissenschaftlich im Bereich der Hämatologie/Onkologie tätig zu werden.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Joachim Clement für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken, für die Möglichkeit, meine Experimente im Onkologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik unter seiner Leitung durchführen zu können. In ihm hatte ich jederzeit einen Ansprechpartner, der mir mit gutem Rat zur Seite stand und den Fortschritt meiner Arbeit jederzeit förderte.

Frau Prof. Dr. K. Pachmann möchte ich danken für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie sowie ihre Unterstützung bei durchflußzytometrischen Fragestellungen.

Frau Cornelia Jörke und Frau Dr. Manuela Schwalbe habe ich für die Beibringung von Methoden der Zellkultur, der Durchführung von Zellseparationen mit MiniMACS-Säulen sowie des Erlernens durchflußzytometrischer Arbeitsvorgänge zu danken.

Dem gesamten Team des Onkologischen Forschungslabors habe ich für das angenehme Arbeitsklima und die stets sehr freundschaftlich geprägte Atmosphäre zu danken. Es hat mir große Freude gemacht, in so angenehmer Umgebung wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Zum Schluß gilt mein besonderer Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir während meiner gesamten Ausbildung mit Rat und Unterstützung zur Seite standen, mich gefördert haben und mir die Möglichkeit gaben, ein langes Hochschulstudium zu absolvieren, das Voraussetzung für diese Arbeit und meinen späteren Beruf war. In meiner Familie hatte und habe ich den Rückhalt, der mir für alle Aufgaben und insbesondere in schwierigen Situationen Kraft und Zuversicht gibt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. Sebastian Scholl, Dr. rer. biol. hum. J. Clement, Prof. Dr. med. K. Höffken,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 31. Juli 2007

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Müller
Vorname	Rouven Kevin Falco
Geburtsdatum und -ort	11. Mai 1979 in Stuttgart
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnort	Friedrich-Naumann-Str. 8 72762 Reutlingen

Schulbildung

1985-1989	Besuch der Grundschule Brackenheim
1989-1998	Besuch des Zabergäu-Gymnasiums Brackenheim und Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife im Juni 1998

Hochschulbildung

Oktober 1998 – April 2005	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Oktober 2003 bis März 2005	Experimentelle Arbeiten zur Promotion im Onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II bei Prof. Dr. med. K. Höffken
seit Juni 2005	Assistenzarzt Klinik für Innere Medizin II; Prof. Dr. med. L. Kanz Universitätsklinikum Tübingen