

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik II
(Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie, Rheumatologie, Infektiologie)
Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Serve

**Untersuchung FLT3-ITD-abhängiger Signalsignaturen in der
akuten myeloischen Leukämie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Johannes Wolfgang Kovar

aus Tübingen

Frankfurt am Main, 2020

Dekan/in:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent/in:	Prof. Dr. Thomas Oellerich
Korreferent/in:	Prof. Dr. Halvard Björn Bönig
Tag der mündlichen Prüfung:	25.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Verwendete Einheiten	IX
1. Einleitung	1
1.1. Akute myeloische Leukämie.....	1
1.1.1. Symptome	5
1.1.2. Diagnostik.....	5
1.1.3. Aktuelle Leitlinientherapie	6
1.1.4. Entwicklung neuer Medikamente	9
1.2. FLT3.....	11
1.2.1. FLT3-ITD.....	12
1.2.2. FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	14
1.2.3. Resistenzmechanismen von FLT3-ITD	16
2. Zielsetzung.....	18
3. Material	19
3.1. Geräte.....	19
3.2. Allgemeines Labormaterial.....	20
3.3. Chemikalien und Reagenzien	21
3.4. Puffer	22
3.5. Antikörper zur Detektion.....	23
3.5.1. <i>Western Blot</i>	23
3.5.2. Immunfluoreszenz.....	23
3.5.3. Massenspektrometrie	23
3.6. Restriktionsenzyme	23
3.7. Plasmide	24
3.8. Oligonukleotide	24
3.8.1. PCR-Primer	24
3.8.2. Sequenzierungs-Primer	24
3.9. Bakterien	24
3.10. Zelllinien	24
3.11. Medien	25
3.11.1. Verwendete kommerzielle Zellkulturmedien	25
3.11.2. Verwendete Zusätze.....	25
3.11.3. Zytokin.....	25
3.11.4. Zusammensetzung Zellkulturmedien.....	25
3.12. Kinase-Inhibitoren	26

3.13. Größenstandards.....	27
3.13.1. Protein Größenstandard	27
3.13.2. DNA-Größenstandard.....	27
3.14. Kommerzielle Kits.....	27
3.15. Software	27
4. Methoden	28
4.1. Einführung der AC220-Resistenzmutationen F691L und D835V in FLT3-ITD ..	28
4.1.1. Ausgangssituation	28
4.1.2. Klonierung mittels Overlap-PCR.....	28
4.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
4.1.4. DNA-Auftrennung über Gel.....	31
4.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	31
4.1.6. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	33
4.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
4.1.8. Transformation in chemokompetente Zellen	34
4.1.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
4.1.10. Sequenzierung nach Sanger	38
4.2. Zellbiologische Methoden.....	39
4.2.1. Auftauen und Kryokonservierung von Zellen.....	39
4.2.2. Kultivieren von Zellen.....	40
4.2.3. Splitten von Zellen.....	40
4.2.4. Bestimmung der Zellzahl	41
4.2.5. Viraler Gentransfer in eukaryotische Zellen	42
4.2.6. Virus-Transduktion	45
4.2.7. Durchflusszytometrie	45
4.2.8. Behandlung der Zellen mit Kinaseinhibitoren.....	47
4.2.9. <i>In-vitro</i> -Assay (XTT)	47
4.2.10. <i>Cytospins</i>	49
4.3. Proteinbiochemische Methoden.....	50
4.3.1. Herstellung von Zelllysaten	50
4.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	51
4.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
4.3.4. <i>Western Blot</i>	54
4.3.5. Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen	56
4.3.6. <i>Strippen</i> von Nitrozellulosemembranen	57
4.4. Massenspektrometrie	57
4.4.1. SILAC-Markierung.....	57

5. Ergebnisse.....	61
5.1. Unabhängigkeit von Interleukin-3 durch Einbringen von FLT3-ITD	61
5.1.1. Herstellen von pMy ⁺ FLT3-ITD ⁺ , F691L ⁺ und D835V ⁺	61
5.1.2. Nachweis der Interleukin-3-Unabhängigkeit der transduzierten Ba/F3-Zellen	62
5.1.3. Nachweis der Interleukin-3-Abhängigkeit von pMy ⁺	66
5.1.4. Vergleich der FLT3-Expression der transduzierten Zellen mittels <i>Western-Blot</i>	66
5.1.5. Verhalten der transduzierten Zellen bei Zugabe von AC220 (Quizartinib).....	67
5.2. Lokalisation von FLT3-ITD in Ba/F3-Zellen	69
5.2.1. Verhältnis der FLT3-Varianten im <i>Western Blot</i>	69
5.2.2. Immunhistochemische Darstellung von FLT3 in Ba/F3-Zellen.....	70
5.3. Analyse ausgewählter Effektoren von FLT3 mittels <i>Western Blot</i>	74
5.4. Untersuchung des Einflusses ausgewählter Kinasen auf die Proliferation von pMy ⁺ , FLT3-ITD ⁺ , F691L ⁺ und D835V ⁺	76
5.4.1. Einfluss des FLT3-Inhibitors AC220 (Quizartinib)	77
5.4.2. Verwendung von SYK-Inhibitoren	79
5.4.3. Verwendung von weiteren Kinase-Inhibitoren	81
5.5. Vergleich des Phosphorylierungsstatus von pMy ⁺ , FLT3-ITD ⁺ und F691L ⁺	83
5.5.1. Globales Phosphoproteom.....	85
5.5.2. Tyrosin-Phosphorylierung	88
6. Diskussion	92
6.1. Vorexperimente	93
6.2. Lokalisation von FLT3-ITD in Ba/F3-Zellen	94
6.3. Analyse ausgewählter Effektoren von FLT3	97
6.4. Untersuchung des Einflusses ausgewählter Kinasen auf die Proliferation von pMy ⁺ , FLT3-ITD ⁺ , F691L ⁺ und D835V ⁺	98
6.5. Vergleich des Phosphorylierungsstatus von pMy ⁺ , FLT3-ITD ⁺ und F691L ⁺	100
7. Zusammenfassung	104
8. Abstract.....	106
9. Literaturverzeichnis	108
10. Danksagung	XI
11. Curriculum vitae	XII
12. Schriftliche Erklärung.....	XIII

Abkürzungsverzeichnis

ψ	<i>packaging signal</i>
#	Nummer
AKT	<i>Serin/Threonin- Proteinkinase B</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Ara C	Cytarabin
Arginin +10	L-Arginin: HCl ¹⁵ N ₄ ¹³ C ₆
Arginin +6	L-Arginin: HCl ¹³ C ₆
ATRA	All-trans-Retinolsäure
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2-Protein</i>
BET	<i>bromodomain and extra-terminal motif</i>
BiTE	<i>bispecific T-cell engager</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTK	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
Ca	Calcium
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation (Oberflächenmolekül)</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase</i>
C-KIT	<i>Mast/stem cell growth factor receptor</i>
CLEC12A	Gen der <i>C-type lectin/C-type lectin-like domain</i> -Familie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF1R	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Cu	Kupfer
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine 12</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
D	Asparaginsäure
D835V	Mutation des FLT3-Moleküls mit Austausch von Asparaginsäure gegen Valin im Codon 835
D835V ⁺	pMy-FLT3-ITD D835V-exprimierende Zellen
D835Y	Mutation des FLT3-Moleküls mit Austausch von Asparaginsäure gegen Tyrosin im Codon 835
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DART	<i>dual-affinity retargeting molecule</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dFCS	<i>Dialyzed fetal calf serum</i> (dialysiertes fetales Kälberserum)
DGHO	<i>Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und klinische Onkologie</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOT1L	<i>Histon Methyltransferase 1</i>
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>Event-free survival</i>
eGFP	<i>Enhanced GFP</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittel-Agentur)
Env-Plasmid	<i>Envelope plasmid</i> (Hüllplasmid)
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
et al.	<i>Et alli</i> (lat. und andere)
EVI1	<i>Ecotropic virus integration site 1</i>
F	Phenylalanin
F691L	Mutation des FLT3-Moleküls mit Austausch von Phenylalanin gegen Leucin im Codon 691
F691L ⁺	pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierende Zellen
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)
FL	<i>FLT3 ligand</i>
FLT3	<i>Fms like tyrosine kinase</i> (Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3)
FLT3-ITD ⁺	pMy-FLT3-ITD-exprimierende Zellen
FSC	<i>Forward scatter</i>
GagPol-Plasmid	Verpackungsplasmid
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HCK	<i>Hemopoietic cell kinase</i>
HDAC-Inhibitoren	<i>Histone deacetylase</i> -Inhibitoren
HMA	Hypomethylierende Substanzen
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP90ab1	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>
I	<i>Isoleucin</i>
<i>i as</i>	<i>Inside antisense</i> Primer
<i>i s</i>	<i>Inside sense</i> Primer
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IL-3	Murines Interleukin 3
IP	Immunpräzipitation
IHRES	<i>Internal ribosomal entry site</i> (interne ribosomale Eintrittsstelle)
ITD	<i>Internal tandem duplication</i>

K	Lysin
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
konz.	konzentriert
L	Leucin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDAC	niedrigdosiertes Ara-C
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
LYN	Tyrosin-Protein Kinase Lyn
Lysin +4	L-Lysin: 2HCl ² H ₄
Lysin +8	L-Lysin: 2HCl ¹⁵ N ₂ ¹³ C ₆
MAPK	<i>Mitogen-activated-protein-kinase</i>
Mfel	Restriktionsenzym aus <i>Mycoplasma fermentas</i>
Mg	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
MPAL	<i>Mixed phenotype acute leukemia</i>
MPS1	<i>Monopolar spindle 1</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
N	Asparagin
NaCl	Kochsalz
NK	Natürliche Killerzellen
NOS	<i>Not otherwise specified</i> (nicht anderweitig spezifiziert)
NP-40	Nonoxinol 40
NPM1	Nucleophosmin
<i>o as</i>	<i>Outside antisense</i> Primer
<i>o s</i>	<i>Outside sense</i> Primer
OS	<i>Overall survival</i>
p	Phosphoryliert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDGFR α/β	<i>Platelet-derived growth factor receptor A/B</i>
PDI	Proteindisulphidisomerase
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
Pfu	<i>Archaeobakterium</i> Pyrococcus furiosus
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIM 1/2	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1/2</i>
Psil	Restriktionsenzym aus <i>Pseudomonas</i> species SE-G49
PTPN6	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6</i>
R	Arginin
RFS	<i>Relapse-free survival</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase A	Ribonuklease A
RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Insitute 1640 (Leukozytenmedium)
RPS6	<i>40S ribosomal protein S6</i>

RTK III	Rezeptor-Tyrosinkinase III
SCX	<i>Strong cation exchange</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SHP-1	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6/ Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SnaBI	Restriktionsenzym aus <i>Sphaerotilus natans</i>
SOC	SOB (Super Optimal Broth)-Medium mit 20 mM Glucose
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SSC	<i>Side scatter</i>
STAGE	<i>STop And Go Extraction</i> -Kapillarsäule
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	Tris Base, <i>acetic acid</i> (Essigsäure) und EDTA-Puffer
TAM	<i>Transient abnormal myelopoiesis</i> (Transiente abnorme Myelopoese)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCR	<i>T-cell receptor (T-Zell Rezeptor)</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TiO ₂	Titandioxid
TKD	<i>Tyrosine kinase domain</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Valin
WEE1	Histon-Tyrosinkinase Wee1
WEHI-Überstand	IL-3 haltiger Überstand der WEHI-Lymphomzelllinie
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

Verwendete Einheiten

Abkürzung	Einheit
bp	Basenpaare
kb	Kilobasenpaare
°C	Grad Celsius
x g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
g	Gramm
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton (~1,66 x 10 ⁻²³ kg)
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
m	Meter
cm	Zentimeter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
M	Molar (mol/l)
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
nM	Nanomolar
mA	Milliampere
min	Minuten
mol	Mol
mMol	Millimol
µMol	Mikromol
nMol	Nanomol
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
TU/ml	<i>transducing units per milliliter</i> (transduzierende Einheiten pro ml)
v/v	<i>Volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
W	Watt
w/v	<i>Weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)

1. Einleitung

1.1. Akute myeloische Leukämie

Akute Leukämien sind bösartige Erkrankungen des Knochenmarks, bei denen durch Mutationen unreife Vorstufen der Blutzellen einen Proliferationsvorteil gegenüber physiologischen Blutzellen erhalten. Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung der myeloiden Blutzell-Vorstufen. Diese sind an der granulozytären und monozytären Leukopoese, sowie der Erythropoese und Thrombopoese beteiligt. Die unreifen, funktionslosen oder funktionsgestörten Zellen werden Blasten genannt.¹

Die World Health Organization (WHO) definiert die akute myeloische Leukämie (AML) als eine Gruppe der myeloiden Neoplasien und akuten Leukämien. Die AML wird ihrerseits wiederum in verschiedene Subgruppen (Tabelle 1) unterteilt, die sich nach heutiger Klassifikation vor allem in der Zyto- oder Molekulargenetik unterscheiden.^{2, 3} Eine weitere gebräuchliche Klassifikation ist die FAB-Klassifikation (*French-American-British*), die akute Leukämien aufgrund ihrer zytomorphologischen, d.h. den unter dem Mikroskop beurteilbaren Eigenschaften, in die Subtypen M0-M7 (Tabelle 2) unterscheidet.⁴ Obwohl im klinischen Alltag und zur Wahl der Therapie nach wie vor sehr relevant, wird diese Klassifikation in der Forschung zunehmend verlassen.

AML und zugehörige Erkrankungen	
1. AML mit rekurrierenden genetischen Anomalien	
	AML mit (8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
	AML mit nv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH1
	AML mit PML-RARA
	AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
	AML mit (6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
	AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
	Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL
	AML mit mutiertem NPM1
	AML mit bialleler Mutation von CEBPA
	Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1
2. AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
3. Therapiebedingte myeloische Neoplasien	
4. Akute myeloische Leukämie (NOS [nicht anderweitig spezifiziert])	
	AML mit minimaler Differenzierung
	AML ohne Ausreifung
	AML mit Ausreifung
	Akute myelomonozytäre Leukämie
	Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
	Akute Erythroleukämie
	Akute Megakaryoblastenleukämie
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
5. Myelosarkom	
6. Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	
	Transiente abnorme Myelopoese (TAM)
	Myeloische Leukämie bei Down-Syndrom
7. Akute Leukämie mit unklarer Linie	
	Akute undifferenzierte Leukämie
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	MPAL mit t(v;11q23.3); KMT2A neugeordnet
	MPAL, B/myeloid, NOS
	MPAL, T/myeloid, NOS

Tabelle 1: Aktuelle WHO Klassifikation der AML von 2016. Tabelle verändert nach Arber et al.²

FAB-Typ	Differenzierungsgrad
M0	AML mit minimaler Differenzierung
M1	AML ohne Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozyten Leukämie
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5	Akute monozytäre Leukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie

Tabelle 2: FAB-Klassifikation der AML .Tabelle entnommen von Bennett et al.⁴

Die Vielzahl an Subgruppen erklärt sich daraus, dass verschiedenste Mutationen (Abbildung 1) eine AML auslösen können. Mutationen in Genen für die DNA-Methylierung (44%) und Genen der Signaltransduktion (59%) sind besonders häufig.

Weitere betroffene Gene sind Chromatin-modulierende Gene (31%), NPM1 (27%), Gene für myeloide Transkriptionsfaktoren (22%), Gene für Transkriptionsfaktoren (18%), Tumorsuppressorgene (17%), Gene des Spliceosoms (14%) und Cohesin-Komplex-Gene (13%).⁵ Oft zeigen sich dabei Mutationen in mehreren Gruppen, die teilweise gehäuft und entsprechend mit vermutlicher Assoziation auftreten. Ein Beispiel hierfür sind die Gene FLT3, NPM1 und DNMT3A.⁶

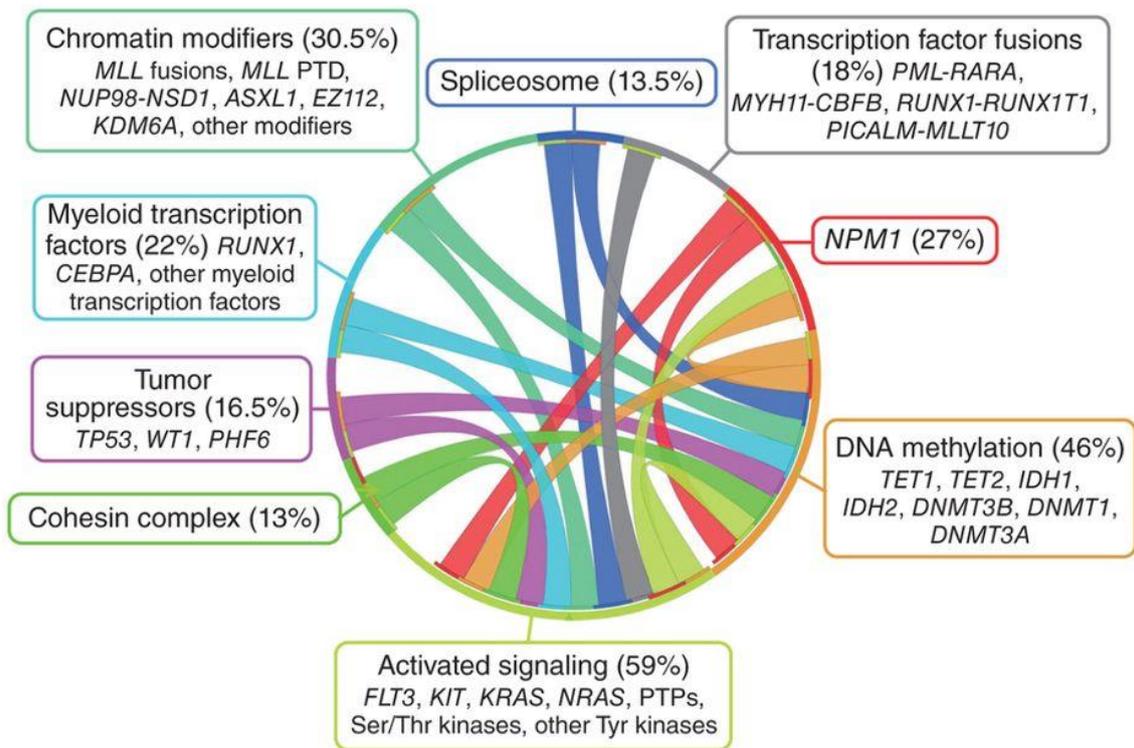


Abbildung 1: Abbildung verschiedener Gene, die mit einer AML einhergehen und deren Verknüpfungen
Abbildung entnommen aus Chen et al.⁵

Die Inzidenz der AML beträgt ca. 3,7 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr und steigt auf eine altersspezifische Inzidenz der über 70 Jährigen von ca. 100 von 100.000 an.⁷ Vor der Einführung wirksamer Medikamente betrug das mittlere Überleben nur etwa fünf Monate nach Diagnosestellung. Nahezu alle Patienten verstarben innerhalb eines Jahres.⁸ Heutzutage ist die 5-Jahres-Überlebensrate von therapierten AML-Patienten stark vom Alter der Erkrankten abhängig. Bei jungen Patienten unter 30 Jahren ist diese höher (60%) als die bei Patienten zwischen 45 und 54 Jahren (43%). Deren 5-Jahres-Überlebensrate ist wiederum größer als die der Patienten zwischen 55 und 64

Jahren (23%). Die Überlebensrate für ältere Patienten nach fünf Jahren ist noch geringer.⁹

Aufgrund der vielen möglichen Mutationen lassen sich retrospektiv verschiedene molekular-genetische Risikoprofile definieren. Die Klassifikation des *European LeukemiaNet* (ELN) von 2017 teilt Patienten in drei verschiedene Risikogruppen auf: günstig, intermediär und ungünstig. In Abhängigkeit des Quotienten zwischen Mutant- und Wildtyp-Allel sowie weiteren Mutationen schwankt das Risiko eines AML-Patienten mit einer FLT3-ITD-Mutation zwischen allen drei Subgruppen.^{10, 11} Das Überleben der Patienten hängt maßgeblich vom Risikoprofil ab (Abbildung 2).^{12, 13}

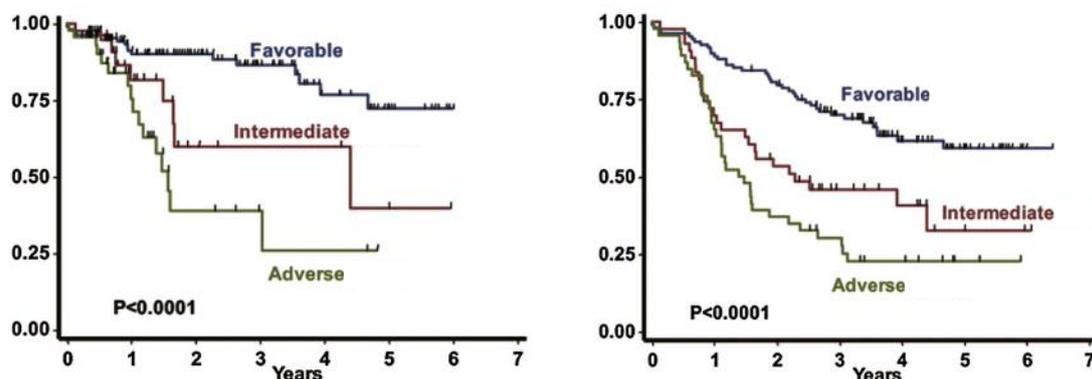


Abbildung 2: Gesamtüberleben von AML-Patienten im Verlauf der Zeit in Jahren (Years) in Abhängigkeit des molekular-genetischen Befundes (entsprechend der ELN 2017-Einteilung). Die linke Abbildung zeigt das Gesamtüberleben. Die rechte Abbildung zeigt hingegen das Gesamtüberleben ohne den Effekt der allogenen Stammzelltransplantation. Abbildung verändert nach Harada et al.¹³

Die AML tritt anders als die akute lymphatische Leukämie (ALL) meist bei Erwachsenen auf und die Häufigkeit der Erkrankung nimmt mit steigendem Lebensalter zu. So sind etwa 80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter als AML zu klassifizieren.^{14, 15}

Aus ätiologischer Sicht sind unterschiedlichste Risikofaktoren aus den Bereichen Umwelt (z.B. Benzol oder ionisierende Strahlung), Genetik (z.B. Trisomie 21 und andere Chromosomenaberrationen) und hämatologische Grunderkrankungen (z.B. myelodysplastische oder myeloproliferative Erkrankungen) bekannt.^{16, 17}

1.1.1. Symptome

Bei der AML treten neben allgemeinen (in Kombination B-Symptomatik genannten) Symptomen wie Fieber ($>38^{\circ}\text{C}$), Gewichtsverlust ($>10\%$ in 6 Monaten) und Nachtschweiß auch spezifischere Symptome auf. Dies erklärt sich durch die Verdrängung der physiologischen Blutzellen sowie der Funktionslosigkeit der Blasten im peripheren Blut. So entsteht aufgrund der verminderten Synthese von Erythrozyten eine Anämie mit Müdigkeit, Schwäche und Blässe. Durch eine Thrombozytopenie im peripheren Blut kommt es zu Störungen der primären Blutstillung mit Petechien, sowie Spontanblutungen und Hämatomen, auch eine erhöhte Blutungsneigung wie z.B. Zahnfleisch- oder Nasenbluten sind typische Symptome. Ein Mangel an funktionsfähigen Leukozyten letztlich bedingt eine vermehrte Infektanfälligkeit v.a. gegenüber bakteriellen und mykotischen Erregern. Die absolute Zahl an Leukozyten kann sowohl erniedrigt im Referenzbereich als auch erhöht sein. Bei einer Leukozytose handelt es sich jedoch überwiegend um funktionslose Tumorzellen.^{1, 18}

Durch die Verdrängung der gesunden Stammzellen aus dem Knochenmark kommt es zur verstärkten extramedullären Blutbildung (z.B. in Leber und Milz), wodurch diese Organe vergrößert erscheinen.^{1, 18}

Bei sehr hohen Leukozytenwerten von $>100.000/\mu\text{l}$ kann es außerdem zum sogenannten Leukostase-Syndrom kommen. Dies beschreibt die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand, wodurch die Flusseigenschaften des Blutes negativ beeinflusst werden und es zu Mikrozirkulationsstörungen kommt.^{1, 18}

Im Falle eines raschen Zerfalls der Tumorzellen (z.B. durch aggressive Chemotherapeutika) kann es zum Tumorlyse-Syndrom kommen. Es werden vermehrt intrazelluläre Substanzen wie Kalium, Phosphat und Harnstoff frei. Dies zeigt sich in Form von Ablagerungen von Calciumphosphat-Steinen in der Niere oder einer Uratnephropathie mit akuten Nierenversagen.^{1, 18}

1.1.2. Diagnostik

Bei entsprechendem klinischen Verdacht oder passender Anamnese einer Leukämie wird dem Patienten peripher Blut abgenommen und daraus ein Differentialblutbild

angefertigt. Zeigt sich hierbei der Verdacht auf eine Leukämie (Thrombozytopenie, unreife Zellen, Anämie) wird eine Knochenmarkspunktion durchgeführt. Die Zellen des Knochenmarks werden nun auf unterschiedliche Weise untersucht. Die Zytomorphologie ermöglicht eine Unterscheidung der Zellen eines Blutausstrichs durch Färbung (z.B. May-Grünwald-Giemsa-Färbung). Die Immunphänotypisierung (i.d.R. durch eine FACS-Analyse [Kapitel 4.2.7 Durchflusszytometrie]) ermöglicht die Detektion typischer Oberflächenstrukturen (CD34, CD38, CD117) der Blutzellen und dadurch eine Klassifikation der Zellreihe und des Reifungsgrades. Um Translokationen der DNA zwischen verschiedenen Chromosomen (z.B. RUNX1-RUNX1T1) oder den Verlust von DNA (z.B. Verlust von Chromosom 5q) zu erkennen, wird eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Dazu wird das Patientenblut mit Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden, die spezifisch an veränderte DNA-Stellen binden, zusammengegeben und mikroskopisch untersucht. Bei Auffälligkeiten eignet sich diese Untersuchung auch als Verlaufskontrolle während der Therapie. Außerdem werden gewisse Gene molekulargenetisch auf Mutationen untersucht (z.B. NPM1, CEBPA, FLT3).^{1, 18}

Krankheitsdefinierend ist bei einer AML ein Blastenanteil von $\geq 20\%$ im peripheren Blut oder im Knochenmark. Typisch bei einer akuten Leukämie ist ein *Hiatus leucaemicus* im peripheren Blut, bei dem einerseits physiologische, ausgereifte Leukozyten vorliegen und andererseits unreife klonale Leukozyten (Blasten). Zwischenstufen der Entwicklung sind hingegen nicht nachweisbar.^{1, 18}

Weitere Diagnostik der klinischen Chemie, sowie eine Liquorpunktion (zur Feststellung einer Infiltration des ZNS) oder bildgebende Verfahren (wie Ultraschall oder EKG), können zum Einsatz kommen, um das Ausmaß der Leukämie zu erfassen.^{1, 18}

1.1.3. Aktuelle Leitlinientherapie

Die seit Oktober 2019 gültige, aktuelle Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie greift erstmals mehrere neu zugelassene Medikamente in der Erstlinienversorgung auf.¹⁸ Nachdem bis zur Leitlinie aus dem Jahr 2018 eine rasche Einleitung der AML-Therapie nach Diagnose im Vordergrund stand,

zeigen neuere Daten, dass ein geringer Zeitverlust von wenigen Tagen nicht mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht.¹⁹ Stattdessen ermöglicht das Abwarten der Befunde eine Induktionstherapie passend zur Genetik.

Abbildung 3 zeigt dabei die Empfehlung der DGHO zur Therapieinduktion. Sollte eine rasche Therapienotwendigkeit vor Erhalt der genetischen Befunde gegeben sein, so wird wie bisher das Therapieschema „7+3“ mit der kontinuierlichen Gabe von Cytarabin über sieben Tage und der Gabe eines Anthracyclins an drei Tagen empfohlen. Ansonsten sollte bei allen fitten Patienten stattdessen auf eine Abklärung eventuell fertilitätserhaltender Maßnahmen und die Erhebung der molekular- und zytogenetischen Befunde gewartet werden.¹⁸

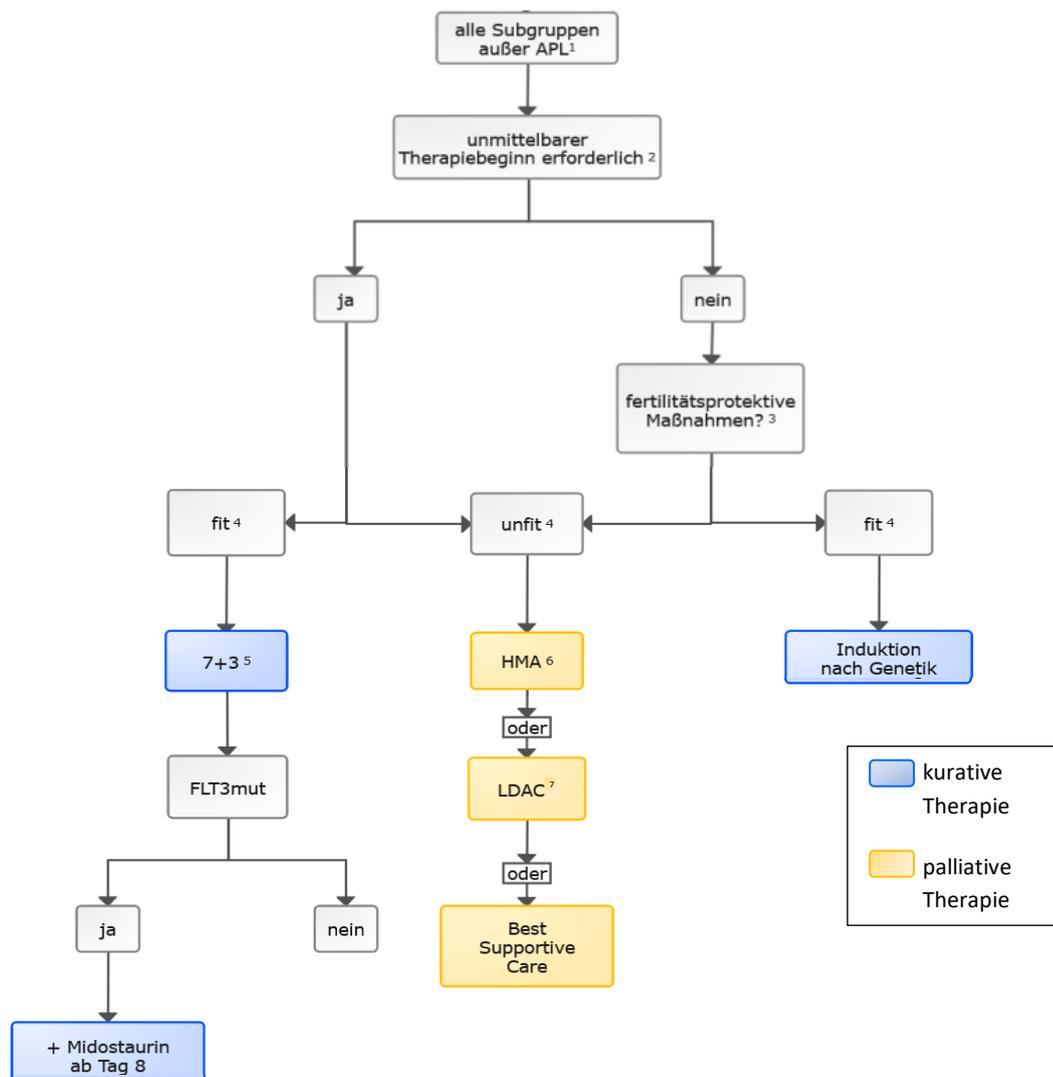


Abbildung 3: Therapie-Algorithmus zur Induktion der AML-Therapie der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO). ¹APL: akute Promyelozyten Leukämie (diese wird nach einem anderen Algorithmus behandelt), ²lebensbedrohliche Symptome, rascher Progress, ³z.B. Kryokonservierung von Ovar-/ Hodengewebe, ⁴Orientierung am ECOG-Status und Komorbiditäten, ⁵Therapieschema mit kontinuierlichem Cytarabin über sieben Tage und der Gabe eines Anthracyclins an drei Tagen, ⁶hypomethylierende Substanzen, ⁷niedrigdosiertes Cytarabin. Abbildung verändert nach der Leitlinie der DGHO 2019.¹⁸

Die Behandlung der Akuten Promyelozyten Leukämie erfolgt nach einem eigenen Algorithmus und wird deshalb nicht weiter erwähnt.

Nach Vervollständigung der genetischen Befunde wird die Induktionstherapie an diese angepasst. Bei Vorliegen einer nachgewiesenen Mutation des FLT3-Gens (für weitere Informationen siehe Kapitel 1.2.1 FLT3-ITD) der juxtamembranen Domäne (interne Tandem-Duplikationen, kurz FLT3-ITD) oder Mutationen der Tyrosinkinase-Domäne (FLT3-TKD) erhalten alle Patienten zusätzlich ab dem achten Tag den Multikinase-Inhibitor Midostaurin.²⁰ Dies ist das einzige Medikament, das laut Leitlinie ergänzt werden kann, wenn eine Therapie mit dem Schema 7+3 vor Erhalt der endgültigen Genetik begonnen wurde.¹⁸

Patienten mit einer CD33-positiven *Core-binding-factor*-AML oder mit einer CD33-positiven NPM1-Mutation bei gleichzeitig vorliegendem FLT3-Wildtyp erhalten zum oben genannten Schema 7+3 zusätzlich Gemtuzumab-Ozogamicin (ein Konjugat des CD33-Antikörpers Gemtuzumab und dem Zytokin Calicheamicin). Patienten mit sonstigem intermediärem AML-Risiko können im Falle eines CD33-Nachweises diese Behandlung erhalten.^{18, 21}

Das Patientenkollektiv mit einer Therapie-assoziierten AML oder AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen sollte mit CPX-351 behandelt werden. Hierbei handelt es sich um eine liposomale Formulierung aus Cytarabin und Daunorubin mit fixem Konzentrationsverhältnis von 5:1.^{18, 22}

Andere fitte Patienten, die sich nach Erhalt der molekular- und zytogenetischen Befunde keiner der anderen Gruppen zuordnen lassen, bekommen die ungerichtete Chemotherapie aus Cytarabin und einem Antracyclin (7+3).¹⁸

Alle genannten Therapien haben kurzfristig eine Remission und langfristig eine Heilung zum Ziel. Nach Erreichen einer Remission schließt sich eine Postremissionstherapie (Konsolidierungstherapie) an. Je nach Risikoprofil handelt es sich dabei um eine Chemotherapie mit hochdosiertem Cytarabin (vor allem bei günstigem Risikoprofil) oder eine allogene Stammzelltransplantation (bei nahezu allen anderen Patienten).

Abhängig von den eingesetzten Substanzen in der Induktion werden im Falle einer Chemotherapie zusätzliche Medikamente verwendet.¹⁸

Bei einer AML mit nachgewiesener FLT3-ITD-Mutation und erfolgter allogener Stammzelltransplantation schließt sich nach der Transplantation eine Erhaltungstherapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib an.²³

Im Falle eines AML-Rezidivs ist bei Patienten, die in kurativer Absicht behandelt wurden, die allogene Stammzelltransplantation bisher die einzige Lösung für eine Langzeitremission.¹⁸

Die Patientengruppe, die aufgrund von Komorbiditäten für eine intensive Therapie bereits bei Induktion nicht in Frage kommen und Patienten mit einem Alter über 75 Jahren, erhalten stattdessen eine Therapie mit hypomethylierenden Substanzen oder niedrig-dosiertem Cytarabin (Abbildung 3). Hierbei handelt es sich jedoch um palliative Therapien. Alternativ kann auch das Konzept des *Best supportive Care* gewählt werden.

Weiterhin konnte auch durch Verbesserung der supportiven Therapie bei AML-Patienten ein verlängertes Gesamtüberleben erreicht werden.²⁴ Die Leitlinie empfiehlt außerdem eine regelmäßige Nachsorge aller Patienten, um ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen.¹⁸

1.1.4. Entwicklung neuer Medikamente

Im Falle einer primären Therapierefraktärität oder eines Rezidivs einer AML kommen in Deutschland und der westlichen Welt zahlreiche weitere Substanzen zum Einsatz, die jedoch aktuell entweder nicht als Erstlinientherapie zugelassen sind oder nicht als Standardtherapie etabliert sind. Aus diesem Grund werden in Studien viele neue Therapieschemen entwickelt. Verschiedene Übersichtsartikel zeigen eine Vielzahl von neuen möglichen Substanzen auf. Tabelle 3 gibt einen Überblick über verschiedene neue Substanzen und deren Zielstruktur.^{10, 25, 26}

Das zunehmend bessere Verständnis der zellulären Abläufe und die Detektion von Mutationen ermöglicht es mithilfe von neuen prädiktiven Markern, genomischer

Klassifikation oder neuen Medikamentenzielen eine spezifischere Therapie entsprechend eines AML-Subtyps zu implementieren.^{27, 28, 29} Im Rahmen unserer Arbeitsgruppe wurde so die Inhibition der Kinase SYK in HOXA9/MEIS1-überexprimierenden AML-Zellen als mögliche, zielführende Therapie detektiert.³⁰

Neue Substanzen in der AML-Behandlung in klinischer Erprobung	
Proteinkinase-Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> • FLT3-Inhibitoren (Quizartinib, Gilteritinib,¹ Crenolanib) • KIT-Inhibitoren • PI3K/AKT/mTOR-Inhibitoren • Aurora- und polo-like Kinase(PLK)-Inhibitoren, CDK 4/6- Inhibitoren, CHK1-, WEE1- und MPS1-Inhibitoren • SRC- und HCK-Inhibitoren
Epigenetische Modulatoren	<ul style="list-style-type: none"> • neue DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (SGI-110) • HDAC-Inhibitoren • IDH1- (Ivosidenib)² und IDH2 (Enasidenib)-Inhibitoren³ • DOT1L-Inhibitoren • BET-bromodomain-Inhibitoren
Chemotherapeutika	<ul style="list-style-type: none"> • CPX-351 (Kombination aus Cytarabin und Daunorubicin)⁴ • Vosaroxin (Chinolon-Derivat) • Nukleosid-Analoga
Mitochondriale Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> • BCL2- (Venetoclax)⁵, BCL-XL und MCL-1-Inhibitoren • Kaseinolytische Protease –Inhibitoren
Therapien gegen onkogene Proteine	<ul style="list-style-type: none"> • Fusions-Transkripte als Zielstruktur (<i>fusion transcripts targeting</i>) • EVI1 als Zielstruktur • NPM1 als Zielstruktur • Hedgehog-Inhibitoren (Glasdegib)⁶
Monoklonale Antikörper und Immunotherapien	<ul style="list-style-type: none"> • Monoklonale Antikörper gegen CD33, CD44, CD47, CD123, CLEC12A • Immunokonjugate (Gemtuzumab-Ozogamicin,⁷ SGN33A) • BiTEs und DARTs • CAR T-Zellen oder genetisch hergestellte TCR T-Zellen • Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie PD-1/PD-L1, CTLA-4 • Anti-KIR-Antikörper • Impfstoffe (WT1)
AML-Umgebung als Ziel	<ul style="list-style-type: none"> • CXCR4- und CXCL12-Antagonisten • antiangiogenetische Therapie

Tabelle 3: Neue Substanzen in der klinischen Entwicklung zur Behandlung der AML. Tabelle verändert nach Döhner et al.¹⁰

Ergänzend Zulassungen durch die FDA seit dem Erscheinen des Artikels:

¹2018 Zulassung als Xospata bei nachgewiesenen FLT3-Mutationen bei therapierefraktärem Verlauf oder Rezidiv³¹

²2018 Zulassung als Tibsovo bei Patienten mit bestimmten nachgewiesenen IDH1-Mutationen entweder ab einem Alter von 75 Jahren oder Patienten, die nicht für eine intensive Induktionstherapie infrage kommen, sowie bei therapierefraktärem Verlauf oder Rezidiv³²

³2017 Zulassung als Idhifa bei nachgewiesener IDH-2 Mutation bei therapierefraktärem Verlauf oder im Rezidiv³³

⁴2017 Zulassung als Vyxeos bei Neudiagnose einer sekundärer bzw. therapie-assoziiertes AML²²

⁵2017 Zulassung als Venclaxta bei Neudiagnose bei Patienten ab einem Alter von 75 Jahren in Kombination mit niedrig dosiertem Cytarabin oder Patienten, die nicht für eine intensive Induktionstherapie infrage kommen in Kombination mit Azacytidin, Decitabin oder niedrig-dosiertem Cytarabin (*Accelerated Approval Program*)³⁴

⁶2018 Zulassung als Daurismo bei Patienten ab einem Alter von 75 Jahren in Kombination mit niedrig dosiertem Cytarabin oder Patienten, die nicht für eine intensive Induktionstherapie infrage kommen³⁵

⁷2017 Zulassung als Mylotarg bei CD33-positiver AML bei erwachsenen Patienten oder bei Patienten ab zwei Jahren bei therapierefraktärem Verlauf oder Rezidiv²¹

1.2. FLT3

Bei bis zu 30% der erwachsenen AML-Patienten treten Veränderungen des FLT3-Gens auf, das für die Tyrosinkinase *Fms like tyrosine kinase 3* (FLT3) kodiert. Das Gen befindet sich auf Chromosom 13 und besteht aus 24 Exons. Das transkribierte Protein FLT3 besteht schließlich aus 993 Aminosäuren.^{36, 37}

FLT3, auch unter den Namen FLK-2 (*fetal liver kinase 2*) und STK-1 (human stem cell kinase-1) bekannt, ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase unreifer, hämatopoetischer Zellen. FLT3 zählt mit PDGFR α/β , C-KIT und CSF1R zur Rezeptor-Tyrosin Kinase III (RTK III)-Familie.^{38, 39}

Der Rezeptor FLT3 besteht aus einer extrazellulären Liganden-Bindestelle mit fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranen Domäne, einer juxtamembranen Domäne und einer durch ein *Insert* geteilten Kinase-Domäne (Abbildung 4). Als Ligand fungiert der FLT3-Ligand (FL), der beispielsweise von Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird.^{40, 41}

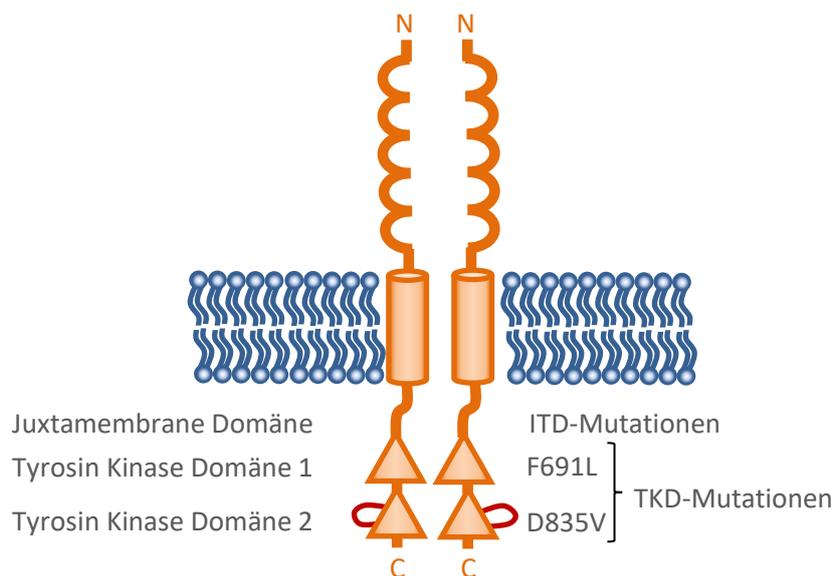


Abbildung 4: Schematische Darstellung des dimerisierten FLT3 Rezeptors in der Zellmembran mit Lokalisation der ITD-Mutation, sowie den Punktmutationen F691L und D835V (siehe Kapitel 1.2.1. FLT3-ITD).

Eine Aktivierung von FLT3 mittels des Liganden bewirkt eine Dimerisierung und anschließend eine Autophosphorylierung des Rezeptors. Es werden dadurch Signalwege z.B. über die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) und AKT oder über RAS und die *mitogen-activated-protein-kinase* (MAPK) aktiviert.^{42, 43}

Die Signalwege führen zu einem Überleben der Zelle, einer Ausreifungshemmung sowie zur Proliferation. FLT3 wird vor allem auf unreifen Zellen der Hämatopoese und des Immunsystems exprimiert. Es bewirkt das Wachstum unreifer Progenitorzellen, dient der Entwicklung früher, unreifer lymphatischer Zellen sowie als Regulator der Entwicklung von dendritischen Zellen und der dendritischen Zell-vermittelten Aktivierung von natürlichen Killerzellen.^{39, 44}

Die Deaktivierung von phosphoryliertem FLT3 geschieht durch Tyrosin-Phosphatasen. Diese sind in der Lage Tyrosinreste der juxtamembranen Domäne zu dephosphorylieren, wodurch es zu einer Konformationsänderung der Domäne kommt, die autoinhibitorisch die Katalyse der Tyrosinkinasedomäne hemmt.⁴⁵

Molekularbiologisch lassen sich zwei Varianten von FLT3 nachweisen. Vorwiegend kommt eine Form von ca. 158-160 kDa an der Zelloberfläche vor. Zu einem geringen Prozentsatz wird physiologisch auch eine unreifere Form von ca. 130-143 kDa detektiert, die sich in der Zelle befindet.^{46, 47} Der Unterschied des Molekulargewichts beruht auf noch nicht vollständig abgeschlossenen posttranslationalen Modifikationen: FLT3 wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und an einigen Stellen glykosyliert. Von dort aus wird das Protein weiter zum Golgi-Apparat transportiert und erst dort an weiteren Stellen glykosyliert, ehe es in die Zellmembran eingebaut wird.^{47, 48}

1.2.1. FLT3-ITD

Die häufigsten Mutationen von FLT3 sind FLT3-ITD und FLT3-TKD (dargestellt in Abbildung 4). Bei Letzteren handelt es sich um Punktmutationen der Tyrosinkinase-Domäne (TKD) typischerweise im *activation loop* in Codon D835 (Asparaginsäure) oder I836 (Isoleucin) des FLT3 Proteins. Bei FLT3-ITD treten interne Tandemduplikationen im Bereich der inaktivierenden juxtamembranen Domäne auf. Dabei handelt es sich um *inframe*-Insertionen von Basentriplets bis 400 Basenpaaren ohne Verschiebung des Leserasters.^{41, 49}

FLT3-ITD verhindert durch den Einschub von Basentriplets eine Autoinhibition der Kinase und bietet die Möglichkeit zur ligandenunabhängigen Dimerisierung, wodurch

die nachfolgenden Signalwege aktiviert werden. Es resultiert ein unkontrolliertes Zellwachstum ohne Stimulus durch den Liganden, fehlende Zelldifferenzierung und ausbleibende Apoptose der FLT3-ITD exprimierenden Zellen.^{45, 50}

Bei FLT3-ITD exprimierenden Zellen ist weiterhin das Verhältnis der Expression zwischen reifer und unreifer Form verändert. Die unreifere, weniger glykosylierte, am ER-lokalisierte Form, liegt im Vergleich zum reiferen, vollständig-glykosylierten FLT3 vermehrt vor.⁴⁷ Während ein physiologischer Stimulus die in der Zellmembran vorkommenden Rezeptoren von FLT3 (160 kDa-Variante) aktiviert, bewirken ITD-Mutationen hingegen auch ein abweichendes Signal durch zusätzliche Aktivierung der intrazellulären Rezeptoren.^{51, 52}

Neben den physiologischen Signalwegen an der Zelloberfläche kann FLT3-ITD so weitere Signalwege aktivieren (Abbildung 5). An der Zellmembran bewirkt eine Aktivierung des vollständig glykosylierten FLT3-ITD die Aktivierung der Signalkaskaden der MAP-Kinase sowie PI3K. Intrazellulär, am endoplasmatischen Retikulum, geht eine Aktivierung von nicht vollständig glykosyliertem FLT3-ITD jedoch mit der Aktivierung von STAT5 und dessen Zielen PIM-1/2 einher, nicht jedoch mit der Aktivierung der Signalwege von MAP-Kinase bzw. PI3K.⁵²

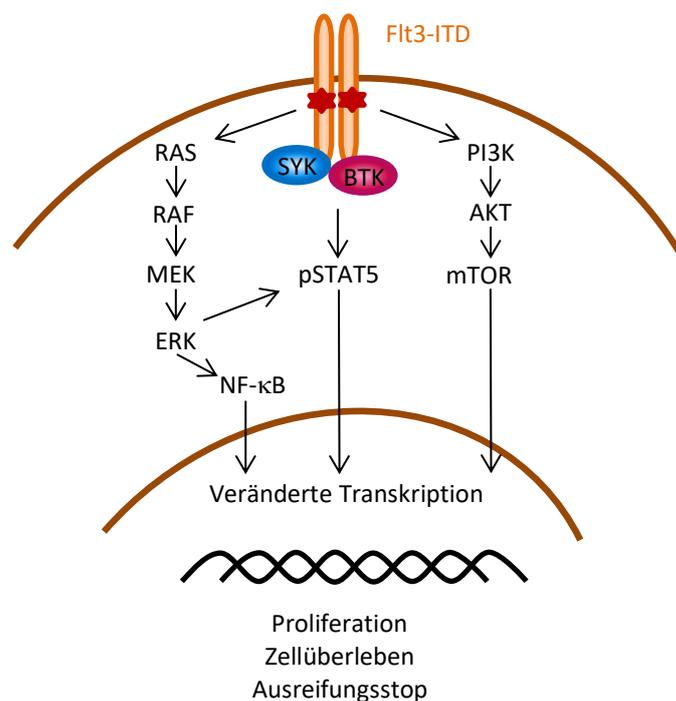


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der Signalwege von FLT3-ITD.

Die Mutation FLT3-ITD ist vor allem mit der AML vergesellschaftet, aber auch bei einem geringen Teil von Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom und ALL ist diese Mutation ebenfalls nachzuweisen.^{53, 54}

AML-Patienten mit der Mutation FLT3-ITD haben üblicherweise einen hohen Blastenanteil und einen normalen Karyotyp bei schlechten Heilungschancen und einem hohen Rezidivpotential sowie kurzem Rezidiv-freiem Überleben und Gesamtüberleben.³⁹

1.2.2. FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren

Ein Gegenstand der AML-Forschung ist die Inhibition von FLT3-ITD durch Tyrosinkinase-Inhibitoren. Durch Inhibition z.B. mittels AC220 (Quizartinib) wird die Aktivierung von FLT3 unterbunden und verhindert die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege, wodurch die Zellen ihren Proliferationsvorteil verlieren.⁵⁵

Die FLT3-Inhibitoren werden in Inhibitoren der ersten und zweiten Generation unterschieden, wobei sie sich in ihrer Spezifität bezüglich FLT3 unterscheiden. Ein bekannter, unspezifischer Multikinase-Inhibitor der ersten Generation ist Midostaurin, welcher seit 2017 in Deutschland auch für die Erstlinientherapie in Kombination mit einer Standardchemotherapie zugelassen ist.²⁰ Auch Sorafenib gehört in diese Gruppe.⁵⁶

FLT3-Inhibitoren der zweiten Generation zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Bindungspotenz gegenüber FLT3 aus, wodurch weniger Nebeneffekte und Toxizität erreicht werden. Allerdings wird dadurch, anders als bei Inhibitoren der ersten Generation, nur eine geringe zusätzliche Hemmung anderer nachfolgender oder parallel-geschalteter Kinasen erzielt. Durch die zusätzliche Wirkung auf andere Proteine können die antileukämischen Effekte von Inhibitoren der ersten Generation verstärkt werden.⁵⁷ Aktuell klinisch-relevante Vertreter der zweiten Generation sind z.B. Quizartinib (AC220)^{58, 59} und Gilteritinib (ASP2215).^{60, 61} Gilteritinib ist seit 2018 in den USA durch die FDA und seit 2019 durch die EMA in Europa zugelassen und damit der zweite zugelassene FLT3-Inhibitor.³¹

Alle FLT3-Inhibitoren sind kompetitive Inhibitoren an der intrazellulären ATP-Bindestelle der Tyrosinkinase-Domäne und verhindern dadurch die Autophosphorylierung und Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege. Anhand ihrer Interaktion mit verschiedenen Konformationen von FLT3 lassen sich die Inhibitoren weiter klassifizieren. Typ-I-Inhibitoren binden auch am aktiven Rezeptor, während Typ-II-Inhibitoren den inaktiven Rezeptor zur Bindung benötigen.^{57, 62}

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht von sich in klinischer Verwendung befindlichen FLT3 Inhibitoren.⁵⁷ Neben der Hemmkonzentration IC_{50} für FLT3-ITD wird (exemplarisch für TKD-Mutationen) zusätzlich die IC_{50} für D835Y abgebildet.

Erste Generation					
Name	Typ I		Name	Typ II	
	IC_{50} [nmol/l]	Weitere Ziele		IC_{50} [nmol/l]	Weitere Ziele
Sunitinib (SU11248)	ITD 5,4 D835Y >100	VEGFR2, PDGFR β , C-KIT, RET	Sorafenib (DB00398)	ITD 18,5 D835Y >2.000	RAF, VEGFR1/2/3, PDGFR β , C-KIT, RET
Midostaurin (PKC412)	ITD 9,3 D835Y 10	PKC, SYK, FLK-1, AKT, PKA, C-KIT, FGR, SRC, PDGFR β , VEGFR1, VEGFR2	Ponatinib (AP24534)	ITD <1 D835Y 92	LYN, ABL, PDGFR α , VEGFR2, FGFR1, SRC, C-KIT, TEK, RET
Lestaurtinib (CEP-701)	ITD 8.6 D835Y 9.8	JAK2/3, TRK A/B/C	Tandutinib (MLN518)	ITD 550 D835Y >10.000	KIT, PDGFR β
Zweite Generation					
KW-2449	ITD 41 D835Y >200	ABL, Aurora- Kinase	Quizartinib (AC220)	ITD 1,2 D835Y >100	KIT, PDGFR β RET
Crenolanib (CP-868- 596)	ITD 57 D835Y 58	PDGFR β			
Gilteritinib (ASP2215)	ITD 1,6 D835Y 1,4	LTK, ALK, AXL			

Tabelle 4: Darstellung von FLT3-Inhibitoren in klinischer Anwendung. Die IC_{50} beschreibt die mittlere inhibitorische Konzentration in nmol/l bei der eine halbmaximale Hemmung beobachtet wird. Je affiner ein Inhibitor, desto geringer die angegebene Konzentration. Außerdem sind weitere vom jeweiligen Inhibitor gehemmte Proteine angegeben. Tabelle verändert nach Larrosa-Garcia und Baer.⁵⁷

1.2.3. Resistenzmechanismen von FLT3-ITD

Wenngleich die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren ein Ansprechen von ansonsten refraktären Patienten bzw. Patienten mit einem Rezidiv ermöglicht, so ist die (Langzeit-) Erfolgsrate der Inhibitoren dennoch eingeschränkt. Dies liegt zum einen an primären Resistenzen: durch gewisse Mutationen kann ein spezifischer Inhibitor nicht binden oder die Zelle kann durch weitere Mutationen zum Überleben auf alternative Signalwege zurückgreifen. Weiterhin treten sekundäre Resistenzen nach einer anfänglichen Wirkung des Inhibitors auf: Durch Resistenzmutationen innerhalb von FLT3-ITD, autokrine Stimulation des FLT3-Liganden, FLT3-Überexpression oder die Aktivierung alternativer Signalwege, sowie durch im Verlauf erworbenen weiteren Mutationen anderer Proteine, entwickeln die Zellen eine Resistenz.⁶³

Die Behandlung von FLT3-ITD positiven Zellen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren führt bei vielen andernfalls refraktären Patienten zu einer Remission.^{31, 59, 64} AC220 war dabei der erste FLT3-Inhibitor für den eine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei therapierefraktärem Verlauf oder bei Rezidiv einer AML gezeigt werden konnte.⁶⁴ Allerdings kommt es trotz initialem Ansprechen bei einigen Patienten zu einer Resistenz gegen den Inhibitor und anschließend zu einem Rezidiv der AML.^{65, 66}

Von C. C. Smith und Kollegen wurde das Therapieversagen des FLT3-ITD-Inhibitors AC220 trotz initialem Ansprechen auf sekundäre Punktmutationen im FLT3-Gen zurückgeführt, die vor der Behandlung nicht nachweisbar waren. Es wurde bei acht FLT3-ITD-positiven Patienten die Aminosäuresequenz von FLT3 nach der Behandlung mit AC220 und anschließender Resistenz gegenüber dem Inhibitor analysiert. Fünf verschiedene Mutationen wurden detektiert: Die „gatekeeper“ Mutation F691L: ein Austausch von Phenylalanin zu Leucin; die Mutationen im *activation loop* D835V und D835Y mit einem Austausch von Asparaginsäure gegen Valin oder Tyrosin sowie Y842C und Y842H mit einem Austausch von Tyrosin zu Cystein oder Histidin. Die sechste Mutation E608K (es findet ein Austausch von Glutaminsäure zu Lysin statt) erwies sich nicht als Resistenzmutation gegen AC220.⁶⁷

AC220 bindet als Typ-II Inhibitor an die inaktive Form von FLT3-ITD (siehe Kapitel 1.2.2. FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren). Eine Konformationsänderung des

Proteins durch die Mutation F691L verhindert die Stabilisierung des Komplexes aus Inhibitor und Tyrosinkinase und reduziert dadurch die Spezifität drastisch. D835V destabilisiert die inaktive Form und verhindert deshalb, dass AC220 binden kann.^{67, 68}

Ein entsprechendes Verhalten, in Bezug auf sekundäre Mutationen des *activation loop* (z.B. D835V), ist bei Typ-I-Inhibitoren wie Midostaurin oder Gilteritinib nicht zu erwarten, da sie auch an den aktiven Rezeptor binden. Zusätzliche TKD-Mutationen führen deshalb nicht zur Selektion dieser Zellen und dementsprechend nicht zu einem Rezidiv der AML.^{57, 67} Dies gilt jedoch nicht für Mutationen im Bereich des *gatekeepers* wie F691L.⁶⁹ Es wurde gezeigt, dass bei Behandlung von AML-Patienten mit Gilteritinib die sekundäre Punktmutation F691L entstehen kann, woraufhin die Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor nicht mehr anspricht und klinisch ein sekundäres Therapieversagen resultiert.⁷⁰

Ein weiterer Resistenzmechanismus erfolgt über die PIM-Kinasen. AML-Patientenzellen, die eine Resistenz gegen Sorafenib entwickelt hatten, zeigten in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls eine Überexpression von PIM2 (und in geringerem Maße von PIM1) im Vergleich zum Zeitpunkt der Sorafenib-Sensitivität. In weiteren Experimenten zeigte sich bei Überexpression von PIM2 in FLT3-ITD-positiven AML-Zellen keine Wirkung von AC220. Ein Knockout von PIM2 gewährte hingegen die AC220-Sensitivität.⁷¹ Grund hierfür scheint die Stabilisierung von intrazellulärem, 130 kDa-schwerem FLT3 durch PIM-Kinasen zu sein.⁷² Somit stellt möglicherweise auch die Kombination von FLT3-Inhibitoren und PIM-Kinase-Inhibitoren eine neue Strategie zur Behandlung bestimmter AML-Subtypen dar.

2. Zielsetzung

Die akute myeloische Leukämie (AML) umfasst eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die bisher nicht zufriedenstellend therapiert bzw. geheilt werden kann. Die Entwicklung von Tyrosinkinase-Inhibitoren stellt eine neue Möglichkeit der Therapie vieler Erkrankungen dar. In der AML werden beispielsweise FLT3-Inhibitoren eingesetzt, da das FLT3-Gen bei etwa 30% der Patienten mutiert ist.

Bei Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie z.B. AC220 (Quizartinib), kann es durch weitere Punktmutationen des FLT3-Gens zur Selektion von Blastenzellen, die gegen den Inhibitor resistent sind, kommen. Die zentrale Hypothese dieser Dissertationsschrift führt diese Resistenz nicht nur auf ein verändertes Bindungsverhalten des Inhibitors an FLT3 zurück, sondern geht auch von der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege aus.

Zur Überprüfung dieser Hypothese werden die kodierenden Sequenzen für FLT3-ITD und FLT3-ITD mit den AC220-Resistenzmutationen F691L bzw. D835V über retrovirale Transduktion in den murinen Zelllinien BA/F3 und 32D stabil exprimiert. Anschließend werden Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur Lokalisation von FLT3 sowie Untersuchungen ausgewählter Effektoren von FLT3, *Proliferationsassays* und massenspektrometrische Phosphoproteom-Analysen durchgeführt.

Teile der ermittelten Daten wurden bereits in Abstracts veröffentlicht: Doebele, **Kovar** et al.⁷³ und Ji, **Kovar** et al.⁷⁴

3. Material

3.1. Geräte

Verwendetes Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Varioklav	H & P Labortechnik
Bakterienschüttler	MAXQ 4000	Thermo Fisher Scientific
Bunsenbrenner	Labogaz 206	Campingaz
Chemolumineszenzdetektor	Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR Biosciences
Cytozentrifuge	Cytospin 2	Shandon
Digitalwaage		Sartorius
Durchflusszytometer	BD FACS ARIA™ II BD LSRFortessa™	BD Bioscience BD Bioscience
Elektronische Ein-Kanal-Pipette	Eppendrf Xplorer® plus	Eppendorf
Elektrophoresekammer	Mini Trans-Blot® Cell	BioRad
Feinwaage	AG135	Mettler Toledo
Gefrierschrank	-20 °C -80 °C	Liebherr New Brunswick
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Homogenisator	Sonoplus HD 2070	Bandelin
konfokales Mikroskop	LSM 780	Zeiss
Kühlschrank		Liebherr
Lichtmikroskop	ECLIPSE TS100 Inverted routine microscope	Nikon
Magnetrührer	IKA Magnetrührer RH basic 2	IKA®-Werke
Massenspektrometer	QExactive™ HF Hybrid Quadropol- Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific
Mikroplattenlesegerät	Infinite® 200 PRO	Tecan
Mikrovolumen- Spektralphotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Multi-Rotator	PTR-35	Grant-bio
Neubauer-Kammer	Neubauer improved	LO-Labor Optik
pH-Meter	pH522	WTW
Pipetten		Gilson und Eppendorf
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2	Inegra Biosciences
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph instruments
Reaktionsgefäßrüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Rollenschüttler	RM 5	Ingenieurbüro CAT
Spannungsgerät	PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000c	Thermo Fisher Scientific
Sterile Werkbank	Thermo Scientific™ Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Thermozykler	T100™ Thermal Cycler	BioRad
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter L8-60M	Beckmann
Wasserbad	Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL
Wasserdeionisierungsanlage	Milli-Q® Integral Wasseraufbereitungssystem	Merck Milipore
Western Blot Kammer	Mini Trans-Blot® Cell	BioRad
Wippe	Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph
Zellinkubator	Heracell™ 240i	Thermo Fisher Scientific
Zellzählautomat	TC20™ Automated Cell Counter	BioRad
Zentrifugen	Mikro 200 R Rotanta 460 R Sigma 1-14	Hettich Hettich Sigma

3.2. Allgemeines Labormaterial

Bezeichnung	Typ	Firma
Deckgläschen	Superfrost	Menzel
Blotting-Filterpapier		BioRad
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific
Einwegpipetten	Costar-Stripetten 5 ml, 10 ml, 25ml, 50 ml	Costar
Elektronische Pipette	Eppendorf Xplorer®	Eppendorf
FACS-Röhrchen		BD Bioscience
Glaswaren	Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messzylinder	Schott
Gefäße für Durchflusszytometrie	BD Falcon™	BD Bioscience
Kryoröhrchen	Cryo.s™	Greiner Bio One
Küvetten	Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt
Loch-Platten	6-,12-, 24-, 48-,96-Loch-Platten	Sarstedt
Nitrozellulose-Membran	Trans Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membran 0,45 µm	BioRad
Objektträger	Superfrost	Menzel
Pipetten	Research plus; Reference; Research	Eppendorf
Pipettenspitzen	TipOne® 10, 20, 100, 200, 1000µl	Starlab
Reaktionsgefäße klein	0,5ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße groß	15ml, 50ml BD Falcon™	BD-Bioscience
Sterilfilter	0,45 µm	Sarstedt
Rührfisch		
Ultrazentrifugationsgefäße	Beckmann Polyallomer Zentrifugations-Röhrchen	Beckmann
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T25, T75, T175 Standard	Sarstedt
Zellkulturflaschen	Cellstar 10 cm, 20 cm	Greiner Bio One
Zellkulturplatten	Corning™ Costar™ Zellkulturplatten mit flachen Böden	Costar GmbH
Zellzähl-Objektträger	Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter	BioRad

3.3. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific
Acrylamid	AppliChem
Agarose	Invitrogen
Amoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	AppliChem
BCA Protein Assay Reagent A, Reagent B	Thermo Fisher Scientific
BlockAid™ Blocking Lösung	Life technologies
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem
Calciumchlorid (CaCl)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
GelPilot DNA Loading Dye	Qiagen
Harnstoff	GE Healthcare LifeSciences
HEPES	Roth
Image-iT™ FX Signal Enhancer ReadyProbes™ Reagent	Life technologies
Indol-3-Essigsäure	Sigma Aldrich
Isopropanol	Sigma Aldrich
LB-Agar (Lennox)	Roth
LB-Medium (Lennox)	Roth
Ligase-Puffer	New England Biolabs
Methanol	Sigma Aldrich
Milchpulver	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Riedel de Haen
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel de Haen
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	AppliChem
n-Dodecyl-β-D-maltosid	AppliCem
N-Ethylmaleinimid	Sigma Aldrich
NP-40	BioCat
Pfu-DNA-Polymerase	AppliChem
Ponceau S	AppliChem
ProLong® Diamond Antifade Mountant	Life technologies
Protease Inhibitor Cocktail cOmplete™	Roche
RNase A	Macherey-Nagel
S.O.C.-Medium	Thermo Fisher Scientific
Salzsäure 37% (HCl)	Merck
β-Glycerophosphat	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	AppliChem
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris-Hydrochlorid	Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich
Trypsin	Promega
Tween-20	Roth
UltraPure™ DNase/RNase-free Distilled Water	Thermo Fisher Scientific
Universal-Agarose	Peqlab

3.4. Puffer

Die Puffer wurden mit doppelt deionisiertem Wasser hergestellt und bei max. 25 °C gelagert. Lysepuffer wurden für jeden Versuch stets frisch angesetzt.

Puffer	Zusammensetzung bzw. Hersteller
DNA-Ladepuffer , 6x konz.	Firma: Thermo Fisher Scientific
DPBS	Firma: Gibco
FastDigest Buffer , 10x konz.	Firma: Thermo Fisher Scientific
FastDigest Buffer Green , 10x konz.	Firma: Thermo Fisher Scientific
HEPES-Puffer , 2x konz.	50 mM HEPES (pH 7,05) 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
Laemmlipuffer , 4x konz.	Firma: BioRad
Modifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) NP-40 0,1% Natriumdeoxycholat <u>Unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen (ad 10 ml):</u> 1x Protease Inhibitor Cocktail cOmplete™ 1 mM Na ₃ VO ₄ 5 mM NaF 5 mM β-Glycerophosphat 10 mM N-Ethylmaleinimid
NP40-Lyse-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/Cl (pH 7,5) 5 mM NaF 0,5% NP40 <u>Unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen (ad 10 ml):</u> 1x Protease Inhibitor Cocktail cOmplete™ 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,5% (v/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid
Pfu-Puffer mit MGSO₄	AppliChem
Staining Buffer	3% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 0,09% (w/v) Natriumazid Gelöst in DPBS
TAE-Puffer	40 mM Tris/Cl (pH 8,0) 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
TBS , 10x konz.	4 M Tris/HCL 10 M NaCl 6 M KCl
TBS-Tween	400 mM Tris/Cl (pH 8,0) 1 M NaCl 600 mM KCl 0,1% (v/v) Tween-20
Tris/Glycin Puffer , 10x konz.	Firma: BioRad
Tris/Glycin/SDS Puffer , 10x konz.	Firma: BioRad
Urea-Lyse-Puffer	20 mM HEPES(pH 8,0) 9 M Harnstoff 1 mM Na ₃ VO ₄ 2,5 mM Natriumdiphosphat 1 mM β-Glycerophosphat

3.5. Antikörper zur Detektion

3.5.1. Western Blot

Primäre Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
β -Aktin	Maus	CellSignaling	1:3.000
ERK	Kaninchen	CellSignaling	1:1.000
FLT3	Kaninchen	Santa Cruz	1:1.000
pERK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	CellSignaling	1:1.000
SYK	Kaninchen	CellSignaling	1:1.000
pSTAT5	Kaninchen	CellSignaling	1:1.000
STAT5	Kaninchen	CellSignaling	1:1.000

Sekundäre Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
F(ab') ₂ anti-Kaninchen-IgG, HRPO-gekoppelt (H+L)	Ziege	Jackson Immuno Research	1:10.000
F(ab') ₂ anti-Maus-IgG, HRPO-gekoppelt (H+L)	Ziege	Jackson Immuno Research	1:10.000

3.5.2. Immunfluoreszenz

Primäre Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
Flt-3/Flk-2	Kaninchen	Santa Cruz	1:100
PDI	Ziege	Santa Cruz	1:100

Sekundäre Antikörper	Spezies	Firma	Verwendeter Laser zur Anregung	Verdünnung
Alexa Fluor® 555, <i>donkey anti-goat</i>	Esel	ThermoFisher Scientific	561 nm	1:1.000
Alexa Fluor® 647, <i>goat anti-rabbit</i>	Ziege	ThermoFisher Scientific	647 nm	1:1.000

3.5.3. Massenspektrometrie

Antikörper	Firma
pY1000	Cell Signaling

3.6. Restriktionsenzyme

Enzym	Firma
FastDigest SnaBI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest MfeI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest PstI	Thermo Fisher Scientific

3.7. Plasmide

Name	Kommentar
pcDNA3.MLVgp	<i>GagPol</i> -Plasmid (benötigt zur Transduktion)
pMy-IRES-GFP	Siehe Kitamura et al. ⁷⁵
pMy-FLT3-ITD	Siehe Brandts et al. ⁷⁶
pMy-FLT3-ITD F691L	Neu hergestellt
pMy-FLT3-ITD D835V	Neu hergestellt
VSV-G	<i>Env</i> -Plasmid (benötigt zur Transduktion)

3.8. Oligonukleotide

3.8.1. PCR-Primer

Name	Sequenz
ITD D835V i as	5'-C CCT GAC AAC ATA GTT GGA ATC ACT CAT TAT AAC TCG AGC CAA TCC AAA GTC ACA TAT CTT C-3'
ITD D835V i s	5'-G AAG ATA TGT GAC TTT GGA TTG GCT CGA GTT ATA ATG AGT GAT TCC AAC TAT GTT GTC AGG G-3'
ITD F691L i as	5'-G ATA GTT GAG AAG ATC ACC ATA GCA ACA ATA TTC CAA AAT CAA GTA AAT TGG TCC TGA CAG TGT G-3'
ITD F691L i s	5'-C ACA CTG TCA GGA CCA ATT TAC TTG ATT TTG GAA TAT TGT TGC TAT GGT GAT CTT CTC AAC TAT C-3'
ITD o as	5'-GGA GAG GGG CGG AAT TTA C-3'
ITD o s	5'-CCC TTT CAT CCA AGA CAA CA-3'

3.8.2. Sequenzierungs-Primer

Name	Sequenz
FLT3-ITD Seq 1	GAT CAC AGA AGG AGT CTG GA
FLT3-ITD Seq 2	CTG GAA GAA GAG GAG GAC TTG A

3.9. Bakterien

Bezeichnung	Firma
Escherichia coli (DH5- α)	New England Biolabs

3.10. Zelllinien

Alle Zelllinien stammen vom Leibnitz-Institut: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) aus Braunschweig.

Bezeichnung	Spezies
32D	Maus
Ba/F3	Maus
HEK293T-Zellen	Mensch

3.11. Medien

3.11.1. Verwendete kommerzielle Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien werden bei 4 °C gelagert.

Medium	Hersteller
DMEM	Gibco
RPMI 1640	Gibco
RPMI 1640 für SILAC	Thermo Fisher Scientific

3.11.2. Verwendete Zusätze

Zusatz	Hersteller
dFCS	Sigma Aldrich
FCS	Sigma Aldrich
L-Arginin	Sigma Aldrich
L-Arginin +6 (L-Arginin: HCl ¹³ C ₆)	Euriso-top
L-Arginin +10 (L-Arginin: HCl ¹⁵ N ₄ ¹³ C ₆)	Euriso-top
L-Glutamin 200 mM	Gibco Life Technologies
L-Lysin	Sigma Aldrich
L-Lysin +4 (L-Lysin: 2HCl ² H ₄)	Euriso-top
L-Lysin +8 (L-Lysin: 2HCl ¹⁵ N ₂ ¹³ C ₆)	Euriso-top
L-Prolin	Roth
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies

3.11.3. Zytokin

Zytokin	Hersteller
Rekombinantes murines IL-3	Peprtech

3.11.4. Zusammensetzung Zellkulturmedien

Die Aufbewahrung der gemischten Medien erfolgt bei 4°C.

3.11.4.1. Standard-Zellkulturnährmedien

Zellmedium	Zusammensetzung
DMEM-Medium	DMEM 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium	90% (v/v) Hitzeinaktiviertes FCS 10% (v/v) DMSO
RPMI-Medium	RPMI 1640 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin (bei Wildtyp-Zellen und Zellen, die den Vektor pMy-IRES-GFP exprimieren zusätzlich 1-10 ng/ml m-IL3 je nach Zelllinie)

3.11.4.2. SILAC-Zellkulturnährmedien

Für weitere Informationen zum Thema SILAC siehe Kapitel 4.4.1. SILAC-Markierung.

SILAC-Medium	Zusammensetzung
„leicht“	SILAC-RPMI 1640 10% (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1,965 mM L-Prolin 0,13 mM L-Arginin 0,31 mM L-Lysin (bei Zellen, die den Vektor pMy-IRES-GFP exprimieren zusätzlich 1-10 ng/ml m-IL3 je nach Zelllinie)
„mittelschwer“	SILAC-RPMI 1640 10% (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1,965 mM L-Prolin 0,13 mM L-Arginin +6 0,31 mM L-Lysin +4
„schwer“	SILAC-RPMI 1640 10% (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1,965 mM L-Prolin 0,13 mM L-Arginin +10 0,31 mM L-Lysin +8

3.12. Kinase-Inhibitoren

Substanz	Primäres Ziel	Firma
AC220 (Quizartinib)	FLT3	Selleckchem
Bay 61-3606	SYK	Santa Cruz
Ibrutinib	BTK	Selleckchem
PRT062607	SYK	Sigma Aldrich
PP1	SRC	Sigma Aldrich
PP2	SRC	Selleckchem
R406	SYK	Selleckchem

3.13. Größenstandards

3.13.1. Protein Größenstandard

Name	Firma
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained	BioRad
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BioRad

3.13.2. DNA-Größenstandard

Name	Firma
DirectLoad™ 1 kb DNA Ladder	Sigma Aldrich
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific

3.14. Kommerzielle Kits

Experiment	Bezeichnung	Firma
Aufreinigung aus Gelen	QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
	QIAquick® PCR Purification Kit	
Cytospins	Image-IT®	Life technologies
	Fixation/Permeabilization Kit	
Midi-Präp	NucleoBond® Xtra Midi plasmid purification Kit	Qiagen
Mini-Präp	GeneJET Plasmid Miniprep Kit®	Thermo Fisher Scientific
Signalverstärker <i>Western Blot</i>	SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific
XTT	Cell Proliferation Kit II	Roche

3.15. Software

Software	Firma
Adobe Creative Suite 6 Design & Web Premium	Adobe
APE (A plasmid Editor)	Wayne Davis
BD FAS DIVA Software Version 8.0.1	BD Bioscience
Fiji	National Insitute of Health
Gencode annotation vM7	Gencide
MaxQuant v1.5.2.4	Siehe Cox und Mann ⁷⁷
PhosphoSitePlus	Cell Signaling Technology, Inc.
UniProt human database	UniProt
ZEN	Carl Zeiss Microscopy GmbH

4. Methoden

4.1. Einführung der AC220-Resistenzmutationen F691L und D835V in FLT3-ITD

4.1.1. Ausgangssituation

Für vorangegangene Experimente im Bereich der AML-Forschung am Universitätsklinikum Frankfurt am Main wurden aus dem Knochenmark eines AML-erkrankten Patienten Zellen für Forschungszwecke entnommen. Aus der cDNA von AML-Blasten wurde die FLT3-ITD Mutation in den Vektor pMy-IRES-GFP amplifiziert (Abbildung 6). Für weitere Informationen siehe Brandts et al.⁷⁶ sowie Mizuki et al.⁷⁸ und Choudhary et al.⁵² Die Aminosäure-Sequenz der ITD Mutation im Einbuchstaben-Code lautet hierbei *NEYFYVDFREYE*.



Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors pMy-FLT3-ITD. LTR: *long terminal repeat*, Ψ : *packaging signal*, IRES: *internal ribosome entry site*, eGFP: *enhanced GFP*.

4.1.2. Klonierung mittels Overlap-PCR

Um den Einfluss von Resistenzmutationen auf die FLT3 Signalleitung zu untersuchen, wurden in einem ersten Schritt die beiden Mutationen F691L und D835V in die Aminosäuresequenz von FLT3-ITD eingefügt. Dafür wurden die AC220-Resistenzmutationen F691L und D835V mittels Overlap-PCR generiert und in den Vektor pMy-FLT3-ITD eingebracht. Es wurden für jede Resistenzmutation jeweils zwei PCR-Amplifikate synthetisiert, deren Sequenz sich teilweise überlagert. In einer dritten PCR wurden die beiden Sequenzen zu einem längeren Produkt kombiniert amplifiziert (Abbildung 7). Die einzubringende Mutation befindet sich im Bereich der sich überlappenden Sequenz.

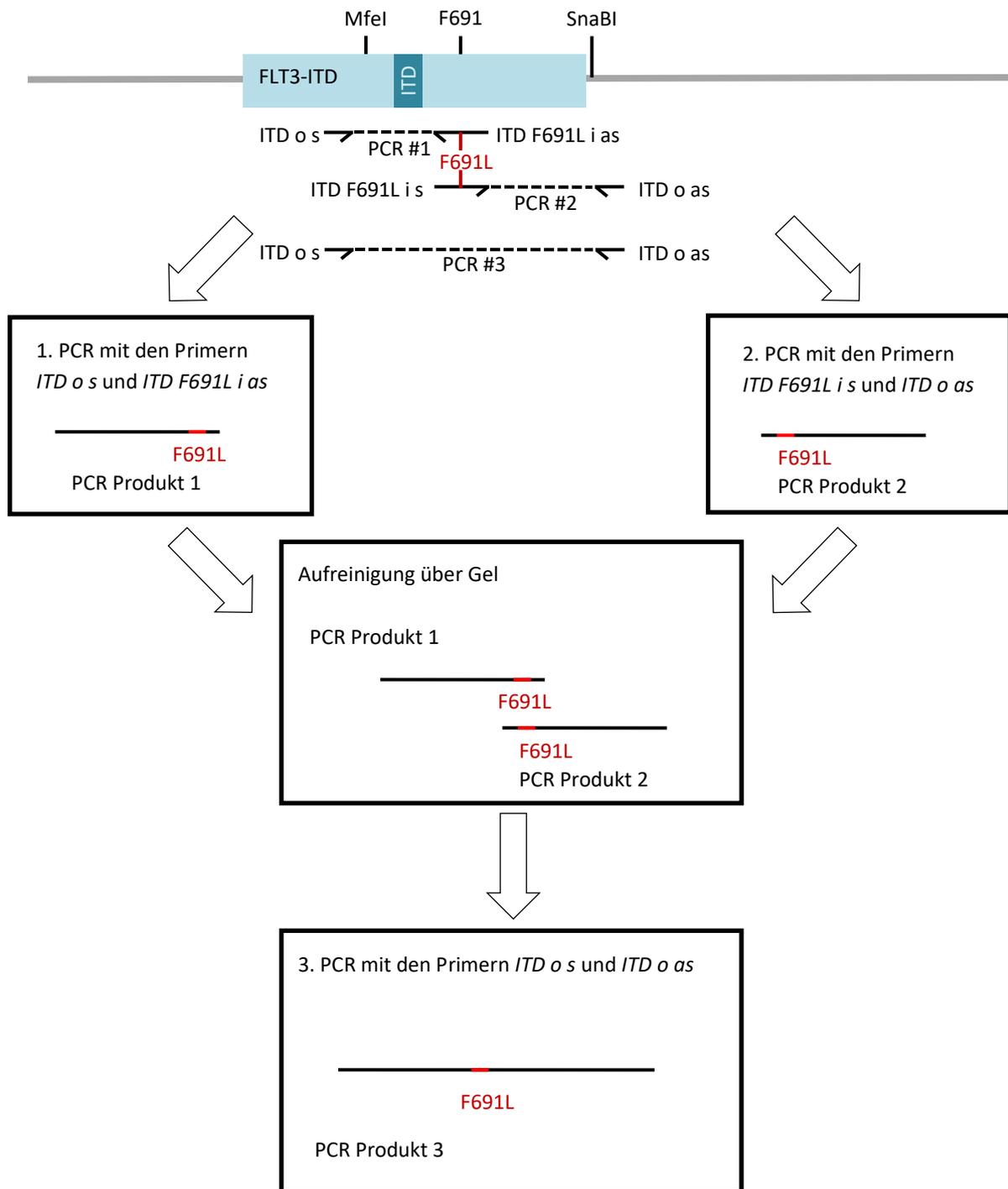


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung des PCR-Produktes mit der Mutation F691L mittels *Overlap-PCR*. Analog geschieht auch die Herstellung eines PCR-Produktes mit der Mutation D835V.

Für die Herstellung eines PCR-Amplifikates mit der Punktmutation F691L wurden die Primer *ITD F691L i as*, *ITD F691L i s*, *ITD o as* und *ITD o s* und für die Herstellung der Mutation D835V die Primer *ITD D835V i as*, *ITD D835V i s*, *ITD o as* und *ITD o s* verwendet. (Die Primer-Sequenzen finden sich im Kapitel 3.8.1. PCR-Primer).

4.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Vervielfältigung vorliegender DNA. Zu Beginn wurde die vorliegende (engl. *template*) DNA für zwei Minuten bei 95°C denaturiert. Danach folgten für die durchgeführten Experimente jeweils 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, d.h. Strangtrennung der DNA bei 95°C, *Annealing* für jeweils 30 Sekunden sowie einer Elongationsphase von 3 Minuten bei 72°C. Das *Annealing* wurde bei einem Gradienten zwischen 55°C und 65°C durchgeführt, um eine möglichst effektive Amplifikation zu gewährleisten. Während des *Annealings* lagern sich die komplementären Primer an die vorhandene DNA an. Diese Primer wurden während der Elongation um die zur *Template*-DNA passenden Nukleotide ergänzt. Die PCR endete mit einer verlängerten Elongation von 10 min bei 72°C (Tabelle 5).

Bis zur Entnahme verblieben die Proben gekühlt in der PCR-Maschine bei 4°C.

PCR-Programm	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Denaturierung zu Beginn	95	2:00
Denaturierung	95	0:30
Annealing	55-65 (Gradient)	0:30
Elongation	72	3:30
Elongation zum Abschluss	72	10:00
	4	∞

Tabelle 5: PCR-Programm

Aufgrund des verwendeten Temperatur-Gradienten wurde für mehrere Ansätze (Tabellen 6 und 7) zeitgleich eine PCR durchgeführt und nur der Ansatz mit der mengenmäßig erfolgreichsten Amplifikation weiter verwendet. Die Basensequenzen der Primer finden sich im Kapitel 3.8.1. PCR-Primer.

	Einfacher Ansatz [µl]	Vierfacher Ansatz [µl]
10x Pfu Puffer mit MgSO ₄	5	20
dNTP Mix (10 mmol/l)	1	4
Forward Primer (100 µmol/l)	0,5	2
Reverse Primer (100 µmol/l)	0,5	2
Template-Plasmid-DNA	1 µg	4 µg
Pfu DNA Polymerase	1	4
ddH ₂ O	ad 50	ad 200

Tabelle 6: Pipettierschema von PCR #1 und #2. Die *Template*-Plasmid-DNA entspricht dem Vektor pMy-FLT3-ITD

	Einfacher Ansatz [µl]	Vierfacher Ansatz [µl]
10x Pfu Buffer mit MgSO₄	5	20
dNTP Mix (10 mmol/l)	1	4
Forward Primer (100 µmol/l)	0,5	2
Reverse Primer (100 µmol/l)	0,5	2
Produkt aus PCR 1	0,1 µg	0,4 µg
Produkt aus PCR 2	0,1 µg	0,4 µg
Pfu DNA Polymerase	1	4
ddH₂O	ad 50	ad 200

Tabelle 7: Pipettierschema von PCR #3

4.1.4. DNA-Auftrennung über Gel

Für die Agarose-TAE-Gele wurde 1,5% Gewichtsprozent Agarose in 100 ml TAE-Puffer (siehe Kapitel 3.4. Puffer) gelöst und anschließend für 2 Minuten in der Mikrowelle aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurde der gelösten Agarose 3 Tropfen Ethidiumbromid (250µg/ml) zugesetzt und die noch heiße Flüssigkeit in eine Form gegossen. Mit einem Kamm wurden Taschen für das spätere Auftragen der Proben offengehalten.

Die in der PCR gewonnene DNA wurde mit selbst hergestelltem 6x DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:6 gemischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die DNA passierte das Gel in Abhängigkeit ihrer Größe und Form unterschiedlich schnell in Richtung Anode und konnte dadurch im Gel aufgetrennt werden. Nach dem Trennvorgang bei 110 V wurde das Gel unter UV-Licht analysiert. Die DNA wurde aufgrund der Interaktion mit dem zugegebenen Ethidiumbromid sichtbar.

Die Bestimmung der Fragmente erfolgte anhand der Länge, weshalb neben den Proben zusätzlich ein Größenmarker aufgetragen wurde. Die verwendeten Marker bestehen aus linearen doppelsträngigen DNA-Fragmenten.

4.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits bzw. des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen. Hierbei wurde streng das Protokoll des Herstellers eingehalten. Die DNA wird in diesen Kits unter hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen und einem pH-Wert $\leq 7,5$ an die Kieselgelmembran einer Säule gebunden, gewaschen und im basischen Milieu bei niedriger Salzkonzentration eluiert.

4.1.5.1. Aufreinigung aus Gelen

Die Aufreinigung der DNA aus Gelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit. Nach Detektion der DNA durch UV-Licht wurden Teile des Agarose-TAE-Gels ausgeschnitten und mit dem Puffer QG im Verhältnis Masse zu Volumen (w/v) 1:3 gemischt. Bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 50°C löste sich das Gel unter gelegentlichem Vortexen. Durch den Puffer wurde der benötigte pH ($\leq 7,5$) erreicht. In diesem Fall färbte sich der dem Puffer zugesetzte pH-Indikator gelb (Bei höheren Werten besitzt der Indikator eine orange bzw. violette Färbung). Falls nötig wurde der pH mit 3 M Natrium-Acetat (pH 5.0) gesenkt, bis sich der Indikator in der DNA-Puffer-Lösung gelb färbte. Für DNA-Fragmente mit weniger als 500 bp oder über 4 kb konnte durch Zugabe von Isopropanol (das Volumen des Isopropanols entsprach dem vorher ermittelten Gewicht des Gelstücks) die Menge der gewonnenen DNA erhöht werden.

Die DNA-Lösung wurde auf eine Säule aufgetragen, anschließend bei 17000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und die durch die Säule in ein Reaktionsgefäß gelaufene Flüssigkeit verworfen. Es folgte ein Waschvorgang mit 750 μ l PE-Puffer, der Verunreinigungen wie z.B. Agarosereste oder Ethidiumbromid entfernte. Die Säule wurde anschließend unter gleichen Bedingungen zwei weitere Male für 60 Sekunden zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen und die jeweils durch die Säule gelaufene Flüssigkeit verworfen. Zum Eluieren wurde die Säule mit 30 μ l sterilem Wasser beladen, eine Minute in senkrechter Position aufgestellt und zentrifugiert. Das Wasser wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktions-Gefäß aufgefangen. Der Schritt der Elution wurde zwei Mal wiederholt, um möglichst viel DNA aus der Säule zurück zu gewinnen.

4.1.5.2. Aufreinigung von enzymatisch behandelter DNA

PCR-Produkte oder verdaute DNA wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufbereitet. Zu Beginn wurde der Puffer PB im Verhältnis 1:5 zur DNA zugegeben, um ein salzreiches Milieu und einen pH von $\leq 7,5$ zu erzielen. Der Puffer enthält einen pH-Farbindikator, der nur bei einem pH von weniger als 7,5 eine gelbe Färbung aufweist. Im Basischen ist der Indikator orange bzw. violett. Wenn nötig konnte der pH mit 3 M Natrium-Acetat (pH 5.0) gesenkt werden.

Im weiteren Verlauf unterscheidet sich das Protokoll nicht von dem des QIAquick Gel Extraction Kits (siehe Kapitel 4.1.5.1. Aufreinigung aus Gelen).

4.1.6. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Bakterien verfügen über Restriktionsendonukleasen, die spezifische doppelsträngige DNA-Sequenzen scheiden. Hierbei handelt es sich meist um Palindrome.

Sowohl die PCR-Amplifikate F691L und D835V (Tabelle 8) als auch der Vektor pMy-FLT3-ITD (Tabelle 9) wurden mit den Restriktionsendonukleasen SnaBI und MfeI (Tabelle 10) behandelt. Hierdurch verlor der Vektor seinen circulären Aufbau und die Amplifikate besaßen zum Vektor komplementäre Enden.

Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate	[μ l]
Aufgereinigtes PCR-Produkt	26
10x FastDigest Puffer	2
SnaBI	1
MfeI	1

Tabelle 8: Restriktionsverdau des PCR-Amplifikates F691L bzw. D835V

Restriktionsverdau des Vektors	[μ l]
Plasmid	2 μ g
10x FastDigest Puffer Green	4
SnaBI	2
MfeI	2
ddH ₂ O	ad 40 μ l

Tabelle 9: Restriktionsverdau des Vektors pMy-FLT3-ITD

Enzym	Schnittsequenz
MfeI	CAA ∇ TTG
	GTT \blacktriangle AAC
PsiI	TTA ∇ TAA
	AAT \blacktriangle ATT
SnaBI	TAC ∇ GTA
	ATG \blacktriangle CAT

Tabelle 10: Verwendete Restriktionsendonukleasen mit Schnittsequenzen

Die Ansätze wurden für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte daraufhin durch kurzfristiges Erhitzen oder durch Zugabe eines 6x DNA-Ladepuffers.

Im vorliegenden Fall wurde die später zu ligierende DNA immer mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, um ein selbstständiges Religieren der gerade geschnittenen DNA zu verhindern.

Als weitere Möglichkeit der Qualitätskontrolle wurde der veränderte Vektor FLT3-ITD D835V mit der bakteriellen Restriktionsendonuklease PstI verdaut. Durch die veränderte Basensequenz im Rahmen der Mutagenese von D835V entstand eine weitere Schnittstelle für die PstI (Tabelle 10), sodass sich bei einem Restriktionsverdau drei statt zwei Fragmente ergaben, die bei Auftrennung in einem Gel dargestellt wurden.

4.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Das ursprünglich aus T4-Phagen stammende Enzym T4-DNA-Ligase ist in der Lage sowohl glatte als auch überhängende Enden von DNA zusammenzufügen.

Das durch die PCR gewonnene Produkt beinhaltete entweder die Mutation F691L oder D835V (siehe Kapitel 4.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)). Sowohl der Vektor als auch das Insert lagen in verdauter, aufgereinigter Form mit kompatibel-geschnittenen Enden vor. Die Ligation erfolgte bei den gewählten Verhältnissen von Vektor zu Insert 1:3, 1:5 und 1:7. Als Religationskontrolle wurde ein Ligationsansatz verwendet, der nur das verdaute Vektor-Rückgrat, jedoch kein Insert enthielt (Tabelle 11).

Ligation der Vektoren	1:3 [µl]	1:5 [µl]	1:7 [µl]	Vektor-Religation [µl]
H ₂ O	13	11	9	16
10x Ligase-Puffer	2	2	2	2
Vektor (pMY-FLT3-ITD)	1	1	1	1
Insert (PCR Produkt F691L oder D835V)	3	5	7	-
T4 DNA-Ligase	1	1	1	1

Tabelle 11: Ligation der Vektoren pMy-FLT3-ITD F691L und pMy-FLT3-ITD D835V

4.1.8. Transformation in chemokompetente Zellen

Einige Bakterien sind in der Lage freie DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Bei Behandlung der Bakterien mit Calciumchlorid wird durch die Ca²⁺-Ionen die durch Phosphatgruppen negativ-geladene

Bakterienmembran elektrisch neutralisiert. Dadurch können sich bei gemeinsamer Inkubation Plasmide von außen an den Zellmembranen anlagern. Durch einen Hitzeschock werden die Zellmembranen von Bakterien wie *E. coli* kurzzeitig permeabel, sodass diese freien Plasmide aufgenommen werden können. Die Bakterien benötigen daraufhin einige Zeit, um sich zu regenerieren und um das auf dem Plasmid codierte Antibiotika-Resistenz-Gen zu synthetisieren.

Je Ansatz wurden 50 µl chemokompetente *E. coli* auf Eis aufgetaut und auf den vorbereiteten Ligationsansatz pipettiert. Alle Pipettierschritte erfolgten unmittelbar neben einem Bunsenbrenner. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis, an die sich ein 60 Sekunden dauernder Hitzeschock bei 42°C anschloss. Zum Abkühlen wurden die Bakterien kurz auf Eis gekühlt, um den Hitzeschock zu beenden. Nach Zugabe von 400 µl S.O.C.-Medium wurden die Bakterien für 45 Minuten bei 37°C in einem Heizblock mit 700 rpm geschüttelt.

Die Zellen wurden nach der Inkubation auf dem Heizschüttler 5 min bei ca. 2.000 x g zentrifugiert und 400 µl Medium abgenommen. Im restlichen Medium wurden die Bakterien resuspendiert. Um die erfolgreich transformierten *E. coli* zu selektionieren, wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin-haltigem Agar ausgebracht, auf dem sich nur Bakterien mit aufgenommenem Plasmid vermehren konnten. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Das angewendete Prinzip der DNA-Isolierung beruht auf dem 1979 von Birnboim und Doly entwickelten Prinzip.⁷⁹ Die Isolierung begann mit der Zentrifugation von Plasmid-exprimierenden *E. coli*. Die Bakterien wurden daraufhin in einem Puffer mit EDTA und RNase A resuspendiert. EDTA bildete hierbei Komplexe mit zweiwertigen Kationen wie Mg²⁺ oder Ca²⁺, wodurch die Zellmembran destabilisiert wurde; die zugesetzte RNase A spaltete einzelsträngige RNA. Im nächsten Schritt wurden die Zellen im alkalischen Milieu mit SDS lysiert. Mit dem Detergenz SDS wurden die Lipide und Proteine aus der Zellmembran gelöst. Das alkalische Milieu denaturierte die Proteine, Plasmid- und chromosomale DNA.

Die Neutralisierung erfolgte mit saurem Kaliumacetat-Puffer, wodurch schwer lösliches Kaliumdodecylsulfat entstand. Dieses bildete u. a. mit denaturierten Proteinen, RNA, chromosomaler DNA und weiterem Zelldebris unlösliche Komplexe, die dadurch aus der Lösung ausfielen. Durch die Neutralisation renaturierte die kleinere Plasmid-DNA und verblieb deshalb anders als die anderen Bestandteile in Lösung.

Die Probe wurde anschließend filtriert, wodurch die ausgefallenen Komplexe von der restlichen Probe getrennt wurden. Nachgeschaltet an den Filter befand sich eine Kieselgelmembran, an die in saurem pH die Plasmid-DNA gebunden wurde. Eventuelle RNA, Proteine oder Proteinfragmente wurden von der Membran nicht gebunden und fanden sich deshalb im ungebundenen Filtrat wieder.

Vor der Elution der Plasmid-DNA aus der Säule musste zuvor noch das Salz durch einen Waschvorgang entfernt werden. Anschließend wurde zur Elution der pH ins Basische verschoben. Bei einem pH zwischen 7,0 und 8,5 konnte die DNA mit Wasser oder alternativ einem speziellen Puffer aus der Säule gelöst werden.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

4.1.9.1. Plasmidisolierung zu analytischen Zwecken: Mini-Präparation

Für die Mini-Präparation wurde das Protokoll des GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Von einer selektiven LB-Ampicillin-Agarplatte wurde jeweils ein Klon von *E. coli* in 4 ml LB-Ampicillin-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37°C bei 300 rpm inkubiert.

Zu Beginn der Mini-Präp wurden die Bakterien bei 6.800 x g bei RT für 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 250 µl RNase A-haltiger Resuspensionslösung aufgenommen. Unmittelbar nach dem Dazugeben von 250 µl Lyselösung wurde das Gefäß vier- bis sechsmal invertiert, um eine optimale Durchmischung zu gewährleisten. Nach fünf Minuten wurde die Lyse durch Zugabe von 350 µl Neutralisationslösung gestoppt. Das Gefäß wurde nachfolgend erneut mehrmals invertiert. Um die DNA von größeren Unreinheiten, wie groben Zelldebris oder

chromosomaler DNA zu trennen, wurde das Reaktionsgefäß für 5 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten mit 12.000 x g.

Der Überstand wurde auf eine GeneJet Säule mit Kieselgel pipettiert. Die notwendigen Bedingungen (hoher Salzgehalt, pH zwischen 7 und 8,5) für das Kieselgel wurden durch die Zugabe des Neutralisationspuffers geschaffen. Die Säulen wurden für eine Minute zentrifugiert, um die DNA an die Säule zu binden. Die Flüssigkeit wurde anschließend verworfen. Die Säulen wurden daraufhin zwei Mal mit 500 µl ethanolhaltiger Waschlösung gewaschen, anschließend für je eine Minute zentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen, wodurch Salze, kleine Metaboliten oder RNA von der Säule gewaschen wurden. Um die Säulen zu trocknen, wurden sie ein weiteres Mal zentrifugiert.

Die Elution erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser, wäre prinzipiell jedoch auch mit 50 µl Elutionspuffer möglich gewesen. Nach 2 Minuten Einwirkzeit des Wassers in den Säulen, wurden die Säulen für 2 Minuten zentrifugiert und die Flüssigkeit in einem neuen, sauberen Gefäß aufgefangen. Das erneute Beladen der Säule mit der zuvor eluierten Flüssigkeit erhöhte die Menge an gewonnener DNA.

Die vollständig aufbereiteten DNA-Proben wurden bei -20°C eingefroren.

4.1.9.2. Plasmidisolierung im präparativen Maßstab: Midi-Präparation

Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurde das NucleoBond Xtra Midi Plasmid Purification Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Von einer selektiven LB-Ampicillin-Agarplatte wurde jeweils ein Klon von *E. coli* für eine Vorkultur über Tag (37°C, 300 rpm) in 4 ml LB-Ampicillin-Medium aufgenommen. Die Vorkultur wurde abends in 200 ml LB-Ampicillin-Medium überführt und bis zum nächsten Morgen bei 37°C bei 300 rpm inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde nach etwa 8-10h Inkubationszeit bei 4.000 x g bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die *E. coli* in 16 ml Resuspensionspuffer (enthält RNase) aufgenommen. Für die Lyse wurde die gleiche Menge an Lysepuffer hinzugegeben und das Gefäß mehrfach invertiert. Nach 5

Minuten Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 16 ml Neutralisationspuffer, das Gefäß wurde mehrfach invertiert und anschließend für ca. 5 Minuten auf Eis gekühlt.

In der Zwischenzeit wurde eine NucleoBond Xtra Säule mit Kieselgelmembran mit 12 ml Puffer EQU äquilibriert. Die Proben wurden unmittelbar vor dem Aufbringen auf die Säule noch einmal gut durchmischt. Auf der Säule wurde das Lysat im gleichen Schritt gefiltert und gebunden. Nach dem Laden erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 5 ml EQU. Daraufhin wurde der Filter verworfen und die Säule mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen und dadurch von Salzen und Metaboliten befreit.

Eluiert wurde mit 5 ml des Puffers ELU. Das Eluat wurde mit der 0,7 fachen Menge Isopropanol (3,5 ml) präzipitiert und in eine 30 ml Spritze geladen. Auf die Spritze wurde ein NucleoBond Finalizer gesteckt und die Flüssigkeit anschließend mit minimalem Druck hindurch gepresst. Danach wurde der Finalizer mit 70%igem Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet. Abschließend wurde die DNA mit 400 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Durch mehrfache Wiederholungen konnte die Ausbeute an gewonnenem Plasmid erhöht werden.

Die Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

4.1.10. Sequenzierung nach Sanger

Beim Verfahren der Kettenabbruchmethode nach Sanger werden physiologische 2'-Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) mit einem geringen Teil von 2',3'-Dideoxyribonukleotiden (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) gemischt.⁸⁰ Eine Weiterentwicklung des Verfahrens macht sich Fluoreszenzfarbstoff zu Nutze, so dass nicht mehr mit radioaktiven Dideoxyribonukleotiden gearbeitet werden muss. Die vier verschiedenen Dideoxyribonukleotide sind stattdessen jeweils an einen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt

Die zu sequenzierende DNA wurde mit dem Gemisch aus Desoxy- und Dideoxynukleotiden sowie dem Enzym DNA-Polymerase und kurzkettigen DNA-Primern zusammengegeben. Zu Beginn wurde die DNA durch Hitze denaturiert. Anschließend lagerten sich die Primer an die DNA an und die DNA-Polymerase

katalysierte die Kondensation des ersten Nukleotids an den Primer. Nach und nach wurden weitere Nukleotide gebunden und so ein zur DNA komplementärer Strang synthetisiert. Die Kondensation eines 2'-Desoxyribonukleotides an den DNA-Strang ermöglichte die Verlängerung des Stranges um weitere Nukleotide. Wurde stattdessen ein 2',3'-Dideoxyribonukleotid an den Strang gebunden, bewirkte dies den Abbruch der Synthese, da aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe die DNA nicht weiter synthetisiert werden konnte. Hieraus ergaben sich DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge.

Durch Kapillarelektrophorese wurden die Fragmente daraufhin der Länge nach getrennt. Jeweils am Ende befand sich ein Dideoxyribonukleotid, das mit Hilfe eines Lasers einer definierten Wellenlänge angeregt und so zum Leuchten gebracht wurde. Aus der Reihenfolge der ermittelten Farbsignale ließ sich auf die Sequenz der DNA schließen.

Das Verfahren der modifizierten Kettenabbruchmethode wurde extern von der Firma SeqLab aus Göttingen übernommen. Der Firma wurden je 960 ng DNA in 12 µl und 20 µl (10 µmol/l) der Sequenzierungsprimer (für die Basensequenz siehe Kapitel 3.8.2. Sequenzierung) zugesendet. Die übermittelte Sequenz wurde mit Hilfe des Programms ApE („A plasmid Editor“) von Herrn Wayne Davis mit der Sequenz des Vektors pMY-GFP-IRES, bzw. der mRNA des FLT3-Gens als Blast Analyse verglichen.

4.2. Zellbiologische Methoden

4.2.1. Auftauen und Kryokonservierung von Zellen

Zum Auftauen wurde die eingefrorene Zellsuspension im Wasserbad bei 37°C zügig erwärmt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben, das bereits 10 ml des benötigten Mediums enthielt. Danach wurde die Suspension mit 300 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in neues Kulturmedium aufgenommen und für 24 Stunden in eine Kulturschale gegeben.

Die Kryokonservierung erfolgte bei adhärennten Zellen nach dem Trypsinieren (siehe Kapitel 4.2.3.1. Adhärennte Zellen). Die Zellen wurden auf ihre Viabilität hin untersucht und nur bei hoher Viabilität eingefroren. Dazu wurden die Zellen zwei Mal mit

gekühltem DPBS gewaschen, bei 4 °C mit 300 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen in eine 4 °C kalte Lösung aus 90% FCS und 10% DMSO überführt, in gewünschte Mengen portioniert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter überführt und dieser bis auf -80 °C abgekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen aus dem Behälter entnommen und bei -80°C weiter verwahrt. In der Regel wurden $2-5 \times 10^6$ adhärenente Zellen bzw. 10^7 nicht-adhärenente Suspensionszellen je Milliliter Einfriermedium aufgenommen.

4.2.2. Kultivieren von Zellen

Alle Zellen wurden zum Wachsen im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen entsprach dem von der DSMZ vorgeschlagenen Medium.

Die Zelllinie 32D wurde jedoch auf zwei Arten kultiviert: zum einen im Standardmedium mit den oben aufgeführten Zusätzen inklusive Interleukin-3 (siehe Kapitel 3.11.4.1. *Standard-Zellkulturnährmedien*) und zum anderen mit 10-20% WEHI-Überstand anstelle von IL-3. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen unter gleichen Bedingungen entsprechend ihres Wachstums und ihrer Viabilität analysiert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Wachstums. Daraufhin erfolgte, aufgrund der leichteren Handhabung, die weitere Kultivierung der 32D-Zellen mit IL-3 und ohne den WEHI-Überstand.

Die Kultivierung der Zellen, die massenspektrometrisch analysiert werden, erfolgte in SILAC-Medium (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.11.4.2. *SILAC-Zellkulturnährmedien* und weitere Informationen zur Methode Kapitel 4.4.1. SILAC-Markierung).

4.2.3. Splitten von Zellen

4.2.3.1. Adhärenente Zellen

Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 37 °C warmem DPBS gewaschen. Das DBPS wurde anschließend abgenommen und die Zellen für ca. 5 bis 10 Minuten mit 2-3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Dies bewirkte das

Ablösen der Zellen von der Gefäßwand. Durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurde der Vorgang beendet. Die Zellen wurden anschließend in ein zweites 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Bei geringer Viabilität wurde der Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt. Für eine konstante Zellzahl wurden die verwendeten HEK293T-Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:10 gesplittet.

4.2.3.2. Suspensionszellen

Die nicht-adhärenenten Suspensionszellen wurden mitsamt dem Medium aus dem Kulturgefäß entnommen und 5 min mit 300 x g zentrifugiert, das Medium daraufhin abgenommen und die Zellen je nach Viabilität einmal mit DBPS gewaschen oder direkt in neuem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:10 bis 1:20 gesplittet.

4.2.4. Bestimmung der Zellzahl

4.2.4.1. Mithilfe der Neubauer-Kammer

In der Neubauer-Kammer wurden pro Eckquadrat jeweils 0,1 µl Zellsuspension ausgezählt. 10 µl der Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Viabilität und zur besseren Kontrastierung mit 10 µl Trypanblau gemischt. Hieraus ergab sich eine Verdünnung von 50%. Unter dem Mikroskop wurden unter 100x Vergrößerung die Zellen in den vier Eckquadraten gezählt und das Ergebnis gemittelt. Tote Zellen unterschieden sich durch eine tiefblaue Färbung durch Trypanblau von ungefärbten, lebenden Zellen. Bei einer Verdünnung im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau ergab sich so eine Zellzahl pro Milliliter, die um 2×10^4 größer war als der gemittelte Zählwert.

4.2.4.2. Mithilfe des TC20 Automated Cell Counter

Die Zellen konnten alternativ auch automatisch mit dem TC20 Automated Cell Counter ausgezählt werden. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und die Hälfte der Menge auf einen hierfür vorgesehenen *Slide* gegeben. Das Gerät fokussierte automatisch den eingesetzten Slide und erkannte Partikel einer vordefinierten Größe als Zellen. Durch die Färbung mit Trypanblau konnte das Gerät

homogen ungefärbte, lebende Zellen von inhomogen blaugefärbten, toten Zellen unterscheiden.

4.2.5. Viraler Gentransfer in eukaryotische Zellen

Es wurden zeitgleich drei verschiedene Plasmide in Verpackungszellen eingebracht. Die Plasmide wurden dahingehend verändert, dass keine neuen Viruspartikel hergestellt werden konnten. HEK293T-Zellen als Verpackungszellen bildeten einmalig Viruspartikel, die in das Zellmedium freigesetzt wurden. Durch Zentrifugation wurden diese Partikel isoliert und in andere Zellen transduziert.

4.2.5.1. Aussäen der Verpackungszellen

Als Verpackungszellen wurden HEK293T-Zellen gewählt, die entsprechend den üblichen Bedingungen in Kultur gehalten und gesplittet wurden. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen einmalig mit DPBS gewaschen, anschließend trypsinisiert und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend gezählt und in neuem DMEM-Medium aufgenommen. Für jeden zu transfizierenden Vektor wurden insgesamt 3×10^7 Zellen in sechs 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät (entspricht 5×10^6 Zellen/Platte). Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit weiter inkubiert.

4.2.5.2. Calciumphosphat-Transfektion

Die HEK293T-Zellen wurden nach dem Normieren mithilfe von Calciumphosphat transduziert. Durch Mischen der Plasmide mit Calciumchlorid und Phosphat-Puffer entstanden DNA-Calciumphosphatkristalle, die von Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können.

Tabelle 12 zeigt den Ansatz für die Transfektion einer Zellkulturschale. Die DNA-Lösung wurde tropfenweise unter Vortexen zu zweifach konzentriertem *HEPES buffered Saline* (HBS) gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die HEK293T-Zellen erhielten neues DMEM-Nährmedium ohne die antibiotischen Zusätze Penicillin und Streptomycin. Zusätzlich wurde je Kulturschale 1 ml des hergestellten

Transfektionsansatzes hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend für sechs Stunden im Inkubator bei 37 °C belassen, bevor das Kulturmedium erneut ausgetauscht wurde. In diesem Schritt wurde wieder DMEM-Nährmedium inklusive der beiden antibiotischen Zusätze verwendet.

Für weitere Informationen zu den Plasmiden siehe Kapitel 3.7. Plasmide.

Komponente	Plasmid	Menge
Transfer-Vektor [µg]	pMY-IRES-GFP/ pMY-FLT3-ITD/ pMY-FLT3-ITD F691L/ pMY-FLT3-ITD D835V	5
GagPol-Plasmid [µg]	pcDNA3.MLVgp	7,5
Env-Plasmid [µg]	VSV-G	2
ddH ₂ O [µl]		ad 450
CaCl ₂ [µl]		50
2x HBS [µl]		500

Tabelle 12: Ansatz für eine Kulturschale. Es wurde jeweils ein Transfer-Vektor je Transfektionsansatz verwendet

4.2.5.3. Virusernte und Viruskonzentration

36 Stunden nach der Transfektion wurde das Kulturmedium sorgfältig aus den Kulturschalen abgenommen. Alle weiteren nun folgenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Überstände der Schalen, die mit demselben Transfer-Vektor transfiziert wurden, konnten in einem 50 ml Falcon *gepoolt* werden. Der *gepoolte* Überstand wurde einmal bei 250 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend durch einen Filter der Größe 0,45 µm gegeben. Von jedem der vier Überstände wurden genau 32 ml in je ein Beckmann-Ultrazentrifugations-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden daraufhin für zwei Stunden im Vakuum bei 50.000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde der gesamte Überstand vorsichtig abgenommen und das verbliebene Pellet in 200 µl des gewünschten Kulturmediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach in kleineren Mengen bei -80 °C eingefroren.

Die verbliebenen Verpackungszellen konnten nach dem Abnehmen des virushaltigen Mediums trypsinisiert und durchflusszytometrisch analysiert werden (siehe Kapitel 4.2.7. Durchflusszytometrie). In transfizierten Zellen konnte aufgrund des GFPs eine grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden.

4.2.5.4. Virus-Titration

Um die Zielzellen mit jeweils der gleichen Menge Virus zu transduzieren, wurde zuvor der Virustiter bestimmt. Hierfür wurden probeweise HEK293T-Zellen transduziert und der Anteil an fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 4.2.7. Durchflusszytometrie) gemessen.

Es wurden je 5×10^4 HEK293T-Zellen in 1 ml auf einer 24 Loch-Platte ausgesät. Für jedes der vier verpackten Plasmide wurden jeweils neun Ansätze benötigt, sowie drei weitere, die nicht mit Virus transduziert wurden (Abbildung 8).

Nach 24 Stunden wurden die nicht-transduzierten Ansätze trypsinisiert, *gepoolt* und die Zellzahl bestimmt. Dieser Mittelwert diente als spätere Referenz der Zellzahl zum Zeitpunkt null. Für die anderen Ansätze wurden je 10 μ l des hergestellten Virus in 90 μ l DMEM gelöst (1:10) und eine Verdünnungsreihe bis 1:1.000 angefertigt. Je 10 μ l des verdünnten Virus wurden zu den jeweils drei Ansätzen gegeben.

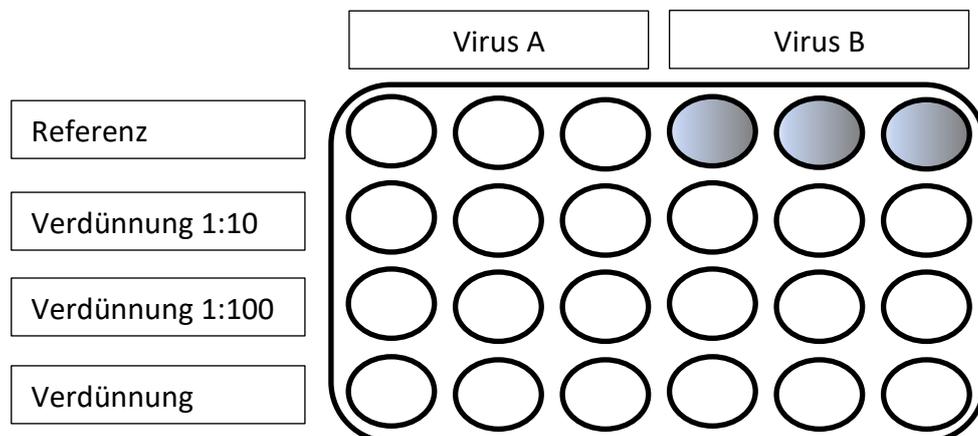


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer 24 Loch-Platte. Die grau markierten Löcher wurden nur mit DPBS befüllt. Alle anderen Löcher wurden mit Zellsuspension befüllt.

Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die transduzierten Zellen durch Trypsinieren von der Platte gelöst. Die Zellen wurden einmal mit DBPS gewaschen und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurden sie für die Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 4.2.7. Durchflusszytometrie) vorbereitet.

In der Durchflusszytometrie wurde der Anteil an grün-fluoreszierenden Zellen gemessen (GFP positive Zellen in %). Unter Berücksichtigung der vorherigen

Verdünnung ließ sich daraus die Anzahl an Viren pro Milliliter berechnen. Dies wird auch als *transducing units per milliliter* (TU/ml) angegeben.

$$TU / ml = \frac{GFP \text{ pos. Zellen in } \%}{100} \times Zellen \ t_0 \times d_{\text{Verdünnungsreihe}} \times d_{\text{Virus in Medium}}$$

Formel: Ermittlung der *transducing units per milliliter* (Tu/ml).

GFP pos. Zellen: in der FACS-Analyse bestimmter Anteil an transfizierten Zellen (ein Anteil von 2-10% entspricht statistisch einer Infektion pro Zelle).

Zellen t_0 : Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion.

$d_{\text{Verdünnungsreihe}}$: Verdünnungsfaktor entsprechend der Verdünnungsreihe bei dem ein GFP positiver Anteil zwischen 2 und 10% detektiert wurde (10, 100 oder 1.000).

$d_{\text{Virus in Medium}}$: Verdünnungsfaktor entsprechend der Verdünnung des Virus (es werden immer 10 μ l Virus(verdünnung) in 1 ml Medium gegeben. Der Faktor betrug in den durchzuführenden Experimenten entsprechend immer 100).

4.2.6. Virus-Transduktion

Anhand der TU/ml war es möglich eine *Multiplicity of Infection* (MOI) zu kalkulieren. Dieser Wert gibt das zahlenmäßige Verhältnis von Viruspartikeln zu Zielzellen an.

Jeweils 1.000 Zielzellen wurden in 100 μ l Kulturmedium in eine 96-Loch-Platte ausgesät. Die ausgebrachten Zellen wurden daraufhin mit drei unterschiedlichen MOIs (MOI 5, 15, 25) transduziert und bei 37°C kultiviert. Alle ein bis zwei Tage mussten die Zellen entsprechend ihres Wachstums in ein größeres Behältnis gegeben und mit neuem Kulturmedium versorgt werden.

4.2.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen anhand ihrer Form, Größe, Oberflächenstruktur oder anderer Eigenschaften. Die Methode des *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) ermöglicht das Sortieren der Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenz. Die Zellen werden hierbei einzeln an einem Laser vorbeibewegt und von diesem erfasst. Bei ungefärbten Zellen entsteht hierdurch Streulicht, das in zwei verschiedene Arten unterteilt werden kann. Über das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* oder *FSC*) lassen sich Rückschlüsse auf die Größe der Zelle ziehen. Seitlich abgeleitetes Seitwärtsstreulicht (*side scatter* oder *SSC*) dient zur Ermittlung der Granularität der Zellen. Anhand dieser beiden Parameter wird das FACS-Gerät mit ungefärbten Zellen auch für die Analyse von gefärbten Zellpopulationen eingestellt.⁸¹

Zellen, die fluoreszierende Proteine wie das green fluorescence protein (*GFP*) exprimieren oder die mithilfe eines fluoreszierenden Antikörpers inkubiert wurden, zeigen bei der Analyse ein weiteres farblesches Fluoreszenzsignal. Zu einem gewissen Grad kommt dieser Effekt auch bei ungefärbten Zellen vor. Dieses Phänomen wird als Autofluoreszenz bezeichnet und muss bei der Auswertung mitbedacht werden.

Zur Analyse, wie zum Beispiel der Erfolgskontrolle der Transfektion am FACS-Gerät, wurden je 2×10^5 Zellen bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert und das Medium verworfen. Das Zellpellet wurde in DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des DPBS konnten die Zellen in 300 μ l FACS-Puffer, bestehend aus DPBS mit 2% (v/v) FCS sowie 2% (v/v) Penicillin und Streptomycin, aufgenommen werden und wurden in ein FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend erfolgte die Analyse mit dem FACS-Gerät BD LSR Fortessa. Hierfür wurden an ungefärbten Zellen die Parameter *FSC* und *SSC* als auch das entsprechende Fluoreszenzsignal eingestellt und anschließend die Zellpopulationen mit GFP-positiven Zellen detektiert.

Mit dem Durchflusszytometer BD FACS Aria II war es zudem möglich, Zellen anhand der fluoreszierenden Eigenschaften aufzuteilen (engl. *sorten*). Hierfür wurden 2×10^6 Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben, 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, das Medium verworfen und das Zellpellet in DPBS gewaschen. Im darauffolgenden Schritt wurden die Zellen erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, das DPBS erneut verworfen, die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und durch eine Filtermembran in ein steriles FACS-Röhrchen gegeben. Bis zum *Sorten* verblieben die Zellen bei 4 °C.

Das FACS-Gerät BD FACS ARIA II unterscheidet fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Zellen. Die fluoreszierenden Zellen wurden in einem mit Zellmedium gefüllten Auffanggefäß gesammelt und die nicht-fluoreszierende Population verworfen. Zu Beginn wurden die Grundeinstellungen anhand von ungefärbten Zellen definiert. Dadurch ließ sich die gemeinsame Population aus transduzierten, *GFP*-positiven und nicht-transduzierten *GFP*-negativen Zellen trennen. Die *GFP*-positiven Zellen wurden nach dem *Sorten* 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einer 6-Loch-Platte unter Standardbedingungen weiter kultiviert.

Mithilfe des BD FACS Aria II ist es zudem möglich sogenannte *single-sorts* durchzuführen. Im Anschluss an das *Sorten* wird jeweils eine einzelne Zelle in jedes Loch einer 96-Loch-Platte gegeben. Hierdurch ist es möglich eine möglichst homogene Population, basierend auf einer einzigen Zelle, heranzuzüchten.

4.2.8. Behandlung der Zellen mit Kinaseinhibitoren

Die verschiedenen FLT3-ITD mutierten Zellen wurden auf ihr Ansprechen auf unterschiedliche Kinaseinhibitoren untersucht. Dafür wurden in drei 96-Loch-Platten je Loch 10^4 Zellen in 50 μ l Kulturmedium (und eventuell benötigter, doppelt-konzentrierter Zusätze) ausgesät. Zu diesem Ansatz wurden jeweils 50 μ l des im Zellmedium gelösten Inhibitors in gewünschter Konzentration hinzugegeben. Die Verdünnungsreihe des Inhibitors wurde in DMSO angefertigt, um (potentielle) toxische Effekte durch unterschiedliche Konzentrationen des DMSO zu verhindern. Als Referenz wurden zusätzlich je vier Kontrollansätze der Zellen mit DMSO pipettiert. Die verwendeten Inhibitoren (Tabelle 13) wurden üblicherweise mit exponentiellen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert. Erst zur genaueren Untersuchung wurden kleinere Abstufungen der Konzentration gewählt. Die Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert.

Substanz	Primäres Ziel	Verwendete Konzentrationen
AC220 (Quizartinib)	FLT3	0,1 nM, 1nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M
Bay 61-3606	SYK	5 nM, 50 nM, 500 nM, 1,25 μ M, 2,5 μ M
Ibrutinib	BTK	1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M
PRT062607	SYK	5 nM, 50 nM, 500 nM, 2,5 μ M, 5 μ M
PP1	SRC	10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M
PP2	SRC	5 nM, 50 nM, 500 nM, 1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M
R406	SYK	2,5 nM, 25 nM, 250 nM, 750 nM, 1,25 μ M, 2,5 μ M

Tabelle 13: Verwendete Kinaseinhibitoren

4.2.9. In-vitro-Assay (XTT)

Die Bestimmung der Zellproliferation bzw. der Viabilität der untersuchten Zellen erfolgte mittels XTT-Assays mit dem XTT CellViability Kit. Die Succinat-Dehydrogenase lebender Zellen wandelt das gelbe, oxidierte 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid-Natriumsalz (kurz XTT) in orange-

farbenes, reduziertes XTT-Formazansalz um. Dabei ist die Menge an gebildetem Formazansalz proportional zur Zahl lebender Zellen.

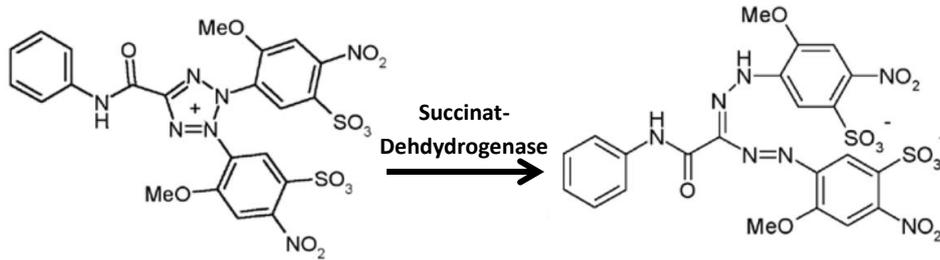


Abbildung 9: Darstellung der chemischen Struktur von XTT-Tetrazol und XTT-Formazan. Die Reaktion wird durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (Komplex II der Atmungskette) katalysiert.

Die hinsichtlich der Proliferation zu untersuchenden Zellen wurden, wie in Kapitel 4.2.8. Behandlung der Zellen mit Kinaseinhibitoren beschrieben, mit dem Inhibitor inkubiert. Unmittelbar nach Mischen der Zellsuspension mit dem Inhibitor wurde einer der drei 96-Lochplatten je 50 µl des XTT-Reagenzes hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei üblichen Bedingungen im Zellinkubator wurde mit Hilfe eines Spektrometers die Absorption der Zellen bei 450 nm Wellenlänge analysiert. Zusätzlich wurde ein Referenzwert bei 650 nm Wellenlänge ermittelt und von der ersten Messung abgezogen.

Für die verwendeten Inhibitoren wurden je Experiment drei Messzeitpunkte mit unterschiedlicher Inkubationszeit des Inhibitors definiert: Tag 0 (4h), Tag 2 (48h) und Tag 3 (72h). Die beiden anderen 96-Lochplatten wurden entsprechend nach 44 bzw. 68 Stunden mit XTT-Reagenz gemischt und nach insgesamt 48 (44+4) bzw. 72 (68+4) Stunden am Spektralphotometer detektiert.

Jede Lochplatte enthielt drei (bei vier untersuchten Populationen) bzw. vier Ansätze (bei drei untersuchten Populationen) je Inhibitorkonzentration. Für jede Inhibitor-Konzentration wurde ein Mittelwert aus den ermittelten Einzelmessungen gebildet. Neben den Inhibitorbehandelten Zellen wurde zur Bestimmung des Leerwertes die Absorption einer Kontrolle bestehend aus 100 µl Medium und 50 µl XTT Reagenz analysiert und der resultierende Mittelwert vom Mittelwert der Proben abgezogen.

4.2.10. *Cytospins*

Die Immunhistochemie bietet die Möglichkeit, Zellstrukturen mittels Antikörpern anzufärben und mit einem konfokalen Mikroskop zu detektieren. Dadurch lässt sich unter anderem die Verteilung von Proteinen in der Zelle darstellen. Der Begriff *Cytospin* beschreibt das Verfahren, durch das die Suspensionszellen auf den Objektträger aufgebracht werden: Durch Rotation einer Zentrifuge werden die Zellen durch die Zentrifugalkraft nach außen in Richtung der Objektträger bewegt.⁸² Für die Immunhistochemie wurde das Image-IT Fixation/Permeabilization Kit der Firma Life Technologies verwendet.

Jeweils 10^5 Zellen wurden in 100 μ l DBPS mit 10% (v/v) FCS aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Cytozentrifuge für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellen auf einen außen liegenden Objektträger gedrückt. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml der Fixationslösung (4% Formaldehyd in DPBS) bedeckt. Nach 15 Minuten wurde die Fixationslösung abgenommen und der Objektträger dreimal für 5 Minuten mit DBPS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml der Permeabilisationslösung (0,5% Triton X-100) überschichtet und für 15 Minuten inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit DPBS à 5 Minuten.

Um ein stärkeres Signal zu erzielen, wurde anschließend für 30 Minuten je ein Tropfen Image-iT FX Signal Enhancer ReadyProbes Reagent auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen erneut drei Mal für 5 min mit DBPS gewaschen.

Es folgte das Blocken für eine Stunde mit der BlockAid Blocking Lösung, wodurch unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert werden sollten. Währenddessen wurde der Primäantikörper in 1 ml der gleichen Blocking Lösung gelöst (die Verdünnung des Antikörpers richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers) und dann auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden daraufhin für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Bei Verwendung mehrerer primärer Antikörper war eine zeitgleiche Verwendung theoretisch zwar denkbar, wurde jedoch nicht durchgeführt. Stattdessen wurde der vorherige Primäantikörper abgenommen, die Zellen erneut drei Mal in DPBS gewaschen und erst dann ein zweiter Primäantikörper in der empfohlenen Verdünnung für 12 Stunden (bei 4°C) auf die Zellen gegeben. Daran anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal für 5 min in DBPS gewaschen.

Anders als beim *Western Blot* werden für die Immunhistochemie fluorochrom-konjugierte sekundäre Antikörper verwendet. Es können daher für eine Auswertung unter dem Mikroskop Antikörper mit unterschiedlichem Absorptionsspektrum und mit Bindungsverhalten gegen verschiedene Spezies kombiniert werden.

Der sekundäre Antikörper wurde nach den Empfehlungen des Herstellers in der Blocking Lösung verdünnt (siehe Kapitel 3.5.2. Immunfluoreszenz) und für eine Stunde unter Lichtausschluss auf die Zellen gegeben. Im nächsten Schritt wurde die Lösung entfernt und die Zellen drei Mal für 5 min in DPBS gewaschen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis alle Sekundärantikörper gegen die verwendeten Primärantikörper appliziert worden waren.

Bei Verwendung eines Primärantikörpers der Spezies A und einem sekundären Antikörper der Spezies B gegen die Spezies A sowie einem weiteren primären Antikörper der Spezies B und einem sekundären Antikörper der Spezies C gegen B gilt es die Einhaltung der richtigen Reihenfolge zu beachten. Der sekundäre Antikörper, welcher ansonsten auch an den anderen sekundären Antikörper binden würde, muss zuerst verwendet werden. Dies soll verhindern, dass es ungewollte Bindungen eines sekundären Antikörpers an andere sekundäre Antikörper gibt.

Zur Färbung der DNA wurde DAPI in einer Konzentration von 300 nM in DPBS für 5 min unter Lichtausschluss auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden danach 5 Minuten in DPBS gewaschen. Um eine Verlängerung des Fluoreszenzsignals zu erhalten, wurde abschließend ein Tropfen ProLong Diamond Antifade Mountant auf die Zellen gegeben. Bis zur Analyse unter dem konfokalen Mikroskop wurden die Zellen bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. Die Analyse sollte frühestens einen Tag nach dem Aufbringen des Tropfens ProLong Diamond Antifade Mountant und innerhalb von sieben Tagen erfolgen, da ansonsten das detektierte Signal stark an Intensität verliert.

4.3. Proteinbiochemische Methoden

4.3.1. Herstellung von Zelllysaten

Die zu lysierenden Zellen wurden gezählt und nachfolgend bei 300 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand aus Zellmedium und untergegangenen Zellen wurde

verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DBPS je 10^6 Zellen resuspendiert, erneut bei obigen Bedingungen zentrifugiert und der Puffer daraufhin abgenommen. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal hintereinander durchgeführt.

Nach dem Waschen wurden die Zellen mit dem entsprechenden Lyse-Puffer inkubiert. Für die Herstellung der Zelllysate wurden verschiedene Lyse-Puffer verwendet.

4.3.1.1. Verwendung von NP40-Lyse-Puffer

Für Zelllysate, die mittels *Western Blotting* analysiert werden, wurde bei den durchgeführten Experimenten NP40 Lyse-Puffer (für die Zusammensetzung des Puffers siehe Kapitel 3.4. Puffer) verwendet. Die Lyse erfolgte stets auf Eis.

Die Zellen wurden mit $30 \mu\text{l}/10^6$ Zellen Lyse-Puffer versetzt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 10 Minuten wurden die Gefäße bei $21.380 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß der gleichen Größe überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.3.1.2. Verwendung von modifiziertem RIPA-Lyse-Puffer

Der modifizierte RIPA-Lyse-Puffer (für die Zusammensetzung des Puffers siehe Kapitel 3.4. Puffer) wurde für die massenspektrometrische Quantifizierung der globalen Phosphoproteom-Analyse verwendet. Die Lyse erfolgte auf Eis.

4.3.1.3. Verwendung von Urea-Lyse-Puffer

Für die spezielle massenspektrometrische Untersuchung von phosphorylierten Tyrosinresten wurde bei den durchgeführten Experimenten Urea-Lyse-Puffer (für die Zusammensetzung des Puffers siehe Kapitel 3.4. Puffer) verwendet.

4.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Proteinkonzentration der hergestellten Zelllysate zu bestimmen, wurde Bichinonsäure (BCA) verwendet. Dieser photometrische bzw. kolorimetrische Test beruht auf einer Biuret-Reaktion. Bei der Biuret-Reaktion bilden Moleküle mit

mindestens zwei Peptidbindungen im alkalischen Milieu Komplexe mit Cu^{2+} -Ionen. Die Cu^{2+} Ionen werden daraufhin zu Cu^+ reduziert, das mit BCA violette Farbkomplexe bildet.^{83, 84}

Um den aus dieser Reaktion resultierenden Farbwechsel quantifizieren zu können, wurde die Absorption mittels Photometer bei 562 nm gemessen. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Farbumschlag.

Zusätzlich wurde eine Standardreihe zum Vergleich erstellt (Tabelle 14). Die Standardreihe bestand aus dem verwendeten Lyse-Puffer sowie steigenden BSA-Konzentrationen. Sie diente der späteren Erstellung eines linearen Graphen im Eichbereich.

	BSA (µg)	BSA (µl)	Lysepuffer (µl)
S0	-	-	2,5
S1	2	1	2,5
S2	4	2	2,5
S3	10	5	2,5
S4	20	10	2,5
S5	30	15	2,5

Tabelle 14: Standardreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Sowohl zu den zu untersuchenden Proben à 2,5 µl als auch zu den sechs Standardansätzen wurde jeweils 1 ml der frisch angesetzten BCA-Lösung, bestehend aus 49 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B, gegeben. Die Proben wurden für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm gemessen. Anhand der Eichkurve ließ sich daraufhin die Proteinkonzentration bestimmen.

4.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ziel der Gelelektrophorese ist es Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufzutrennen. Die Polyacrylamidgele wurden eigenständig hergestellt und bis zur Verwendung (maximal 24 Stunden) bei 4 °C gelagert. Dafür wurden zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1 mm (entspricht der Geldicke) und ein Kamm mit 10 Taschen gewählt. Das Gel bestand aus dem unteren Trenngel mit je nach Versuch angepassten

Konzentrationen von Acrylamid und einem oberen Sammelgel. Je höher der gewählte Anteil an Acrylamid im Trenngel, umso langsamer war die Fortbewegung der Proteine (siehe Tabelle 15). Höhere Acrylamidkonzentrationen wurden bei den Experimenten für die Analyse größerer Proteine (wie z.B. FLT3) verwendet. Die Verwendung von industriell gefertigten Gradientengelen (Gradientengele Mini-PROTEAN TGX) zeigte sich nicht als überlegen, weshalb diese aufgrund der schlechteren Steuerbarkeit nicht genutzt wurden.

Komponenten [ml]	Sammelgel (1 ml)	Trenngel (5 ml)	
	5%	8%	12%
H ₂ O	0,68	2,3	1,6
30% Acrylamid	0,17	1,3	2
1 M Tris pH 6,8 + 10% SDS	0,14	0	0
1,5 M Tris pH 8,8 + 10% SDS	0	1,35	1,35
10% Ammoniumpersulfat	0,01	0,05	0,05
TEMED	0,001	0,003	0,002

Tabelle 15: Herstellung von Gelen zur Gelelektrophorese

Die Zusammensetzung der Gele entsprach der von Sambrook publizierten Methode.⁸⁵ Nach dem Gießen des Trenngels wurde jenes mit Isopropanol überschichtet und für etwa 30 min ruhen gelassen, bevor das Isopropanol wieder abgenommen wurde. Hierdurch wird verhindert, dass es zu einer Blasenbildung zwischen Trenn- und Sammelgel kommt. Erst dann wurde das Sammelgel gegossen, der Kamm blasenfrei eingeführt und das Gel noch einmal für 30 bis 60 min ruhen gelassen, um die Polymerisation abzuschließen.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben (siehe Kapitel 4.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung) wurden durch die Zugabe von reinem Lyse-Puffer angeglichen. Jede Probe enthielt 40 µg Protein. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden drei Teile der zu untersuchenden Proben mit einem Teil des vierfach-konzentrierten Laemmli-Puffers für 5 min auf 95 °C erhitzt. Der SDS- und β-Mercaptoethanol-haltige Puffer bewirkte durch Trennung von Wasserstoffbrücken und Disulfidbindungen eine Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. SDS diente als anionisches Detergenz, das an hydrophobe Stellen der Proteine bindet, wodurch diese einen hydrophileren, negativ geladenen Charakter erhielten und sich dadurch bei

Anlegen einer Spannung in Richtung Anode bewegten. Die Geschwindigkeit korreliert hierbei mit der Größe der Proteine. Je größer ein Protein, desto geringer seine Mobilität.

Die Elektrophorese wurde mit dem Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems der Firma BioRad durchgeführt. In jede Geltasche wurden 40 µl (entspricht 40 µg) der zuvor vorbereiteten Proteine geladen. Zur Detektion der Proteingröße wurden seitlich in die äußersten Taschen 10 µl eines Proteinmarkers (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards bzw. Precision Plus Protein Dual Color Standards) gegeben. Als Laufpuffer diente eine Lösung aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS pH 8,3 (Firma BioRad). Diese bedeckte die Kammer soweit, dass das gesamte vertikale Gel bedeckt war. Das Sammeln der Probe erfolgte bei 80 V für 15 min. Bei Erreichen der Lauffront des Trenngels wurde das Gel bei 140 V für 60 bis 90 min, je nach verwendeter Acrylamidkonzentration, aufgetrennt. Dieser Vorgang erfolgte unter externer Kühlung der Kammer mittels eines Kühlpacks.

4.3.4. *Western Blot*

An das Auftrennen der Polyacrylamid-Gele schließt sich das *Western Blotting* an. Ziel ist es die im Gel getrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen und in einem zweiten Schritt zu qualifizieren und quantifizieren. Dies geschieht durch die Bindung von Primärantikörpern an die zu untersuchenden Proteine. Daraufhin kann mittels an Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern die Bindung des Primärantikörpers an das Protein sichtbar gemacht werden.

Das Polyacrylamid-Gel wurde bei den durchgeführten Versuchen entsprechend der *Wet-Blot*-Methode im Sandwich-Prinzip in eine Kammer mit einer Nitrozellulosemembran gegeben. Durch das Anlegen einer Spannung wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert, ohne die Aufteilung der Proteine zu beeinflussen. Nach außen hin wurden Filterpapiere und Schwämmchen zur Stabilisierung angebracht. Das Gel lag dabei der Kathode und die Nitrozellulosemembran der Anode zugewandt. Der Transfer der Proteine erfolgte aufgrund der negativen Ladung durch das SDS ausschließlich in Richtung der positiven Elektrode. Als Transferpuffer diente 25 mM Tris, 192 mM Glycin pH 8,3 (Firma BioRad) und 20% (v/v) Methanol.

Für das *Blotten* im Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell erfolgte der Aufbau dieses „Sandwichs“ aus Richtung der Kathode. Auf ein Schwämmchen folgten zwei in den Laufpuffer getränkte Filterpapiere. Darauf wurde sorgfältig das Gel gelegt, ohne dass dieses zerreißt. Auf das Gel wurde die zuvor im Puffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt. Die beiden weiteren, in Puffer getränkten Filterpapiere, wurden nacheinander aufgelegt und eventuelle Luftblasen durch orthogonales Auswalzen entfernt. Abschließend wurde ein weiteres Schwämmchen auf den Stapel gelegt (Abbildung 10). Da das Gerät die Möglichkeit bot, zwei Gele gleichzeitig zu *blotten*, wurde eine potentiell leere Kammer ebenfalls mit Filterpapieren und Schwämmen gefüllt.⁸⁶

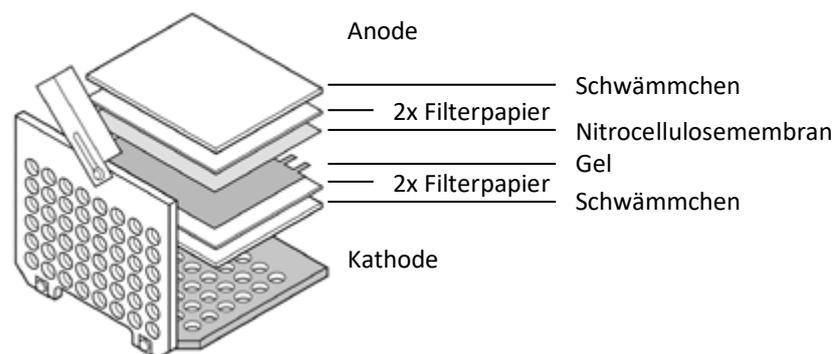


Abbildung 10: Darstellung der Schichten der Elektrophorese Kammer beim Sandwich-Prinzip. Abbildung verändert anhand des Benutzerhandbuchs der Firma BioRad.⁸⁶

Für das *Blotten* von großen Proteinen (>100 kDa) zeigte sich, dass es von Vorteil ist, den *Blot* über 12h bei 25 V durchzuführen. Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass längere *Blot*-Zeiten einen vollständigeren Transfer gewährleisteten. Hierfür wurde die Apparatur bei 7°C gekühlt und in die Kammer neben einem Kühlpack zusätzlich ein Rührfisch eingelegt. Der *Blot* wurde auf einen Magnetrührer gestellt, um eine gleichmäßige Verteilung der Ionen und der entstehenden Wärme zu erzielen.

Vor der weiteren Verwendung der Blotmembran wurde eine Ponceau-Färbung zur Qualitätskontrolle durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.5. Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen). Durch wiederholtes Waschen in TBS mit 0,1% (v/v) Tween-20 (TBS-T) konnte der Farbstoff im Nachhinein wieder entfernt werden.

Anschließend wurde die Membran geblockt. Hierfür wurde die Membran für eine Stunde in 5% Milchpulver in TBS-T gegeben. Für die spätere Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde stattdessen 5% BSA verwendet, da dies Störsignale minimiert. Das Blocken diente der Abdeckung der Membranoberfläche und somit der Verhinderung von unspezifischen Bindungen der später verwendeten Antikörper.

Der Primäantikörper wurde über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplatte im Verhältnis 1:1.000 (v/v) in 5% BSA in TBS-T auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde die Lösung abgenommen und überschüssige Antikörpermoleküle durch wiederholtes Waschen in TBS-T entfernt. Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundäantikörper inkubiert, der sich gegen die Spezies des Primäantikörpers richtet. In den Experimenten handelte es sich hierbei um *horseradish peroxidase* (HRPO)-gekoppelte Ziegen-Antikörper gegen die Immunglobuline der Spezies Maus bzw. Hase, die im Verhältnis 1:10.000 eingesetzt wurden. Das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase* [HRPO]) bildete Peroxide, die mit dem Odyssey Fc Imaging System registriert und bildlich dokumentiert werden konnten. Vor der Analyse mit dem Fluoreszenzdetektor wurde jedoch der Sekundäantikörper durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T von der Membran entfernt. Zur Verstärkung der Detektion der Chemolumineszenz und zur Verbesserung der Empfindlichkeit wurde das SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate verwendet.

Durch Deaktivierung der Sekundäantikörper mit 0,1% Natriumazid konnten Nitrozellulosemembranen mit weiteren Primäantikörpern erneut analysiert werden, da die Meerrettichperoxidase durch das Natriumazid irreversibel gehemmt wurde.

4.3.5. Ponceau-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Mithilfe der sauren Ponceau-Lösung können Proteine reversibel gefärbt werden. Dies ermöglichte eine gute Qualitätskontrolle des Proteintransfers aus dem Gel auf die Membran. Die verwendete Ponceau-Lösung bestand aus 0,5% (w/v) Ponceau S und 1% Essigsäure. Sie wurde für fünf Minuten auf die Membran gegeben. Anschließend musste die Membran vorsichtig mit destilliertem Wasser gewaschen werden bis die

Proteinbanden gut sichtbar waren. Mittels TBS-T konnte die rote Färbung im Nachhinein wieder ausgewaschen werden.

4.3.6. Strippen von Nitrozellulosemembranen

Zum Entfernen von Antikörpern von der Membran wurde diese nacheinander bei Raumtemperatur für jeweils 5-15 min in *Stripping*-Lösung I (200 mM Glycin, 500 mM NaCl, pH 2,8) und II (200 mM Glycin, 500 mM NaCl, pH 2,2) auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach dem Strippen wurde die *Stripping*-Lösung abgenommen und die Membran mehrmals mit TBS-T gewaschen.

Im Anschluss konnte ein neuer primärer Antikörper hinzugegeben werden. Die erneute Signaldetektion erfolgte nach oben genannten Schritten. Als letzter primärer Antikörper wurde jeweils β -Aktin verwendet, da dieses in allen Zellen gleich ausgeprägt ist und so als Ladungskontrolle diente.

4.4. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit der quantitativen Darstellung des gesamten Proteoms einer Zelle. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde die Methode dazu genutzt, um phosphorylierte Aminosäurereste (Serin, Threonin, Tyrosin) zu detektieren. Hieraus konnten Rückschlüsse auf den Aktivierungsstatus von Signalwegen gezogen werden. Die Analyse und Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen.⁷⁴

4.4.1. SILAC-Markierung

Die Methode der *stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (kurz SILAC) ermöglicht quantitative Unterscheidungen von Proteinen. Hierzu macht man sich zu Nutze, dass es verschiedene schwere, stabile Isotope von Wasserstoff, Kohlenstoff und Stickstoff gibt. Durch den Austausch von normal-schwerem Kohlenstoff, Wasserstoff oder Stickstoff in bestimmten Aminosäuren ergibt sich eine größere Massenzahl woraus ein erhöhtes Molekulargewicht resultiert.⁸⁷

Das am häufigsten natürlich vorkommende Isotop von Kohlenstoff ist ^{12}C mit jeweils sechs Protonen und Neutronen im Zellkern, das von Wasserstoff ^1H mit nur einem Proton im Zellkern und das von Stickstoff ^{14}N mit jeweils sieben Protonen und Neutronen im Zellkern.

Neben dem am häufigsten-vorkommenden Kohlenstoff-Isotop existiert ein weiteres stabiles Isotop: ^{13}C . Dieses besitzt ein Neutron mehr und dadurch eine um ein Dalton schwerere atomare Masse. Durch den Austausch aller Kohlenstoffatome (insgesamt sechs) in Arginin wird dieses im Vergleich zu Arginin mit ^{12}C um 6 Da schwerer („Arginin +6“). Da auch in Lysin sechs Kohlenstoffatome vorliegen und die Aminosäure somit ebenfalls 6 Da schwerer wäre, könnte der Gewichtsunterschied massenspektrometrisch nicht auf eine Aminosäure zurückgeführt werden. Stattdessen wird für Lysin das Molekulargewicht um 4 Da erhöht, indem vier Wasserstoffatome durch den ebenfalls stabilen, schweren Wasserstoff (^2H) ausgetauscht werden („Lysin +4“).⁸⁸

Durch Kombination des Austausches von mehreren Atomen lassen sich noch schwere Aminosäuren für die SILAC-Markierung einsetzen. Wird bei Arginin neben ^{13}C auch ^{15}N (Stickstoff mit sechs Protonen und sieben Neutronen) eingesetzt so steigt das Molekulargewicht insgesamt um 10 Da („Arginin +10“). Für die Aminosäure Lysin ergibt sich so ein um 8 Da höheres Molekulargewicht („Lysin +8“): Austausch von sechs Kohlenstoffatomen (^{13}C statt ^{12}C) und zwei Stickstoffatomen (^{15}N statt ^{14}N).⁸⁸

Essentielle Aminosäuren können von der Zelle nicht selbst synthetisiert werden, sondern müssen aus dem Zellmedium aufgenommen werden. Im industriellen SILAC-Medium kommen deshalb die beiden essentiellen Aminosäuren Arginin und Lysin nicht vor. Stattdessen wurden verschiedene Medien hergestellt. Ein Medium wurde mit den am häufigsten vorkommenden Isotopen von Arginin und Lysin hergestellt („leichtes“ Medium). Einem weiteren Medium wurden die Zusätze „Arginin +6“ und „Lysin +4“ zugegeben. Dieses Medium wurde fortan als „mittelschwer“ bezeichnet. Das „schwere“ Medium wurde mit „Arginin +10“ und „Lysin +8“ versetzt.

Allen SILAC-Medien mit stabilen Isotopen wurde zusätzlich die Aminosäure L-Prolin in einer Konzentration von >200 mg/l zugesetzt, um eine Konversion von Arginin in Prolin zu verhindern.⁸⁹

Um einen vollständigen Einbau der markierten Aminosäuren zu gewährleisten, wurden nur Zellen verwendet, die mindestens die letzten fünf Verdopplungszyklen in einem Medium zur SILAC-Markierung inkubiert wurden.⁸⁷

Die Proben wurden für die massenspektrometrischen Analysen mit Trypsin verdaut. Trypsin hat die Eigenschaft, dass es Aminosäureketten jeweils C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet, so dass gewährleistet war, dass sich in jedem Fragment eine markierte Aminosäure befindet. Bei einer Mischung der Proben zu gleichen Teilen konnten daraufhin die Massenpeaks in ein Verhältnis gesetzt werden, wodurch eine relative Quantifizierung möglich wurde.^{88, 90}

4.4.1.1. Analyse der globalen Protein-Phosphorylierung

Die mittels SILAC markierten Zellen wurden zweimal mit 4°C kaltem DPBS gewaschen und der Überstand verworfen. Den Zellen wurde 50 µl/10⁷ Zellen modifizierter RIPA-Lyse-Puffer zugegeben und die Zellen darin 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen drei Mal 15 Sekunden mit 15 W (bei 40% Intensität) sonifiziert. Zwischen zwei Zyklen wurde eine Ruhephase von 60 Sekunden eingehalten. Daraufhin wurde das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 21.380 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß der gleichen Größe überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt und gleiche Mengen von Proteinen miteinander gemischt.

4.4.1.2. Tyrosin-Phosphorylierung

Für die spezielle massenspektrometrische Untersuchung von phosphorylierten Tyrosinresten wurde bei den durchgeführten Experimenten 9M Urea-Lyse-Puffer verwendet. Je 10⁸ Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit kaltem DPBS mit 10 ml des Urea-Lyse-Puffers für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die

Zellen drei Mal 15 Sekunden mit 15 W (40% Intensität) sonifiziert. Zwischen zwei Zyklen wurden die Proben 60 Sekunden ruhen gelassen. Daraufhin wurde das Lysat in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und bei 21.380 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß der gleichen Größe überführt. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben. Danach wurden die Proteinlösungen zu gleichen Teilen miteinander gemischt.

4.4.1.3. Weitere Aufbereitung, Analyse und Auswertung

Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte in Kooperation mit dem Max Planck Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Nähere Informationen bezüglich der weiteren Aufbereitung der Proben finden sich in Publikationen der AG Oellerich, z.B. Oellerich et al. (2013)⁹¹ oder Walter et al. (2017).⁹² Die Analyse und Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Yanlong Ji (Mitarbeiter der AG Oellerich) durchgeführt.⁷⁴ Die Proben wurden hierfür mit einem Q Exactive HF Massenspektrometer analysiert. Die Auswertung der Rohdaten wurde mit MaxQuant (Version 1.5.5.1) durchgeführt und die *Uniprot mouse*-Datenbank als Sequenzdatenbank verwendet. Unterschiede in der Phosphorylierung von Proteinen mit einem z-Wert von < -2 oder > 2 ($p < 0,05$) wurden als signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1. Unabhängigkeit von Interleukin-3 durch Einbringen von FLT3-ITD

Alle Versuche wurden mit Zellen der Zelllinien Ba/F3 oder 32D durchgeführt. Diese Interleukin-3-abhängigen Zellen, die ursprünglich aus dem Knochenmark von Mäusen stammen, sind in der Wissenschaft anerkannte Modelle für Untersuchungen von FLT3.^{52, 62} In die beiden Zelllinien BA/F3 und 32D wurden die Vektoren pMy-IRES-GFP, pMy-FLT3-ITD, pMy-FLT3-ITD F691L bzw. pMy-FLT3-ITD D835V mittels retroviraler Transduktion eingebracht. Die Transduktion erfolgte mit verschiedenen hohen *multiplicities of infection* (MOIs), da eine optimale MOI zum Erzielen eines vergleichbaren Expressionslevels von FLT3 in den verschiedenen Populationen nicht bekannt war.

Die Zellen, die den Vektor pMy-IRES-GFP exprimieren, werden im weiteren Verlauf verkürzt pMy⁺ genannt. Entsprechendes gilt für Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺), pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) und pMy-FLT3-ITD D835V (D835V⁺).

5.1.1 Herstellen von pMy⁺ FLT3-ITD⁺, F691L⁺ und D835V⁺

Die eingebrachten Vektoren enthalten neben dem mutierten FLT3-Gen zusätzlich das *green fluorescent protein* (GFP), welches bei optischer Anregung fluoresziert. Durch Analyse der Fluoreszenz mittels FACS ist eine Unterscheidung von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen möglich. Abbildung 11 zeigt die Zellen am Tag der Transduktion. Die Population P4 stellt die jeweils erfolgreich transduzierte Fraktion dar.

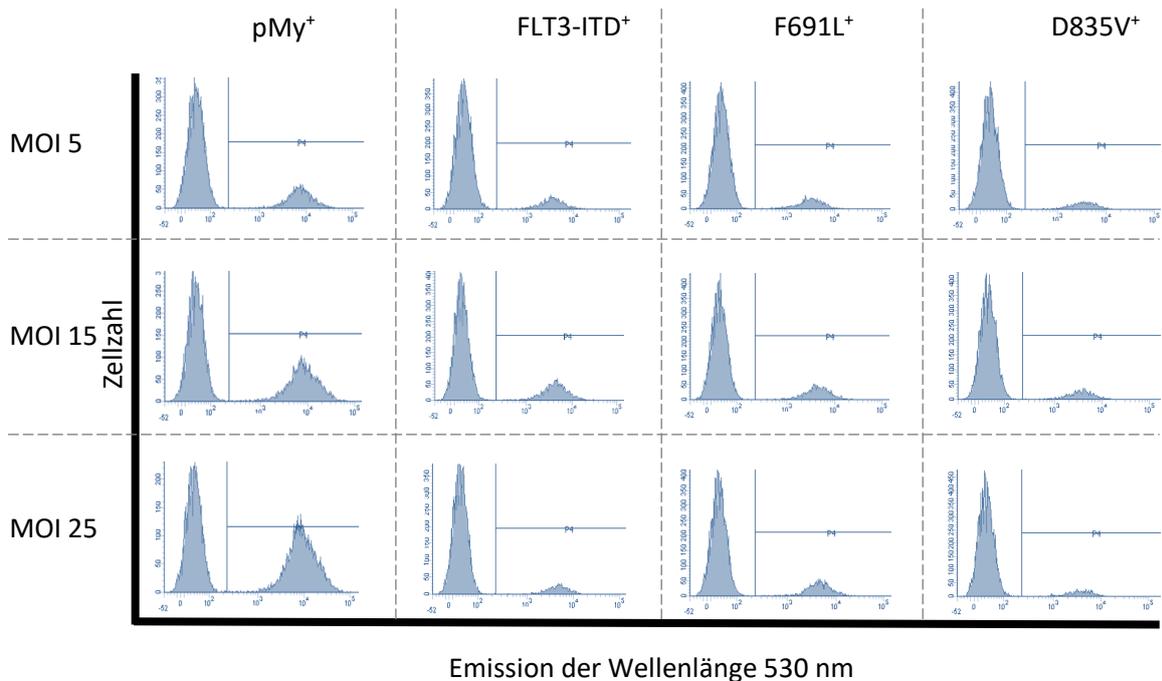


Abbildung 11: FACS-Kontrolle der transduzierten Ba/F3 Zellen. Die Zellen werden anhand ihrer Emission von 530 nm beurteilt (grünes Licht). Die Population P4 zeigt die erfolgreich transduzierten Zellen an. Diese exprimieren GFP. pMy: Vektor pMy-IRES-GFP, FLT3-ITD: Vektor pMy-FLT3-ITD, F691L: Vektor pMy-FLT3-ITD-F691L, D835V: Vektor pMy-FLT3-ITD D835V.

5.1.2. Nachweis der Interleukin-3-Unabhängigkeit der transduzierten Ba/F3-Zellen

Durch das Einbringen von FLT3-ITD in die Zellen mithilfe der Vektoren pMy-FLT3-ITD, pMy-FLT3-ITD F691L und pMy-FLT3-ITD D835V werden diese in ihrem Wachstum unabhängig vom Zytokin Interleukin-3.⁹³ Um dies zu belegen, wurden die Zellen ohne Interleukin-3 kultiviert und regelmäßig durchflusszytometrisch analysiert.

Die nachfolgenden Abbildung 12, 13 und 14 sowie die Tabellen 16, 17 und 18 zeigen die Veränderungen des Verhältnisses zwischen transduzierten Zellen (P4) und nicht transduzierten Zellen. Eine Zeile beschreibt jeweils den Verlauf vom Tag der Expression, über Tag 7 bis Tag 11 nach der Transduktion. Auf der horizontalen Achse ist die Emission bei 530 nm aufgetragen, die vertikale Achse bildet die Anzahl der Zellen ab. In den drei Zeilen befindet sich jeweils oben MOI 5, darunter MOI 15 und in der dritten Zeile MOI 25.

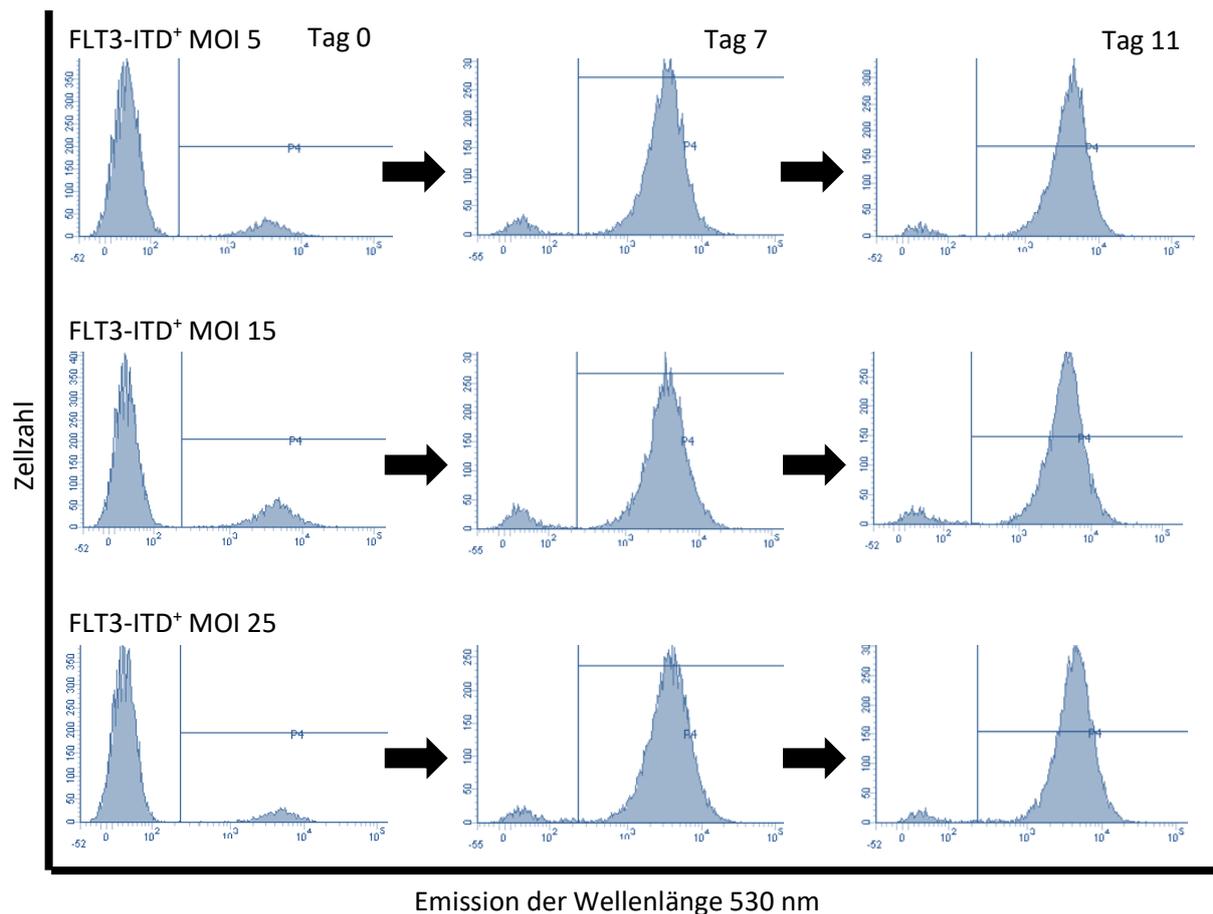


Abbildung 12: FACS-Analyse der mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) transduzierten Ba/F3 Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion (Tag 0), sowie nach einer Woche (Tag 7) und nach elf Tagen (Tag 11). Die Zellen wurden anhand ihrer Emission von 530 nm beurteilt (grünes Licht). Zu sehen ist eine Zunahme der Population P4 (Population der transduzierten Zellen)

Anteil GFP positiver Zellen (P4)	Tag 0	Tag 7	Tag 11
FLT3-ITD ⁺ MOI 5	12,3%	93,1%	95,2%
FLT3-ITD ⁺ MOI 15	21,5%	91,4%	93,2%
FLT3-ITD ⁺ MOI 25	10,3%	94,2%	95,5%

Tabelle 16: Relativer Anteil der GFP-positiven Zellen nach Transduktion des Vektors pMy-FLT3-ITD nach 0, 7 und 11 Tagen. Der Anteil entspricht der Population P4 aus Abbildung 12.

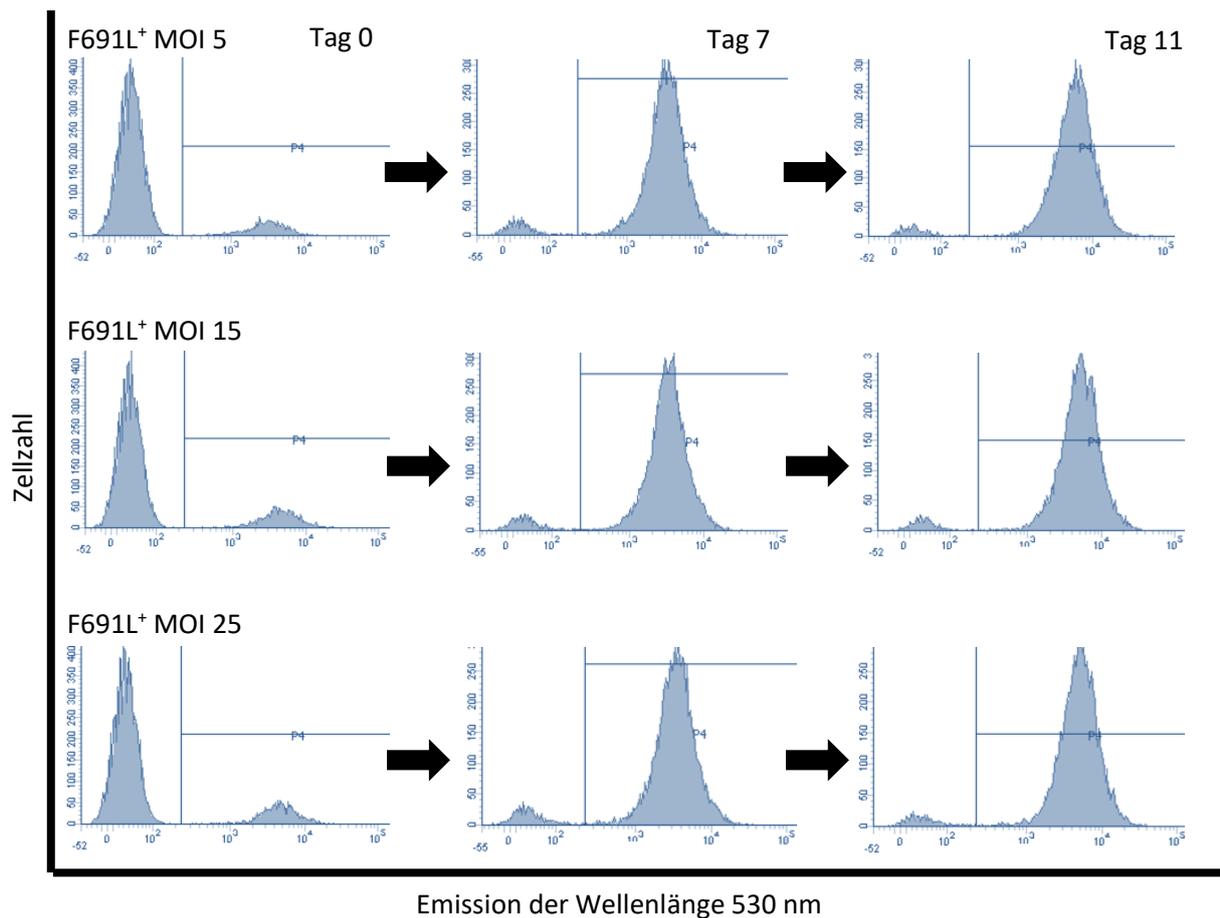


Abbildung 13: FACS-Analyse der mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) transduzierten Ba/F3 Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion (Tag 0), sowie nach einer Woche (Tag 7) und nach elf Tagen (Tag 11). Die Zellen wurden anhand ihrer Emission von 530 nm beurteilt (grünes Licht). Zu sehen ist eine Zunahme der Population P4 (Population der transduzierten Zellen).

Anteil GFP positiver Zellen (P4)	Tag 0	Tag 7	Tag 11
F691L ⁺ MOI 5	12,9%	94,0%	95,9%
F691L ⁺ MOI 15	17,2%	93,4%	95,1%
F691L ⁺ MOI 25	16,8%	92,3%	94,7%

Tabelle 17: Relativer Anteil der GFP positiven Zellen nach Transduktion des Vektors FLT3-ITD F691L nach 0, 7 und 11 Tagen. Der Anteil entspricht der Population P4 aus Abbildung 13.

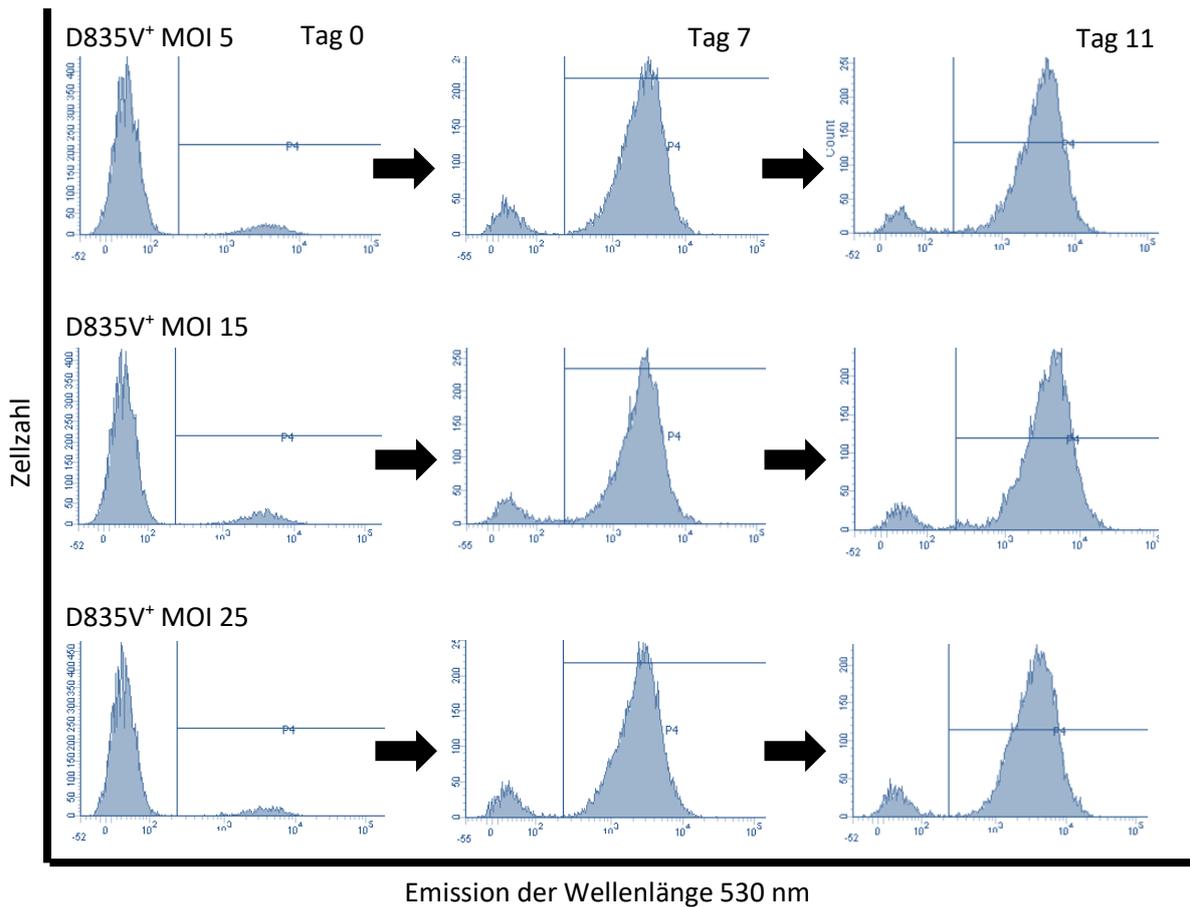


Abbildung 14: FACS-Analyse der mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD D835V (D835V⁺) transduzierten Ba/F3 Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion (Tag 0), sowie nach einer Woche (Tag 7) und nach elf Tagen (Tag 11). Die Zellen wurden anhand ihrer Emission von 530 nm beurteilt (grünes Licht). Zu sehen ist eine Zunahme der Population P4 (Population der transduzierten Zellen).

Anteil GFP positiver Zellen (P4)	Tag 0	Tag 7	Tag 11
D835V ⁺ MOI 5	9,8%	89,7%	91,5%
D835V ⁺ MOI 15	11,6%	89,6%	91,9%
D835V ⁺ MOI 25	9,0%	90,1%	90,5%

Tabelle 18: Relativer Anteil der GFP positiven Zellen nach Transduktion des Vektors FLT3-ITD D835V nach 0, 7 und 11 Tagen. Der Anteil entspricht der Population P4 aus Abbildung 14.

Nach zwei Wochen betrug der Anteil der GFP-exprimierenden Zellen in allen transduzierten Zellpopulationen >99%.

5.1.3. Nachweis der Interleukin-3-Abhängigkeit von pMy⁺

Um auszuschließen, dass die Interleukin-3-Unabhängigkeit der Zellen durch das bloße Vorhandensein des Vektors pMy-IRES-GFP zustande kommt, wurden Zellen mit diesem Vektor in üblichem Zellmedium mit und ohne Interleukin-3 inkubiert. Es zeigte sich im Verlauf von zwei Wochen der Zelltod aller transduzierten Zellen im Interleukin-3-freien Medium (Tabelle 19).

Zellpopulation	RPMI 1640 Medium ohne IL3			RPMI 1640 Medium mit IL3		
	Tag 0	Tag 7	Tag 11	Tag 0	Tag 7	Tag 11
pMy ⁺ MOI 5	67,8%	70,2%	85,5%	67,8%	4,6%	1,6%
pMy ⁺ MOI 15	67,5%	73%	90,1%	67,5%	7,9%	3,4%
pMy ⁺ MOI 25	78,6%	82,1%	92,1%	78,6%	7,5%	1,8%

Tabelle 19: Durchflusszytometrisch bestimmte Viabilität der pMy-IRES-GFP (pMy⁺)-exprimierenden Zellen am Tag der Transduktion, sowie nach 7 und 11 Tagen. Die Zellpopulation wurde nach der Transduktion in zwei Teile getrennt und eine Hälfte weiter im üblichen RPMI 1640 Medium kultiviert. Die andere Hälfte der Zellen wurde in ein Hungermedium ohne Interleukin-3 gegeben. Diese Zellen sterben im Verlauf von elf Tagen nahezu komplett ab.

Die GFP-exprimierenden Zellen im Interleukin-3-haltigen Medium wurden am zweiten Tag nach der Transduktion in je zwei Populationen aufgeteilt. Eine Population wurde zur regelmäßigen Überprüfung der Viabilität verwendet (Tabelle 19) und die andere jeweils am Durchflusszytometer BD FACS Aria II entsprechend ihrer Grünfluoreszenz sortiert. Hierdurch ergab sich in den sortierten Populationen eine Zellpopulation von 97-99% GFP-exprimierenden Zellen, die für die weiteren Versuche verwendet wurde.

5.1.4. Vergleich der FLT3-Expression der transduzierten Zellen mittels *Western-Blot*

Zwei Wochen nach Transduktion wurden Lysate der Zellen erstellt. Von diesen wurde ein *Western Blot* angefertigt, um die Expressionsstärke von FLT3 zu untersuchen (Abbildung 15).

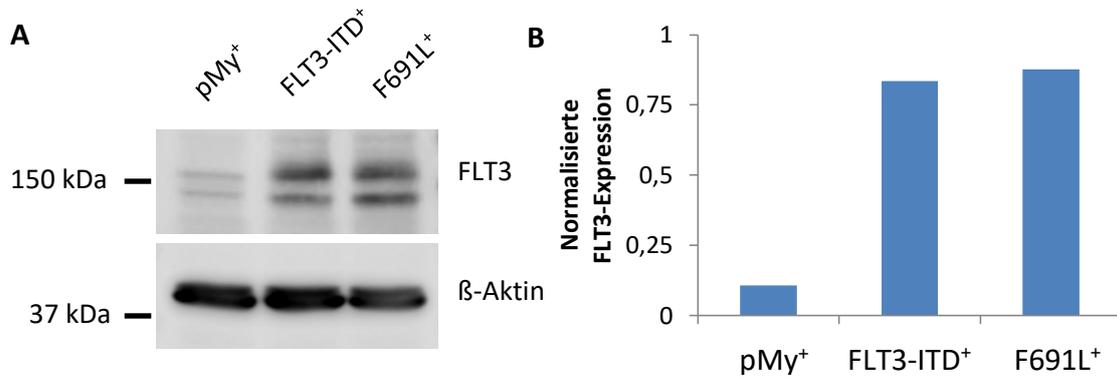


Abbildung 15: FLT3-Expression in Ba/F3-Zellen. A: Western Blot von NP40-Lysaten aus Ba/F3-Zellen der MOI 25. Linke Spalte: Lysate aus den Zellen mit dem transduzierten Vektor pMy-IRES-GFP (pMy⁺), mittlere Spalte: Lysate aus Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) und rechte Spalte: Zelllysate aus Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺). Detektiert wurde das Protein FLT3, sowie zur Ladungskontrolle β-Aktin. B: Auf β-Aktin normalisierte FLT3-Expression der Ba/F3-Zellen. Auf der horizontalen Achse sind die drei Populationen pMy-IHRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) und pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die vertikale Achse zeigt das Verhältnis von detektiertem FLT3 und β-Aktin aus dem *Western Blot* in Abbildung A.

Auch nach mehrmaliger Transduktion ließ sich weder für die Zelllinie Ba/F3 noch für die Zelllinie 32D eine vergleichbare Expression von FLT3 in Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD D835V im Vergleich zu den beiden anderen FLT3-ITD-exprimierenden Vektoren erzielen. Deshalb wurden die nachfolgenden Experimente, bis auf wenige Ausnahmen, bei den Versuchen mit Kinase-Inhibitoren nur mit Zellen der Population des Leervektors (pMy⁺) sowie FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ durchgeführt. Aufgrund der ähnlichen Expression von FLT3, wurde für die Ba/F3-Zellen die MOI 25 verwendet (Abbildung 15). Bei den 32D-Zellen stellte sich das Ergebnis bei einer MOI von 15 am besten dar (nicht abgebildet).

5.1.5. Verhalten der transduzierten Zellen bei Zugabe von AC220 (Quizartinib)

Zur Kontrolle der Expression der Mutanten wurde ein *in-vitro*-XTT-Assay bezüglich des Wachstumsverhaltens bei Zugabe des Inhibitors AC220 (Quizartinib) angefertigt. Die Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert und unmittelbar nach der Zugabe von AC220, nach 48 und 72 Stunden analysiert (Abbildung 16).

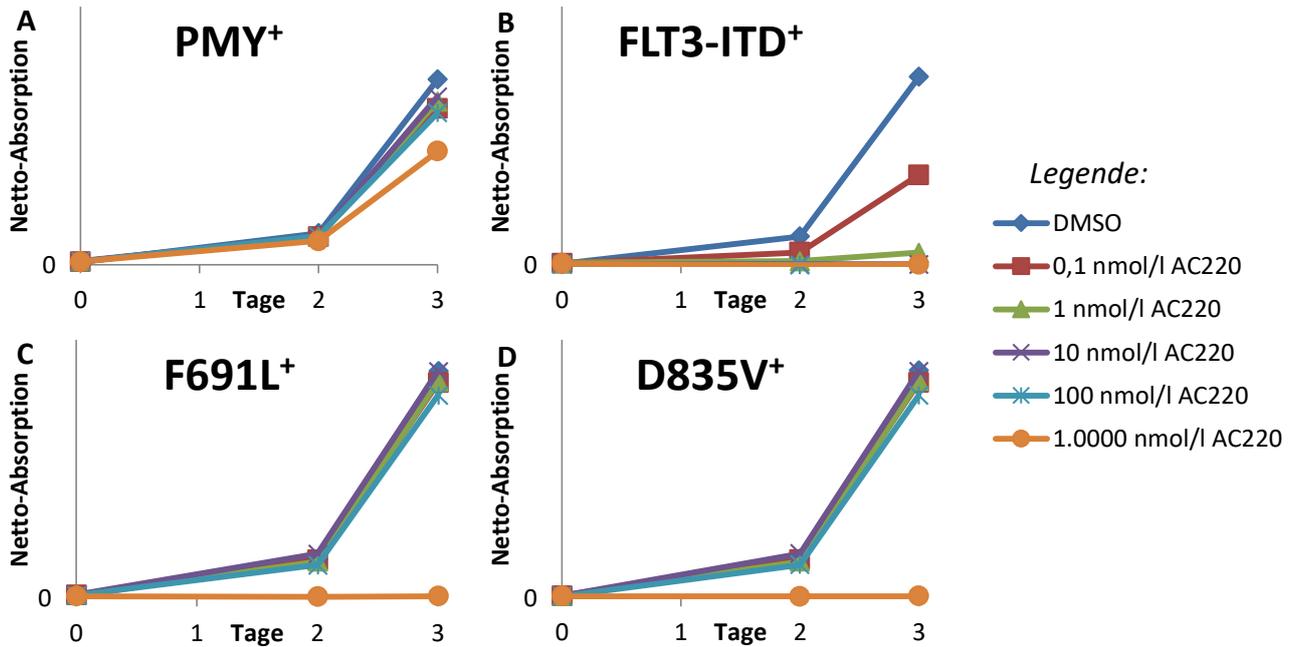


Abbildung 16: Wachstumsverhalten der transduzierten Ba/F3-Zellen bei Inkubation mit AC220 (Quizartinib). Jedes der vier Diagramme zeigt das Wachstumsverhalten einer transduzierten Zellpopulation. Auf der horizontalen Achse sind die Tage aufgetragen; auf der vertikalen Achse ist die Netto Absorption bei 450 nm, d.h. die Differenz zwischen ermittelter Absorption und der Absorption des Leerwertes abgebildet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis des mehrfach wiederholten Experimentes. A: Wachstumsverhalten von pMy-IRES-GFP (pMy⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen. Es zeigt sich eine Zunahme der Absorption bei allen eingesetzten Inhibitorkonzentrationen. B: Wachstumsverhalten von pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen. Es zeigt sich nur die Zunahme der Absorption bei Zellen mit zugegebenem DMSO und einer Konzentration von 0,1 nmol/l AC220. C: Wachstumsverhalten von pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen. Es zeigt sich eine Zunahme der Absorption bei allen untersuchten Konzentrationen von AC220 bis auf die Konzentration von 1.000 nmol/l, bei der die Absorption abnimmt. D: Wachstumsverhalten von pMy-FLT3-ITD D835V (D835V⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen. Bei einer Konzentration von 1.000 nmol/l nimmt die Absorption ab. Bei allen anderen verwendeten Konzentrationen kommt es zu einer Zunahme der Absorption.

Es zeigt sich eine verminderte Absorption in FL3-ITD⁺ ab einer Konzentration von 1 nmol/l AC220 (Abbildung 16B). Die Resistenzmutanten F691L und D835V hingegen entsprechen hinsichtlich ihrer Absorption eher der Absorption von pMy⁺ (Abbildung 16A). Erst eine Konzentration von 1.000 nmol/l bewirkt eine Abnahme der Absorption (Abbildung 16C und D). Diese Zellen reagieren auf AC220 erst bei einer Konzentration, die um den Faktor 10³-10⁴ größer ist als sie bei FLT3-ITD⁺ nötig war. In klinisch relevanten Dosierungen von AC220 zeigt sich demnach in den Populationen der sekundären Punktmutationen (F691L⁺ und D835V⁺) eine Resistenz.

Eine genauere Beurteilung der Zellen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens im XTT-Assay findet sich im Kapitel 5.4.1. (Einfluss des FLT3-Inhibitors AC220 (Quizartinib)).

5.2. Lokalisation von FLT3-ITD in Ba/F3-Zellen

5.2.1. Verhältnis der FLT3-Varianten im Western Blot

In Zellen mit einer ITD-Mutation von FLT3 kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses von partiell-glykosyliertem und vollständig-glykosyliertem FLT3. Das weniger reife, nur partiell-glykosylierte FLT3 von ca. 130-143 kDa wird in ITD-mutierten Zellen stärker exprimiert als nicht ITD-mutiertes, nicht-vollständig glykosyliertes FLT3 in physiologischen Zellen.⁴⁷ Deshalb wurden die angefertigten *Western Blots* auch hinsichtlich der Expression der beiden Varianten untersucht (Abbildung 17).

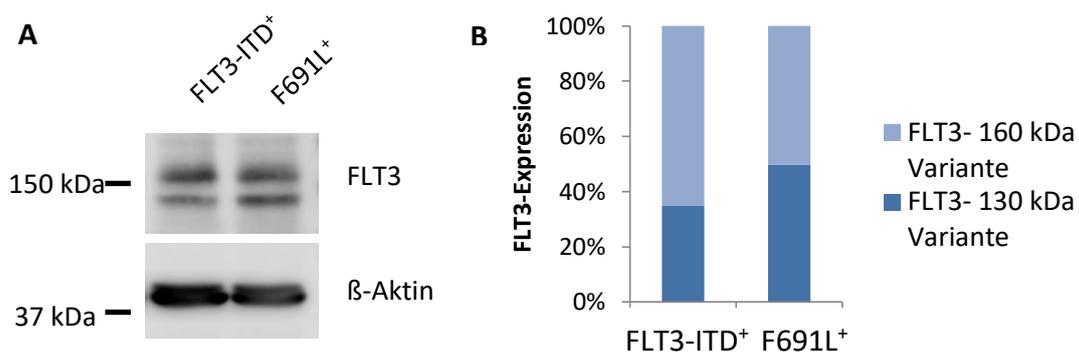


Abbildung 17: Lokalisation von FLT3 in Ba/F3-Zellen. A: *Western Blot* aus NP40-Lysaten von Ba/F3-Zellen wie in Abbildung 15A gezeigt. Linke Spalte: Lysate aus Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺), rechte Spalte: Zelllysate aus Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD-F691L (F691L⁺). Detektiert wurde das Protein FLT3, sowie zur Ladungskontrolle β-Aktin. B: Darstellung der prozentualen Expression der 130 kDa- und 160 kDa-schweren Variante am Gesamt-FLT3. Links: Ba/F3 Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺), rechts Ba/F3-Zellen mit dem Vektor pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺). Die Expression ist jeweils auf β-Aktin normiert.

Das Verhältnis der FLT3-ITD-Variante von 130 kDa (FLT3_{130kDa}) zur Variante von 160 kDa (FLT3_{160kDa}) von FLT3-ITD⁺ beträgt ca. 1:2. Wohingegen das Verhältnis bei F691L⁺ von FLT3_{130kDa} zu FLT3_{160kDa} in etwa ausgewogen bei 1:1 liegt.

5.2.2. Immunhistochemische Darstellung von FLT3 in Ba/F3-Zellen

Aufgrund der Detektion der unterschiedlichen Expression der beiden FLT3-Varianten in den Populationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ im *Western Blot* erfolgte die Anfertigung von *Cytospins* zur Immunfluoreszenzfärbung der Zellen. Die Zellen wurden anschließend mit dem konfokalen Mikroskop LSM 780 analysiert. Abbildung 18 zeigt das Gesamtbild durch Übereinanderlegen aller Kanäle. Die detektierten Signale der einzelnen Kanäle sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt (Abbildungen 19, 20 und 21).

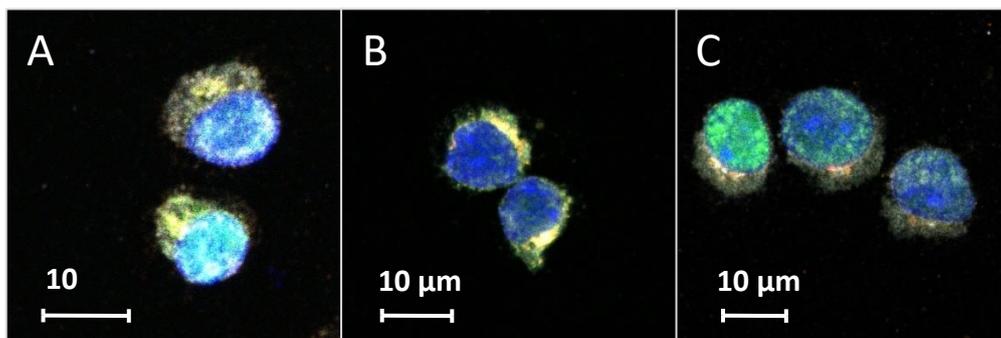


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der Ba/F3-Zellen. Die Gesamtbilder ergeben sich aus den Einzelkanälen blau (DAPI), grün (GFP), rot (PDI) und grau (FLT3). A: pMy-IRES-GFP-exprimierende Zellen. B: pMy-FLT3-ITD-exprimierende Zellen. C: pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierende Zellen.

Die Fluoreszenz von GFP wird bei einer Anregung von 488 nm grün dargestellt. Die Zellen wurden zur Lokalisation des Zellkerns mit DAPI behandelt. Das Signal wurde bei einer Anregung von 405 nm gemessen und in den Bildern blau dargestellt. Weiterhin wurden zwei primäre Antikörper gegen FLT3 und PDI (Proteindisulphidisomerase), ein im ER-lokalisiertes Protein, verwendet, die mittels eines sekundären, Licht-emittierenden Antikörpers sichtbar gemacht wurden. Die Detektion von FLT3 erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm (grau dargestellt) und die Anregung zur Detektion von PDI bei 561 nm (rot dargestellt).

5.2.2.1. Darstellung von pMy⁺

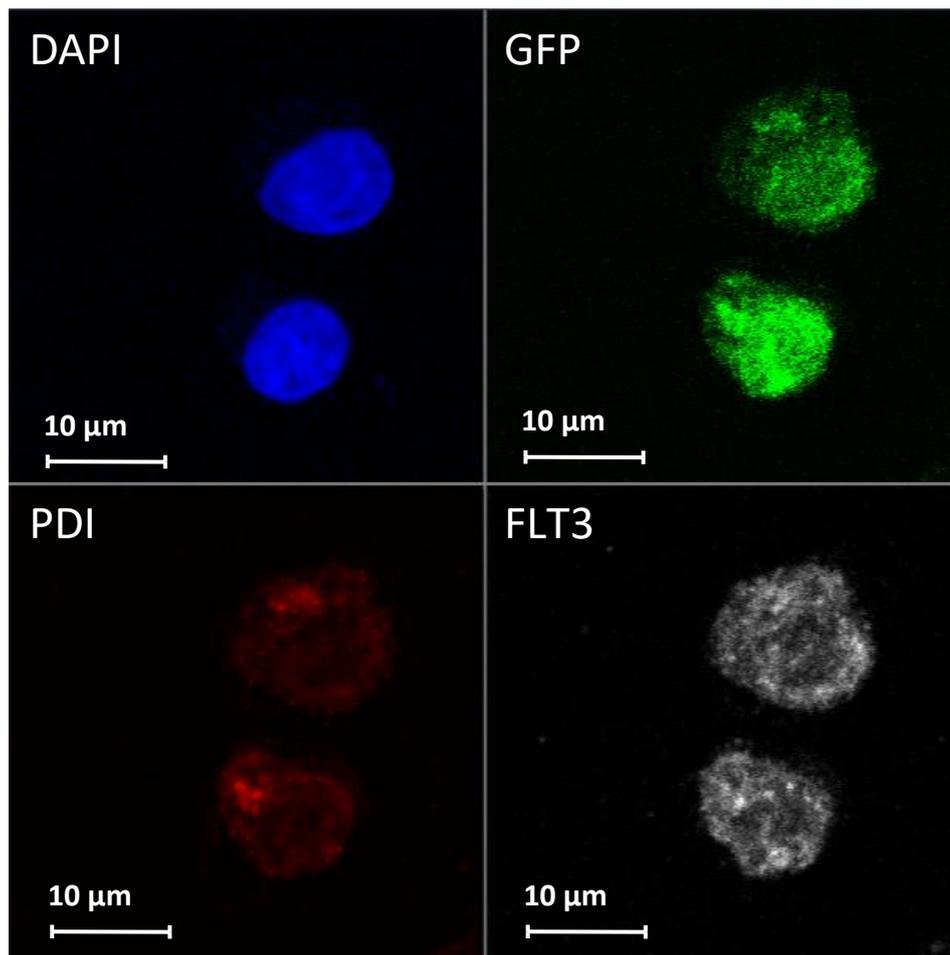


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von zwei pMy-IRES-GFP-exprimierenden Ba/F3 Zellen. Darstellung desselben Bildausschnittes bei unterschiedlicher Anregung. Links oben: Darstellung von DAPI bei Anregung von 405 nm; rechts oben: Darstellung von GFP bei Anregung von 488 nm; links unten: Darstellung von PDI bei Anregung von 561 nm und rechts unten: Darstellung von FLT3 bei Anregung von 633 nm.

5.2.2.2. Darstellung von FLT3-ITD⁺

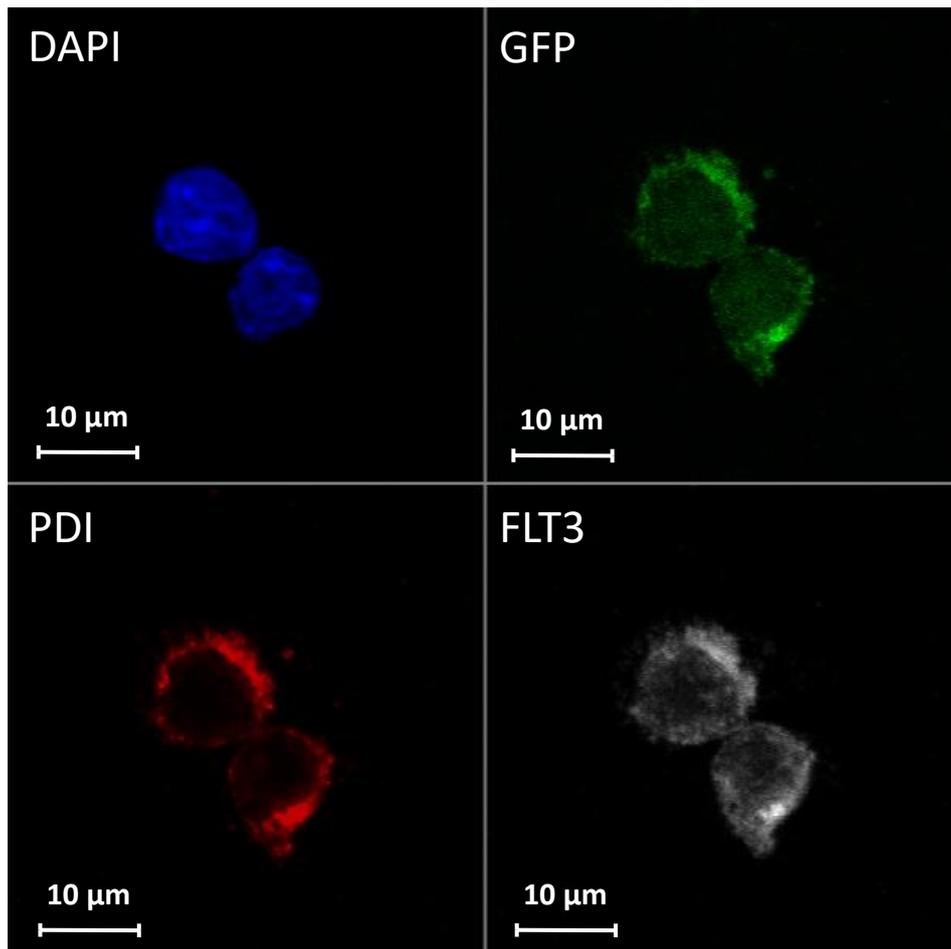


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von zwei pMy-FLT3-ITD-exprimierenden Ba/F3 Zellen. Darstellung desselben Bildausschnittes bei unterschiedlicher Anregung. Links oben: Darstellung von DAPI bei Anregung von 405 nm; rechts oben: Darstellung von GFP bei Anregung von 488 nm; links unten: Darstellung von PDI bei Anregung von 561 nm und rechts unten: Darstellung von FLT3 bei Anregung von 633 nm.

5.2.2.3. Darstellung von F691L⁺

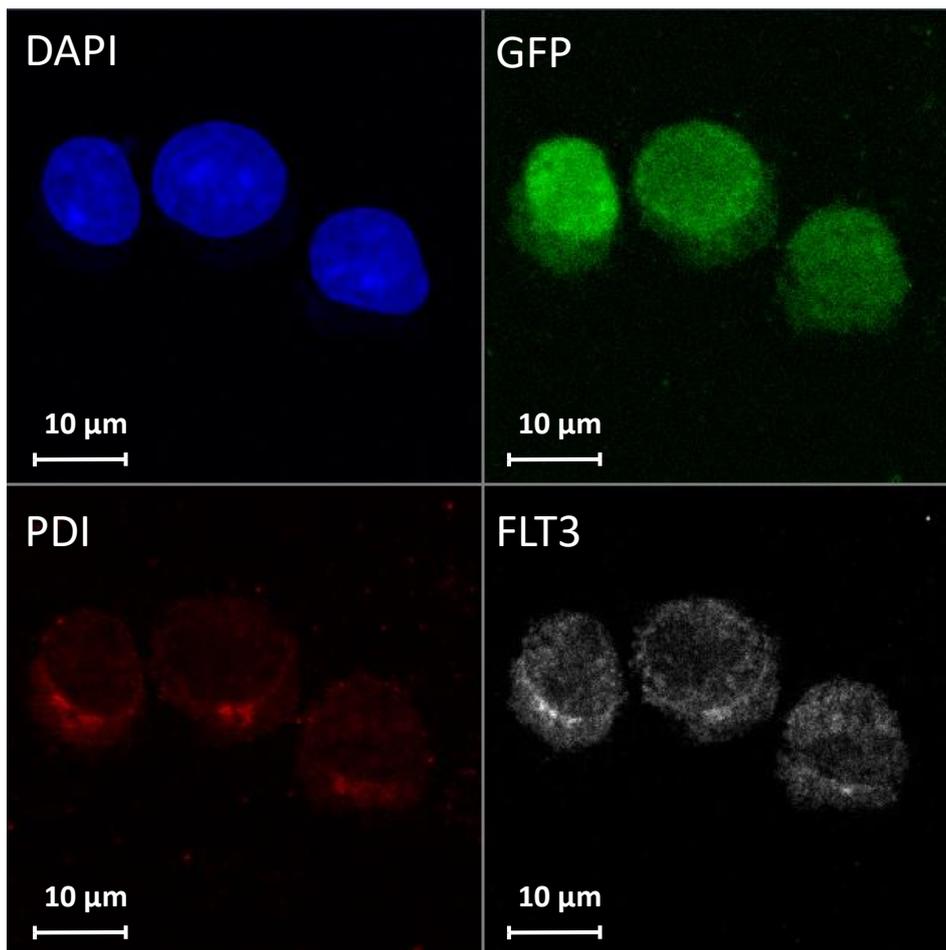


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von drei pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierenden Ba/F3 Zellen. Links oben: Darstellung von DAPI bei Anregung von 405 nm; rechts oben: Darstellung von GFP bei Anregung von 488 nm; links unten: Darstellung von PDI bei Anregung von 561 nm und rechts unten: Darstellung von FLT3 bei Anregung von 633 nm.

5.2.2.4. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von Ba/F3 Zellen

Die Immunfluoreszenz von Suspensionszellen erschwert aufgrund des prominenten Zellkerns eine genaue Beschreibung der subzellulären Lokalisation der Strukturen. Weiterhin ist anzumerken, dass das Emissionsspektrum von DAPI bei Anregung von 488 nm ebenfalls mit detektiert wird und dadurch ein besonders starkes „grünes“ Signal im Bereich des Zellkerns entsteht.

Im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Zell-Populationen zeigt sich in pMy⁺ (Abbildung 19) nur eine dezente Anreicherung von FLT3 an den Stellen, an denen PDI besonders stark nachgewiesen wird und die Verteilung von FLT3 ist mit Ausnahme des Zellkerns annähernd homogen in der gesamten Zelle. Die beiden anderen Populationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ (Abbildung 20 und 21) zeigen im Vergleich zu pMy⁺

eine stärkere Detektion von FLT3 an den Stellen der PDI-Anreicherung. Eine definitive Bewertung der subzellulären Lokalisation von FLT3 in FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ ist mithilfe dieser Zelllinie in diesem Experiment nicht möglich (siehe auch Kapitel 6.2. Lokalisation von FLT3-ITD in Ba/F3-Zellen).

5.3. Analyse ausgewählter Effektoren von FLT3 mittels *Western Blot*

Außer der Detektion von FLT3 wurden in weiteren Experimenten bereits bekannte Downstream-Effektoren von FLT3 bzw. FLT3-ITD mittels *Western Blot* analysiert, um eventuelle Unterschiede in der Signalweiterleitung zwischen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ aufzuzeigen. Als Vergleich wurden zusätzlich pMy⁺ lysiert, um die Proteinbeladung der einzelnen Lysate zu vergleichen. Als Ladekontrolle wurde jeweils β -Aktin verwendet.

FLT3-ITD, das an der Zelloberfläche exprimiert wird, aktiviert die MAP-Kinase Signalleitung.⁵² Zur Überprüfung der Aktivität dieses Signalweges wurden Mitglieder der MAP-Kinase Familie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinase*, auch als p42/p44 bekannt) sowohl in phosphoryliertem Zustand als auch das Gesamt-ERK im *Western Blot* detektiert (Abbildung 22). Die für ERK nachgewiesenen zwei Banden beziehen sich auf die Isoformen 1 (ERK1/p44) und 2 (ERK2/p42).

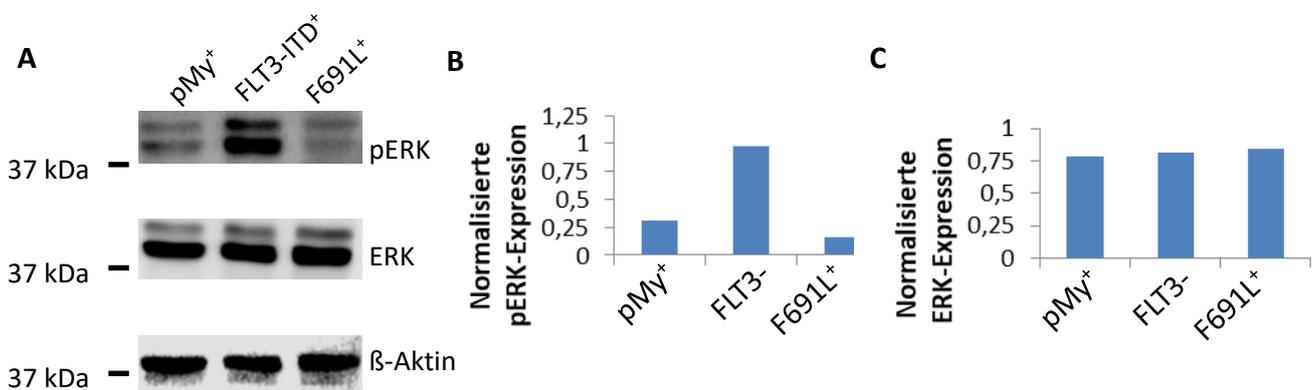


Abbildung 22: Expression von pERK und ERK. A: *Western Blot* aus NP40-Lysaten von Ba/F3-Zellen. Nebeneinander sind Lysate aus Zellen mit dem Vektor pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die Expression von phosphoryliertem ERK (pERK) in FLT3-ITD⁺ unterscheidet sich zu den beiden anderen Populationen. Die Menge des gesamten ERK (ERK) ist vergleichbar. Die Ausprägung von β -Aktin ist in den drei Populationen ebenfalls nahezu identisch. B: Darstellung der Expression von normalisiertem phosphoryliertem ERK. Auf der horizontalen Achse sind die drei Populationen pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die vertikale Achse zeigt das Verhältnis von phosphoryliertem ERK (pERK) zum gesamten ERK. Die Population FLT3-ITD⁺ weist ein deutlich abweichendes, erhöhtes Verhältnis auf. C: Darstellung der Expression von normalisiertem ERK. Auf der horizontalen Achse sind die drei Populationen pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die vertikale Achse zeigt das Verhältnis von gesamtem ERK zu β -Aktin. Die Expression des gesamten ERK ist in allen drei Zellpopulationen annähernd identisch.

Es zeigt sich in FLT3-ITD⁺ eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von ERK (Abbildung 22). Die Gesamtmenge von detektiertem ERK ist jedoch in allen drei Populationen ähnlich ausgeprägt (Abbildung 22).

Intrazelluläres ITD-mutiertes FLT3 aktiviert nicht den Signalweg der MAP-Kinase, sondern abweichend STAT5.⁵² Zur Überprüfung dieses Signalweges wurde einerseits das phosphorylierte STAT5, andererseits das Gesamt-STAT5 im *Western Blot* detektiert (Abbildung 23).

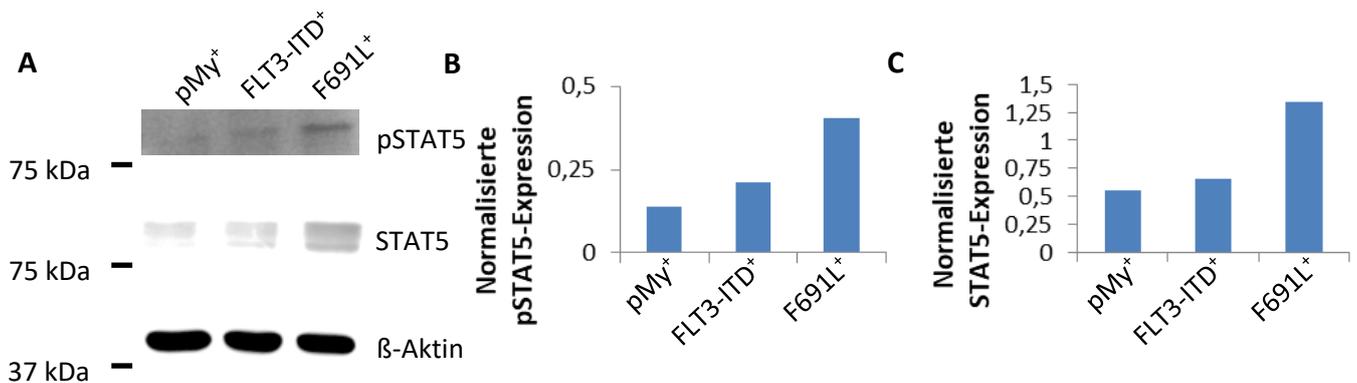


Abbildung 23: Expression von pSTAT5 und STAT5. A: *Western Blot* aus NP40-Lysaten von Ba/F3-Zellen. Nebeneinander sind Lysate aus Zellen mit dem Vektor pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die Expression von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) in F691L ist höher als die von FLT3-ITD und pMy. Die Menge des gesamten STAT5 (STAT5) verhält sich identisch. Die Ausprägung von β-Aktin ist in den drei Populationen nahezu gleich. B: Darstellung der Expression von normalisiertem phosphoryliertem STAT5. Auf der horizontalen Achse sind die drei Populationen pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die vertikale Achse zeigt das Verhältnis von phosphoryliertem STAT5 (pSTAT5) zum gesamten STAT5. Die Population F691L⁺ weist ein deutlich abweichendes, erhöhtes Verhältnis auf. FLT3-ITD⁺ weist ebenfalls gegenüber pMy⁺ einen erhöhten Phosphorylierungsstatus auf. C: Darstellung der Expression von normalisiertem STAT5. Auf der horizontalen Achse sind die drei Populationen pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die vertikale Achse zeigt das Verhältnis von gesamtem STAT5 zu β-Aktin. Die Expression des gesamten STAT5 ist in F691L⁺ am stärksten und in FLT3-ITD⁺ etwas erhöht.

STAT5 ist in F691L⁺ sowohl im phosphorylierten Zustand als auch insgesamt vermehrt nachzuweisen (Abbildung 23).

In einer weiteren *Western Blot*-Analyse wurde SYK detektiert (Abbildung 24). Die Kinase SYK ist durch eine direkte Bindung an FLT3-ITD in der Lage dieses zu aktivieren. Dadurch ist eine Inhibition von SYK in ITD-mutierten Zellen wirkungsvoller als in FLT3-Wildtyp-exprimierenden Zellen.⁹⁴

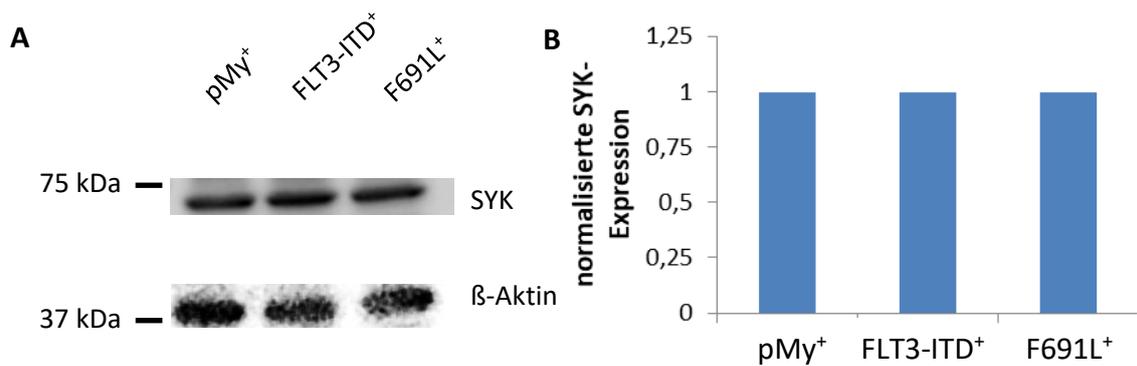


Abbildung 24: Expression von SYK. **A:** *Western Blot* aus NP40-Lysaten von Ba/F3-Zellen. Nebeneinander sind Lysate aus Zellen mit dem Vektor pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die Expression von SYK ist in allen Zellpopulationen gleich. Als Ladungskontrolle wurde die Expression von β -Aktin bestimmt. **B:** Darstellung der Expression von nachgewiesenem SYK. Auf der horizontalen Achse sind die drei Populationen pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) bzw. pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) aufgetragen. Die vertikale Achse zeigt das Verhältnis von SYK zu β -Aktin. Dieses Verhältnis ist in allen drei Populationen auf einem nahezu identischen Niveau.

Auch nach Transduktion von pMy-IRES-GFP, pMy-FLT3-ITD und pMy-FLT3-ITD F691L ist das Expressionslevel von SYK in den drei Populationen von Ba/F3-Zellen gleich hoch. Eine verstärkte Expression durch das Einbringen eines Vektors findet nicht statt (Abbildung 24). Spätere Experimente (siehe Kapitel 5.4.2 Verwendung von SYK-Inhibitoren) mit SYK-Kinase-Inhibitoren sind deshalb nicht durch eine unterschiedliche Expression von SYK zu erklären. Eine unterschiedliche Aktivierung von SYK ist hingegen nicht auszuschließen: Durchgeführte *Western-Blots* zur Detektion von phosphoryliertem SYK ergaben ein unspezifisches Bindungsverhalten des Antikörpers („Phospho-Syk [Tyr525/526] Rabbit“ der Firma Cell Signaling) ohne Detektion einer Bande in Höhe von 72 kDa (deshalb ohne Abbildung).

5.4. Untersuchung des Einflusses ausgewählter Kinasen auf die Proliferation von pMy⁺, FLT3-ITD⁺, F691L⁺ und D835V⁺

Tyrosinkinase-Inhibitoren bieten mittlerweile eine Möglichkeit, gewisse Subtypen der AML zu behandeln. Die im Folgenden durchgeführten Experimente zeigen das Verhalten von verschiedenen Kinase-Inhibitoren auf die verschiedenen transduzierten Populationen. Die Experimente wurden weitestgehend mit Ba/F3-Zellen durchgeführt, vornehmlich mit pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺. Experimente zu AC220 und R406 enthalten zusätzlich als vierte Population die Resistenzmutante D835V⁺. Weiterhin

wurden Experimente an transduzierten 32D-Zellen zu AC220 und R406 durchgeführt. Das Nährmedium von pMy⁺ enthielt zusätzlich Interleukin-3. Das Medium der anderen Populationen enthielt hingegen kein Interleukin-3.

Den Zellen wurde zu Beginn des Experimentes eine definierte Menge des in DMSO-gelösten Inhibitors bzw. der gleichen Menge DMSO (um zytotoxische Effekte von DMSO darzustellen) zugesetzt. Die verwendete Dosierung der Inhibitoren ist in Kapitel 3.12 (Kinase-Inhibitoren) aufgeführt.

In diesem Kapitel werden der Übersichtlichkeit halber nur die Ergebnisse nach 72 Stunden gezeigt. Der Trend nach 48 Stunden zeigt sich in allen Fällen gleich, die Inhibition nach 72 Stunden nimmt jedoch weiter zu.

Statt die Absorption der Zellsuspension darzustellen, wird aufgrund der Proportionalität der Absorption zur vorhandenen Zellzahl das Wachstum der Zellen, die mit gleicher Inhibitorkonzentration behandelt wurden, zwischen Tag null und Tag drei in Relation gesetzt. Weiterhin wird für Zellen, die mit DMSO kultiviert wurden, die normierte Größe von 100% angenommen und die Zellzahl der Zellen mit inkubiertem Inhibitor zu diesen in Relation gesetzt.

Die Darstellung erfolgt jeweils mit horizontaler logarithmischer Achse, da die Inhibitoren titriert wurden und oft in Verdünnungsreihen des Faktors 10 eingesetzt wurden. Da eine Darstellung von DMSO (entspricht der Inhibitorkonzentration 0) auf der logarithmischen Achse nicht möglich ist, wird die horizontale Achse unterbrochen dargestellt. Es wird auch die jeweils ermittelte Standardabweichung dargestellt, die in einigen Fällen jedoch so gering ausfällt, dass sie nicht sichtbar abgebildet ist.

5.4.1. Einfluss des FLT3-Inhibitors AC220 (Quizartinib)

Vor Verwendung der transduzierten Zellen in Experimenten mit anderen Kinase-Inhibitoren, wurden sie mit dem FLT3-Inhibitor AC220 (Quizartinib) inkubiert. AC220 ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor der zweiten Generation und gehört zum Typ II, das heißt, er bindet spezifischer an FLT3 als es Inhibitoren der ersten Generation tun, benötigt aber eine inaktive Form von FLT3 um suffizient zu binden.

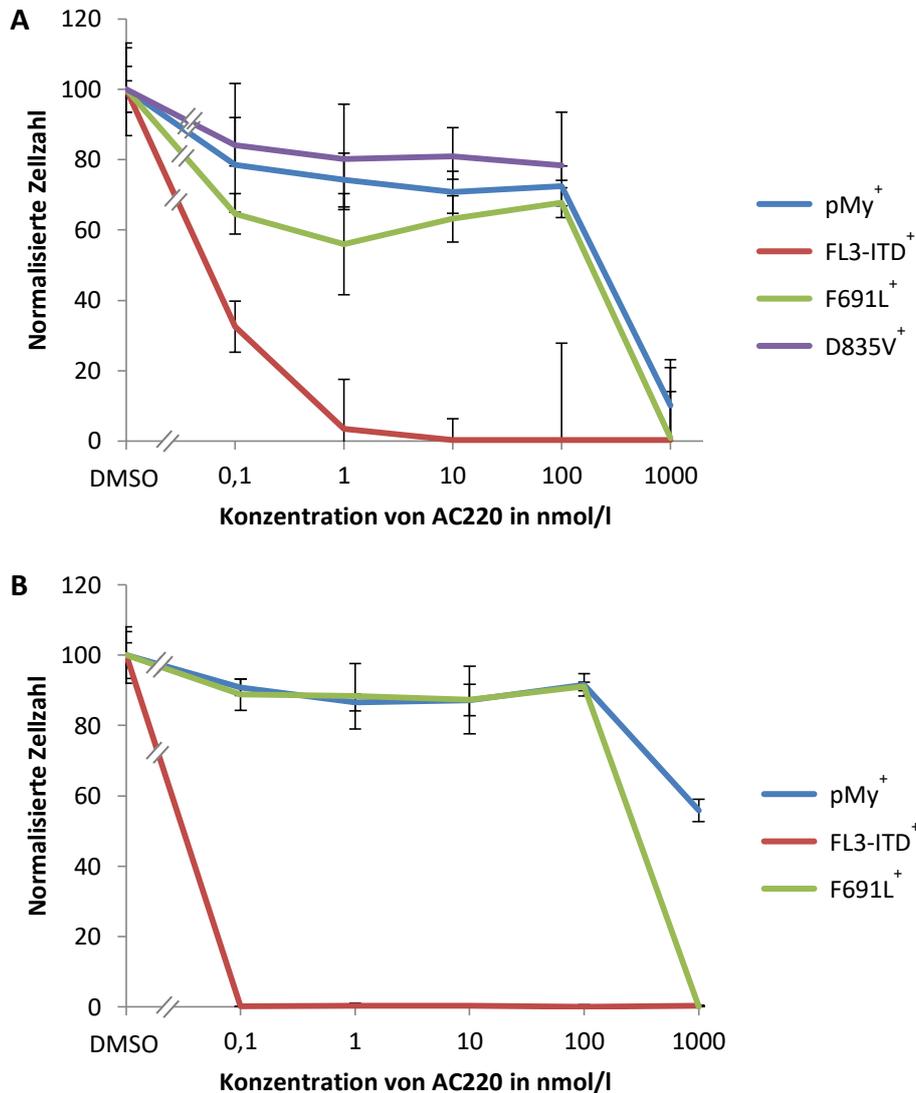


Abbildung 25: Zellwachstum unter Verwendung von AC220. Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors AC220 angegeben. Die vertikale Achse zeigt die normalisierte Zellzahl in Bezug auf das Zellwachstum bei Inkubation mit DMSO. A: Darstellung des Zellwachstums von Ba/F3-Zellen in Abhängigkeit von AC220 mit Angabe der Standardabweichung. pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierende Zellen sind bereits bei 0,1 nmol/l Ac220 stark reduziert. Die Populationen pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) und pMy-FLT3-ITD D835V (D835V⁺) verhalten sich ähnlich wie pMy-IRES-GFP (pMy⁺)-Zellen ohne ITD-Mutation. B: Darstellung des Zellwachstums von 32D-Zellen in Abhängigkeit von AC220 mit Angabe der Standardabweichung. pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierende Zellen sind bereits bei 0,1 nmol/l AC220 vollständig reduziert. Die Population der pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) verhält sich bis 100 nmol/l wie pMy-IRES-GFP (pMy⁺)-Zellen ohne ITD-Mutation. Bei 1000 nmol/l AC220 sind F691L-Zellen stärker reduziert.

Die Zellen der Zelllinien Ba/F3 und 32D verhalten sich bei Zugabe von AC220 ähnlich (Abbildung 25). Eine Konzentration von 0,1 nmol/l AC220 im Medium führt bei FLT3-ITD⁺ bereits zu einer großen Wachstumshemmung. F691L⁺ und D835V⁺ benötigen viel höhere Wirkstoffkonzentrationen, um supprimiert zu werden. Die Wirkstoffkonzentration ist ähnlich wie bei pMy⁺, die mit IL-3 kultiviert wurden. Der ermittelte Wert von D835V⁺ bei einer Konzentration von 1.000 nmol/l AC220 ist aufgrund einer Kontamination während der Inkubation nicht angegeben.

5.4.2. Verwendung von SYK-Inhibitoren

Neben der Verwendung von AC220 wurden weitere Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der verschiedenen Mutationen von FLT3 geprüft. Da sich für den SYK-Inhibitor R406 eine Wirkung auf die Zellpopulationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ zeigte (Abbildung 26), wurden weiterhin die SYK-Inhibitoren Bay 61-3606 und PRT062607 getestet (Abbildung 27).

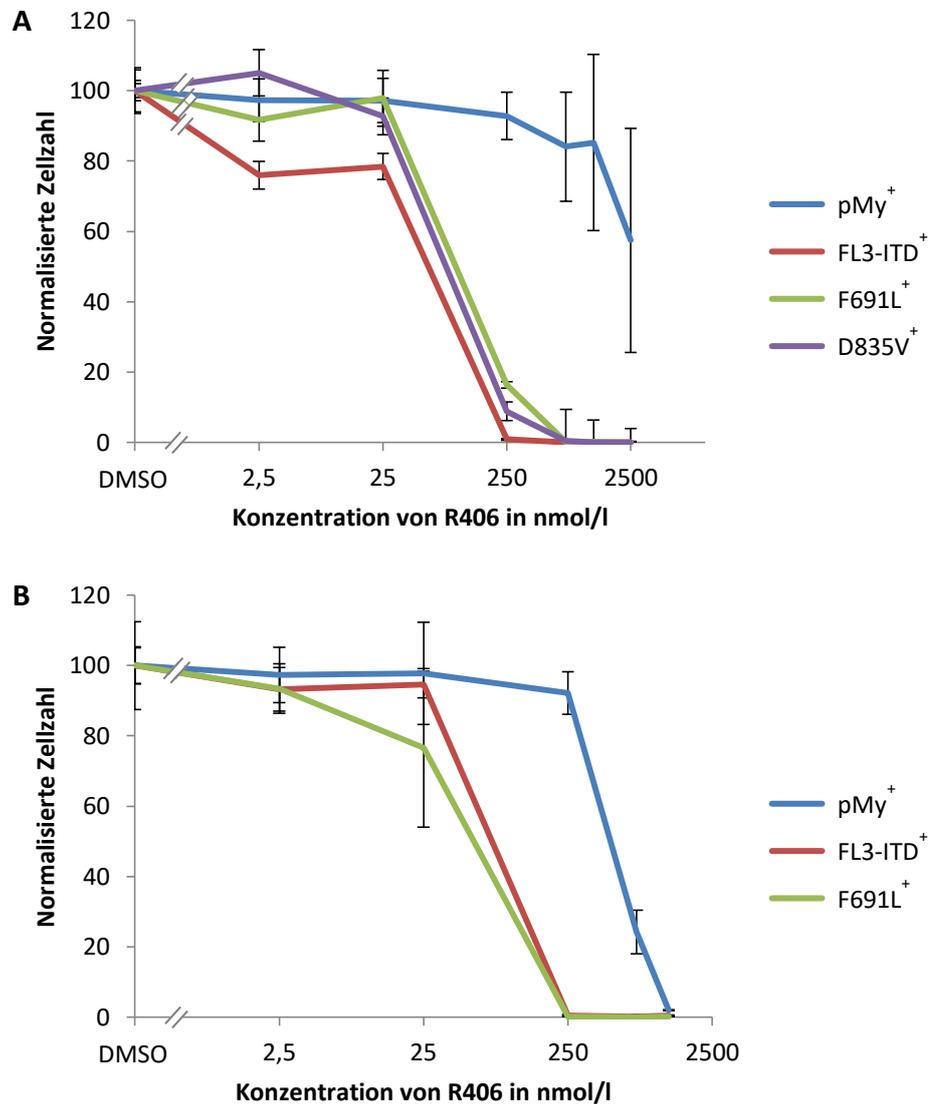


Abbildung 26: Zellwachstum unter Verwendung des SYK-Inhibitors R406. Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors R406 angegeben. Die vertikale Achse zeigt die normalisierte Zellzahl in Bezug auf das Zellwachstum bei Inkubation mit DMSO. A: Darstellung des Zellwachstums von Ba/F3-Zellen in Abhängigkeit von R406 mit Angabe der Standardabweichung. pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-, pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)- und pMy-FLT3-ITD D835V (D835V⁺)-exprimierende Zellen werden ab einer Konzentration von 250 nmol/l R406 (nahezu) vollständig supprimiert. pMy-IRES-GFP (pMy⁺)-positive Zellen zeigen eine stärkere Proliferationshemmung erst bei einer Konzentration von 2.500 nmol/l R406. B: Darstellung des Zellwachstums von 32D-Zellen in Abhängigkeit von R406 mit Angabe der Standardabweichung. pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)- und pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)-exprimierende Zellen sind bei einer Konzentration von 250 nmol/l R406 vollständig supprimiert. pMy-IRES-GFP (pMy⁺)-Zellen sind erst bei zehnfacher Konzentration von 2.500 nmol/l vollständig supprimiert.

Die Verwendung von R406 zeigt bei FLT3-mutierten Zellpopulationen eine Suppression des Zellwachstums bei niedrigeren Inhibitor-Konzentrationen als bei nicht-FLT3-mutierten pMy⁺-Zellen. Dieser Effekt ist in 32D-Zellen mit einem Faktor 10 geringer ausgeprägt als in Ba/F3-Zellen. In Ba/F3-Zellen bewirkt die Verzehnfachung des Wirkungsspiegels von 250 nmol/l auf 2.500 nmol/l nur eine Abnahme der Zellproliferation um etwa ein Drittel. Die Standardabweichung in Abbildung 26 ist in einigen Fällen zu gering, um in dieser Vergrößerung dargestellt werden zu können.

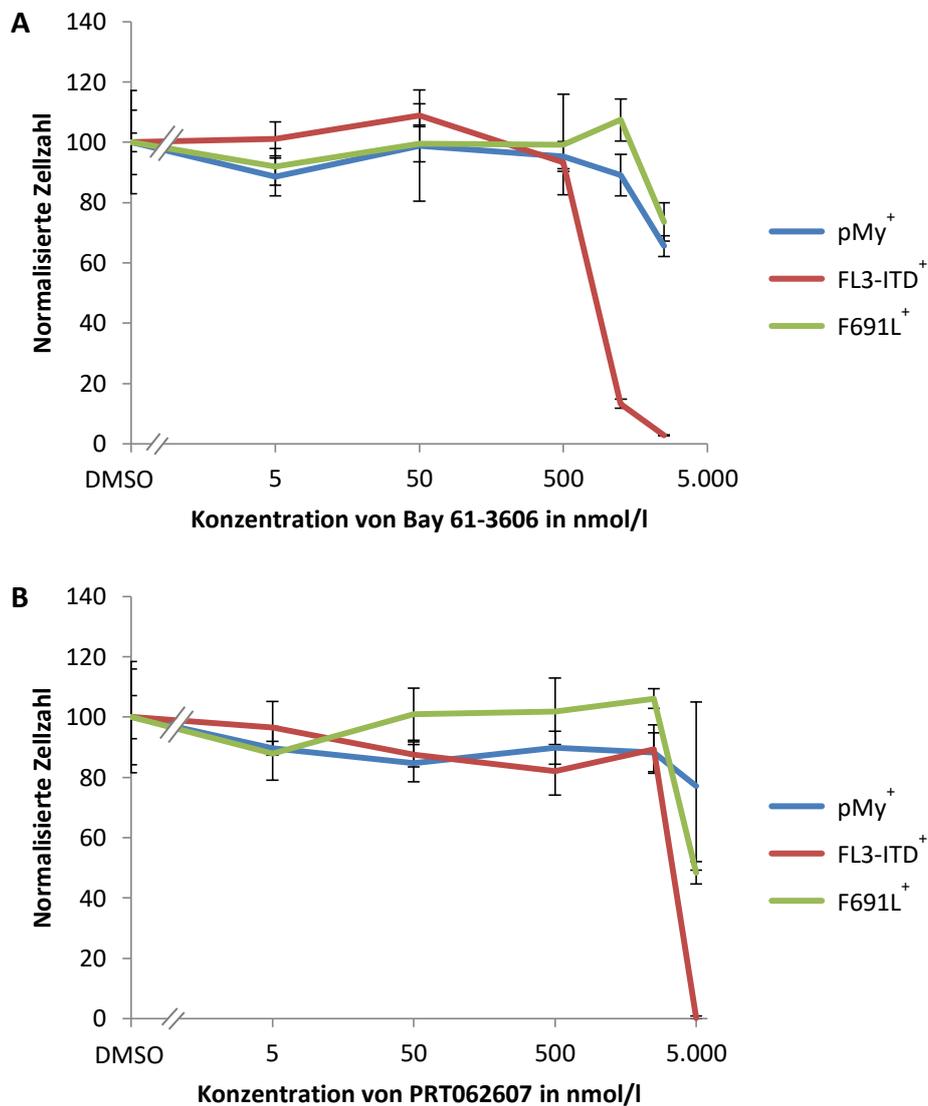


Abbildung 27: Zellwachstum von Ba/F3-Zellen unter Verwendung der SYK-Inhibitoren Bay 61-3606 und PRT062607. Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors Bay 61-3606 angegeben. Die vertikale Achse zeigt die normalisierte Zellzahl in Bezug auf das Zellwachstum bei Inkubation mit DMSO. A: Darstellung des Zellwachstums in Abhängigkeit von Bay 61-3606 mit Angabe der Standardabweichung. pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierende Zellen werden ab einer Konzentration von 1.250 nmol/l Bay 61-3606 sehr stark supprimiert. pMy-IRES-GFP (pMy⁺)- und pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)-positive Zellen zeigen eine stärkere Proliferationshemmung erst bei einer Konzentration des Inhibitors von 2.500 nmol/l. B: Darstellung des Zellwachstums in Abhängigkeit von PRT062607 mit Angabe der Standardabweichung. Ein Effekt der Suppression in den drei Zellpopulationen pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) und pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) zeigt sich erst bei 5.000 nmol/l PRT062607. Bei dieser Konzentration sind pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-Zellen sind vollständig supprimiert.

In XTT-Assay Experimenten mit Ba/F3-Zellen gelang die Suppression von FLT3-ITD⁺ in sehr hohen Konzentrationen auch mit Bay 61-3606 und PRT062607 (2.500 nmol/l bzw. 5.000 nmol/l), die aber eher auf ein *off-target*-Phänomen schließen lassen (siehe Kapitel 6.3. Analyse ausgewählter Effektoren von FLT3). pMy⁺ und F691L⁺ zeigten eine ähnliche Wirkung bei gleichen Konzentrationen der beiden SYK-Inhibitoren (Abbildung 27).

5.4.3. Verwendung von weiteren Kinase-Inhibitoren

Neben der Verwendung von FLT3- und SYK-Inhibitoren wurden weiterhin der BTK-Inhibitor Ibrutinib und die SRC-Inhibitoren PP1 und PP2 hinsichtlich ihrer Wirkung auf pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ getestet (Abbildungen 28, 29 und 30).

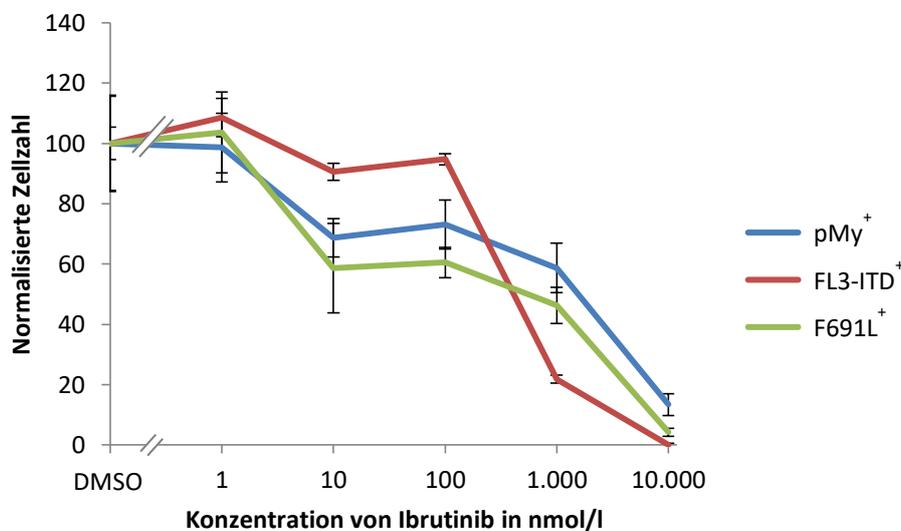


Abbildung 28: Wachstumsverhalten von Ba/F3-Zellen unter Verwendung von Ibrutinib mit Angabe der Standardabweichung. Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration des BTK-Inhibitors Ibrutinib angegeben. Die vertikale Achse zeigt die normalisierte Zellzahl in Bezug auf das Zellwachstum bei Inkubation mit DMSO. Es zeigt sich eine vergleichbare konstante Abnahme der normalisierten Zellzahl in allen drei Populationen.

Die Verwendung von Ibrutinib zeigte lediglich eine konstante, vergleichbare Abnahme des Zellwachstums der Populationen pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺. Es wurde kein Überlebensvorteil von pMy⁺ gegenüber den beiden anderen Populationen sichtbar (Abbildung 28).

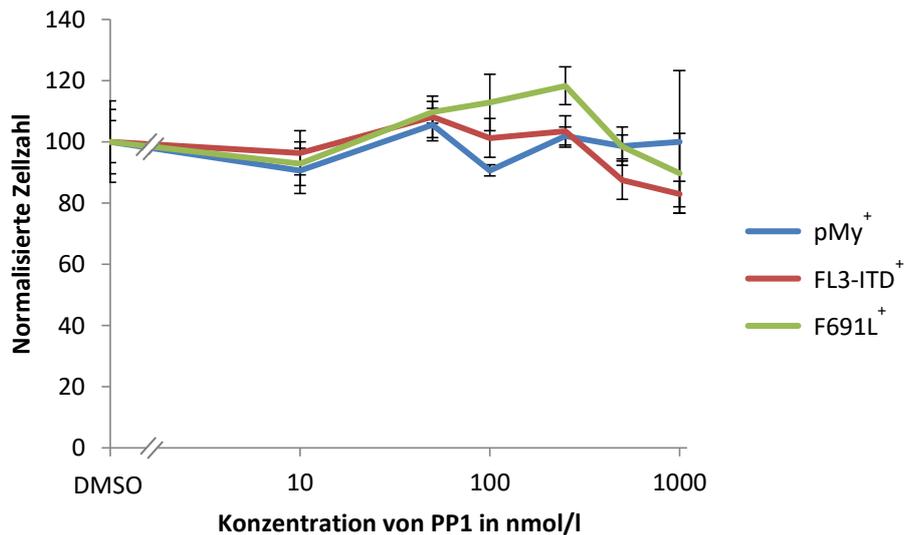


Abbildung 29: Wachstumsverhalten von Ba/F3-Zellen unter Verwendung von PP1 mit Angabe der Standardabweichung. Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration des SRC-Inhibitors PP1 angegeben. Die vertikale Achse zeigt die normalisierte Zellzahl in Bezug auf das Zellwachstum bei Inkubation mit DMSO. Es zeigt sich in allen Populationen und eingesetzten Inhibitorkonzentrationen ein vergleichbares Wachstum wie in der DMSO-Kontrolle.

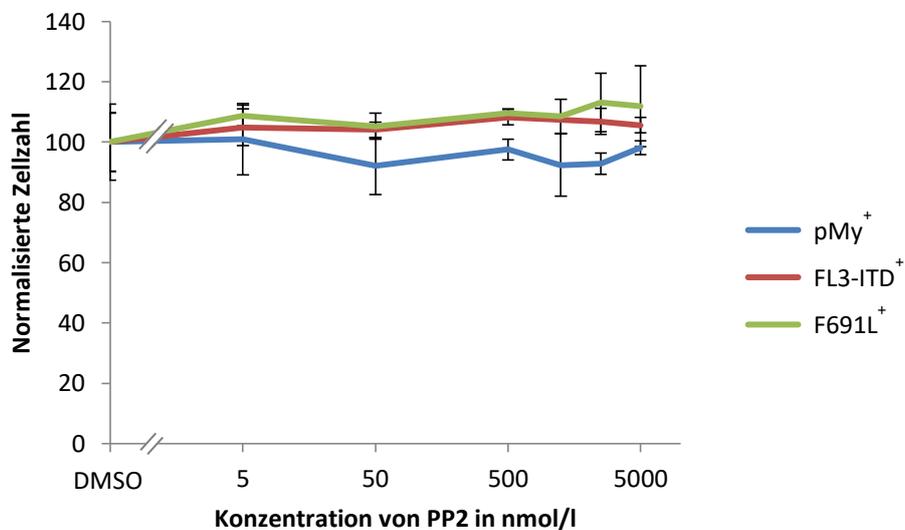


Abbildung 30: Wachstumsverhalten von Ba/F3-Zellen unter Verwendung von PP2 mit Angabe der Standardabweichung. Auf der horizontalen Achse ist die Konzentration des SRC-Inhibitors PP2 angegeben. Die vertikale Achse zeigt die normalisierte Zellzahl in Bezug auf das Zellwachstum bei Inkubation mit DMSO. Es zeigt sich in allen Populationen und eingesetzten Inhibitorkonzentrationen ein vergleichbares Wachstum wie in der DMSO-Kontrolle.

Die Verwendung von PP1 und PP2 zeigte auch in hohen Dosen keine Abnahme des Zellwachstums der drei Populationen. Die Wachstumsrate der Zellen entsprach in etwa der Wachstumsrate bei alleiniger Zugabe von DMSO (Abbildungen 29 und 30).

5.5. Vergleich des Phosphorylierungsstatus von pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺

Die Methode der SILAC-Markierung der Zellen ermöglicht eine quantitative Analyse des (Phospho)Proteoms, wodurch weitere Untersuchungen zu Unterschieden der Signaltransduktion der drei Zellpopulationen pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ möglich sind.

Die transduzierten Ba/F3-Zellen wurden in drei verschiedenen SILAC-Medien (siehe Kapitel 4.4.1. SILAC-Markierung) kultiviert. BA/F3-Zellen mit dem Leervektor pMy-IRES-GFP wurden in einem Medium mit „leichten“ Aminosäuren (d.h. mit natürlich-vorkommenden Isotopen von Lysin und Arginin) aufgenommen. FLT3-ITD⁺ wurden in SILAC-Medium mit „mittelschweren“ Aminosäuren („Lysin +4“ und „Arginin +6“) kultiviert und F691L⁺ wurden in „schwerem“ SILAC-Medium kultiviert („Lysin +8“ und „Arginin +10“). Die weiteren Bedingungen der Kultivierung entsprechen den üblichen Standards der Zelllinie. pMy⁺-positive Zellen erhielten entsprechend Interleukin-3 als Zusatz. Für weitere Experimente wurde FLT3-ITD⁺ in „leichtes“ Medium aufgenommen.

Die Zellen wurden lysiert, nach Bestimmung der Proteinkonzentration zu gleichen Teilen gemischt und anschließend verdaut. Es wurden einerseits Experimente durchgeführt, die das gesamte, globale Phosphoproteom erfassen, d.h. hauptsächlich Serin- und Threoninreste, aber nur wenige Tyrosinreste, andererseits wurden weitere spezielle Untersuchungen bezüglich der Phosphorylierung von Tyrosin-Seitenketten durchgeführt. Tyrosin-Seitenketten werden beispielsweise von der Tyrosinkinase FLT3 phosphoryliert⁹⁵ und sind deshalb für diese Arbeit von besonderem Interesse. Abbildung 31 zeigt den schematischen Ablauf der Probenherstellung, Messung der Massenspektrometrie und anschließender Analyse.

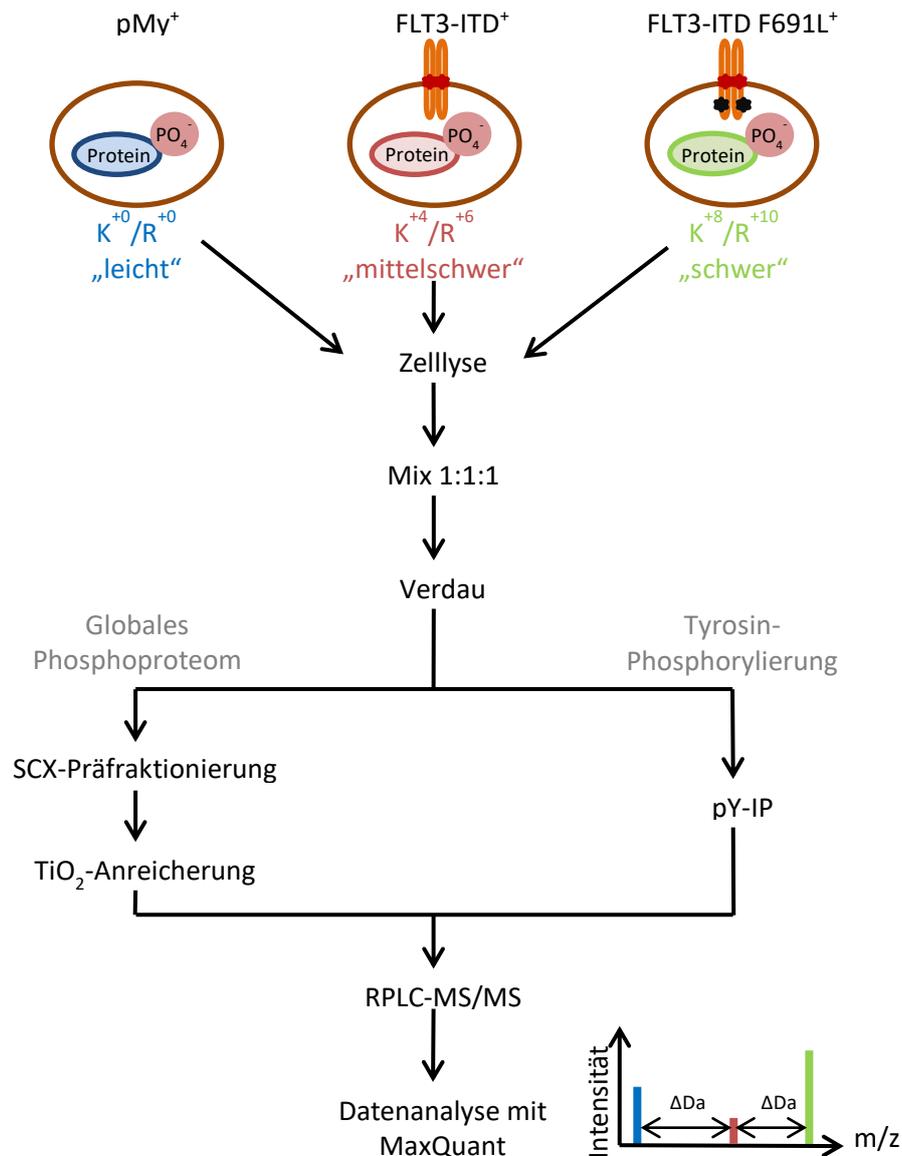


Abbildung 31: Schematischer Ablauf der massenspektrometrischen Experimente. Der Beginn der Experimente verläuft gleich. Die drei Zellpopulationen von pMy-IRES-GFP (pMy⁺), pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺) und pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺) werden lysiert und zu gleichen Teilen gemischt. Danach werden die Zellen verdaut und entsprechend des Experimentes weiter in Richtung globales Phosphoproteom bzw. Tyrosin-Phosphorylierung prozessiert. Als gemeinsame Endstrecke werden die Proben Tandem-massenspektrometrisch detektiert. Abschließend werden die Proben mit MaxQuant ausgewertet.

Neben den Experimenten mit drei Populationen von Ba/F3-Zellen („leicht“, „mittelschwer“ und „schwer“) wurden die gleichen Experimente auch nur mit FLT3-ITD⁺ in „leichtem“ und F691L⁺ in „schwerem“ SILAC-Medium durchgeführt. Hieraus ergaben sich zwei Experimente zum globalen Phosphoproteom und zwei zur Tyrosin-Phosphorylierung. Unterschiede in der Phosphorylierung mit einem z-Wert von < -2 oder > 2 (p<0.05) werden als signifikant angesehen. Zur Überprüfung der Seitenketten wurde die Datenbank PhosphoSitePlus verwendet.

5.5.1. Globales Phosphoproteom

Das Experiment mit drei Populationen zum globalen Phosphoproteom identifizierte und quantifizierte 7074 Phosphorylierungsstellen, von denen ca. 8% (573) einen signifikanten Expressionsunterschied zeigten (Abbildung 32B). Bei der Analyse des zweiten Experimentes mit nur den beiden Populationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ wurden 7619 Proteine detektiert von denen sich ca. 4% (302) als signifikant reguliert erwiesen (Abbildung 32A). Der Anteil der regulierten Tyrosinseitenketten liegt beide Male bei ca. einem Prozent und der Großteil der regulierten Seitenketten (jeweils >75%) ist auf Serin zurückzuführen.

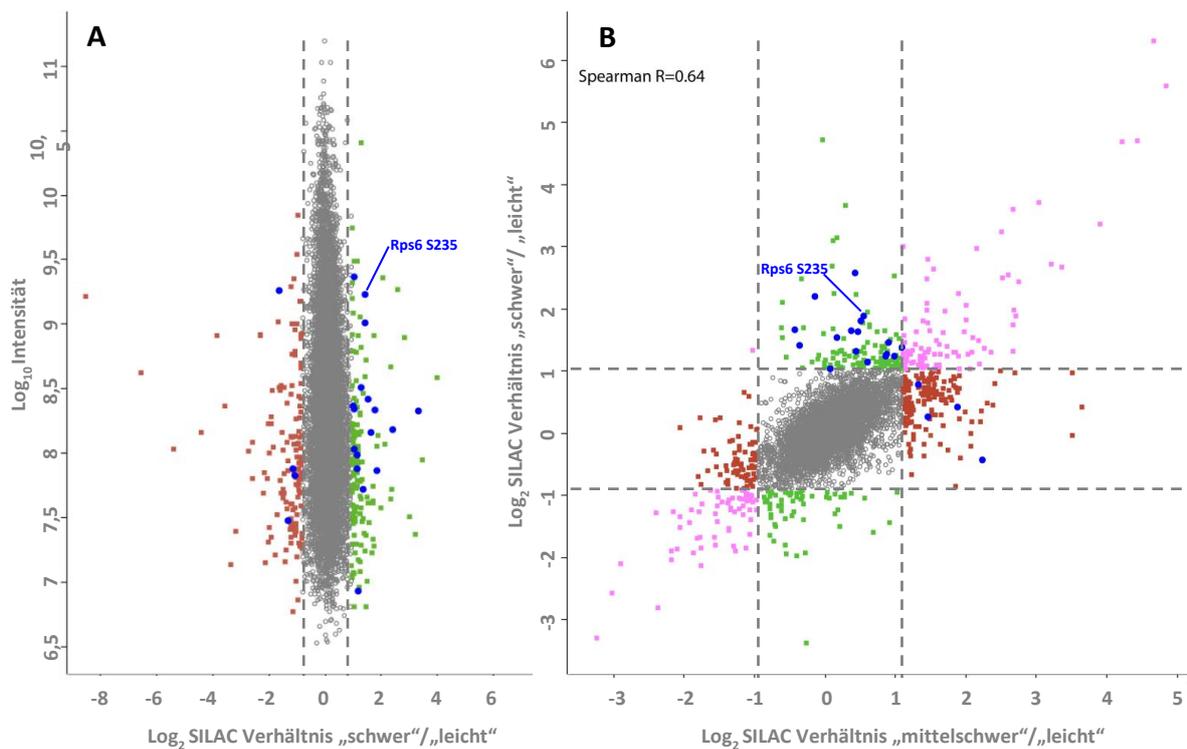


Abbildung 32: Graphische Darstellung der ermittelten Proteine im globalen Phosphoproteom. In grün dargestellt sind die in pMy-FLT3-ITD-exprimierenden Zellen regulierten Proteine; die in pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierenden Zellen regulierten Proteine sind rot markiert. Die 21 Proteine, bei denen in beiden Experimenten in derselben Population die gleiche Seitenkette phosphoryliert war, sind blau dargestellt (siehe Tabelle 21). Die gestrichelten Hilfslinien dienen als Signifikanzgrenzen der regulierten Proteine und beschreiben jeweils die z-Werte -2 und 2 (nicht identisch mit den Achsenwerten -2 und 2). Das Protein Rps6 wird später noch näher betrachtet. A: Ermittelte Proteine im Experiment mit zwei Populationen (pMy-FLT3-ITD- und pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierende Zellen). Auf der logarithmischen, horizontalen Achse ist das Verhältnis zwischen „schwer“ und „leicht“ (also den Populationen pMy-FLT3-ITD F691L und pMy-FLT3-ITD) abgebildet. Die logarithmische, vertikale Achse zeigt die Intensität des detektierten Signals. B: Ermittelte Proteine im Experiment mit drei Populationen (pMy-IRES-GFP-, pMy-FLT3-ITD- und pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierende Zellen). Auf der logarithmischen, horizontalen Achse ist das Verhältnis zwischen „mittelschwer“ und „leicht“ (also den Populationen pMy-FLT3-ITD und pMy-IRES-GFP) abgebildet. Die logarithmische, vertikale Achse zeigt das Verhältnis von „schwer“ zu „leicht“ (entspricht pMy-FLT3-ITD F691L- zu pMy-IRES-GFP-exprimierenden Zellen). Die rosa Markierungen zeigen regulierte Proteine die sich sowohl im Verhältnis „mittelschwer“ zu „leicht“ als auch im Verhältnis „schwer“ zu „leicht“ unterscheiden. Es zeigen sich in diesem Teil daher keine signifikanten Regulierungen zwischen pMy-FLT3-ITD- und pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierenden Zellen.

Anschließend wurde ein Vergleich der regulierten Proteine aus beiden Experimenten unternommen. Für das Experiment mit drei Populationen pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ wurden nur regulierte Proteine in den Vergleich einbezogen, die sich signifikant von beiden anderen Populationen unterschieden. Beispielsweise musste eine in F691L⁺ im Vergleich zu FLT3-ITD⁺ häufiger vorkommende Phosphorylierung ebenfalls im Vergleich zu pMy⁺ häufiger nachgewiesen werden. In Abbildung 32 sind in FLT3-ITD⁺ regulierte Proteine rot dargestellt, die in F691L⁺ dagegen grün. Phosphorylierte Proteine, die sich in diesem Versuch in beiden Verhältnissen als identisch reguliert darstellten („mittelschwer“/„leicht“ und „schwer“/„leicht“: rosa markiert), wurden nicht mit in den Vergleich einbezogen, da diese sich nicht in einem signifikanten Verhältnis zwischen „schwer“ und „mittelschwer“ unterscheiden. Sie unterschieden sich in der Phosphorylierung von der Kontrollpopulation (pMy⁺), nicht aber untereinander in den Populationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺.

Der Vergleich ergab insgesamt 21 Proteine. Für FLT3-ITD⁺ (grün markierte Proteine) wurden vier signifikant hoch-regulierte Proteine identifiziert, bei denen jeweils der gleiche Aminosäurerest phosphoryliert war (Tabelle 20). Der Vergleich bei F691L⁺ (rot markierte Proteine) ergab sogar 17 Proteine (Tabelle 21).

UniProt-ID	Name des Proteins	Name des Gens	Phosphorylierte Position und Aminosäure	Phosphorylierungsverhältnis (F691L ⁺ /FLT3-ITD ⁺)
O54890	<i>Integrin beta-3</i>	Itgb3	787 (S)	0,41
Q8K1T1	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 25</i>	Lrrc25	211 (T)	0,43
Q99LB4	<i>Macrophage-capping protein</i>	Capg	327 (S)	0,43
Q3UW53	<i>Protein Niban</i>	Fam129a	581 (S)	0,48

Tabelle 20: Massenspektrometrisch identifizierte, in pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)- gegenüber pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen signifikant vermindert detektierte Proteine des globalen Phosphoproteoms (Abbildung 32). Die erste Spalte gibt die Protein-ID der bioinformatischen Datenbank UniProt an. Entsprechend der ID finden sich in den Spalten zwei und drei das zugeordnete Protein bzw. das kodierende Gen. Die vierte Spalte zeigt die Position der phosphorylierten Aminosäuren-Seitenkette im Protein. Der Buchstabe entspricht der phosphorylierten Aminosäure (S: Serin bzw. T: Threonin). Die fünfte Spalte zeigt das Verhältnis der Phosphorylierung der beiden Ziellinien: ein Wert von weniger als 0,5 bedeutet mindestens eine um die Hälfte reduzierte Detektion des phosphorylierten Proteins in F691L⁺ im Vergleich zu FLT3-ITD⁺.

UniProt-ID	Name des Proteins	Name des Gens	Phosphorylierte Position und Aminosäure	Phosphorylierungsverhältnis (F691L ⁺ /FLT3-ITD ⁺)
E9Q0V6	<i>NHS-like protein 2</i>	Nhsl2	772 (S)	10,07
Q80XC6	<i>Protein NRDE2 homolog</i>	Nrde2	64 (S)	5,27
Q80XU8	<i>Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 4</i>	Lrfn4	627 (S)	3,63
E9QK89	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>	Mdc1	929 (S)	3,4
Q5SUH7	<i>Clathrin interactor 1</i>	Clint1	307 (S)	3,12
Q8CAG6	<i>Pleckstrin</i>	Plek	117 (S)	2,87
P62754	<i>40S ribosomal protein S6</i>	Rps6	235 (S)	2,7
A0A0R4JOP5	<i>Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1</i>	Pstpip1	318 (S)	2,65
Q8BP67	<i>60S ribosomal protein L24</i>	Rpl24	83 (T)	2,57
A0A0U1RPL0	<i>Ataxin-2-like protein</i>	Atxn2l	304 (S)	2,44
Q61081	<i>Hsp90 co-chaperone Cdc37;Hsp90 co-chaperone Cdc37, N-terminally processed</i>	Cdc37	76 (S)	2,28
P62204	<i>Calmodulin</i>	Calm1	100 (Y)	2,22
Q8BMA5	<i>Protein NPAT</i>	Npat	1264 (T)	2,2
D3Z5P5	<i>DNA-binding protein SMUBP-2</i>	Ighmbp2	800 (S)	2,04
Q9JMG1	<i>Endothelial differentiation-related factor 1</i>	Edf1	4 (S)	2,04
P48678-2	<i>Prelamin-A/C;Lamin-A/C</i>	Lmna	390 (S)	2,02
A0A0U1RP03	<i>Linker for activation of T-cells family member 1</i>	Lat	87 (S)	2,01

Tabelle 21: Massenspektrometrisch identifizierte, in pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)- gegenüber pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen signifikant vermehrt detektierte Proteine des globalen Phosphoproteoms (Abbildung 32). Die erste Spalte gibt die Protein-ID der bioinformatischen Datenbank UniProt an. Entsprechend der ID finden sich in den Spalten zwei und drei das zugeordnete Protein bzw. das kodierende Gen. Die vierte Spalte zeigt die Position der phosphorylierten Aminosäuren-Seitenkette im Protein. Der Buchstabe entspricht der phosphorylierten Aminosäure (S: Serin, T: Threonin und Y: Tyrosin). Die fünfte Spalte zeigt das Verhältnis der Phosphorylierung der beiden Ziellinien: ein Wert von mehr als 2 bedeutet mindestens eine um das Doppelte erhöhte Detektion des phosphorylierten Proteins in F691L⁺ im Vergleich zu FLT3-ITD⁺. Die phosphorylierten Seitenketten in den fett-markierten Zeilen besitzen einen in der Literatur beschrieben funktionellen Effekt.

Bei vier der Proteine aus Tabelle 21 ist ein Effekt der Phosphorylierung in der Literatur beschrieben. Die Phosphorylierung von Pleckstrin an Position 117 bewirkt dessen Aktivierung.⁹⁶ Das 40S ribosomale Protein S6 reguliert durch die Phosphorylierung von Serin (Position 235) weitere Proteine und löst dadurch ein Zellwachstum aus.^{97, 98} Calmodulin ändert durch die Phosphorylierung von Serin an Position 100 die intrazelluläre Lokalisation und reguliert dadurch nachgeschaltete Signalwege.⁹⁹ Auch die Phosphorylierung von Prelamin-A/C an Position 390 verändert dessen intrazelluläre Lokalisation und führt zur Aktivierung.¹⁰⁰

5.5.2. Tyrosin-Phosphorylierung

Die Experimente zur Ermittlung der globalen Phosphorylierung zeigten, bedingt durch das Anreicherungsverfahren, nur zu einem sehr geringen Prozentsatz phosphorylierte Tyrosin-Seitenketten. Da die Kinase FLT3 jedoch zu den Tyrosinkinasen gehört, versprachen Experimente zur Detektion der Tyrosin-Phosphorylierung eher den Nachweis auch von weiter *upstream* in der FLT3-Signalkaskade-gelegenen Proteinen. In den Experimenten zur Tyrosin-Phosphorylierung wurden im Experiment mit drei Populationen (pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺) insgesamt 400 phosphorylierte Proteine quantifiziert, über 95% davon mit phosphorylierter Tyrosin-Seitenkette. Signifikant reguliert waren 268 (entspricht 67%). Die Auswertung des Experimentes mit den beiden Populationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ ergab 781 phosphorylierte Proteine (Abbildung 33A), davon 27% reguliert (207). Der Anteil der detektierten Tyrosin-Seitenketten betrug ebenfalls über 95%. Die Zahl der hier regulierten Proteine betrug 207 (Abbildung 33B).

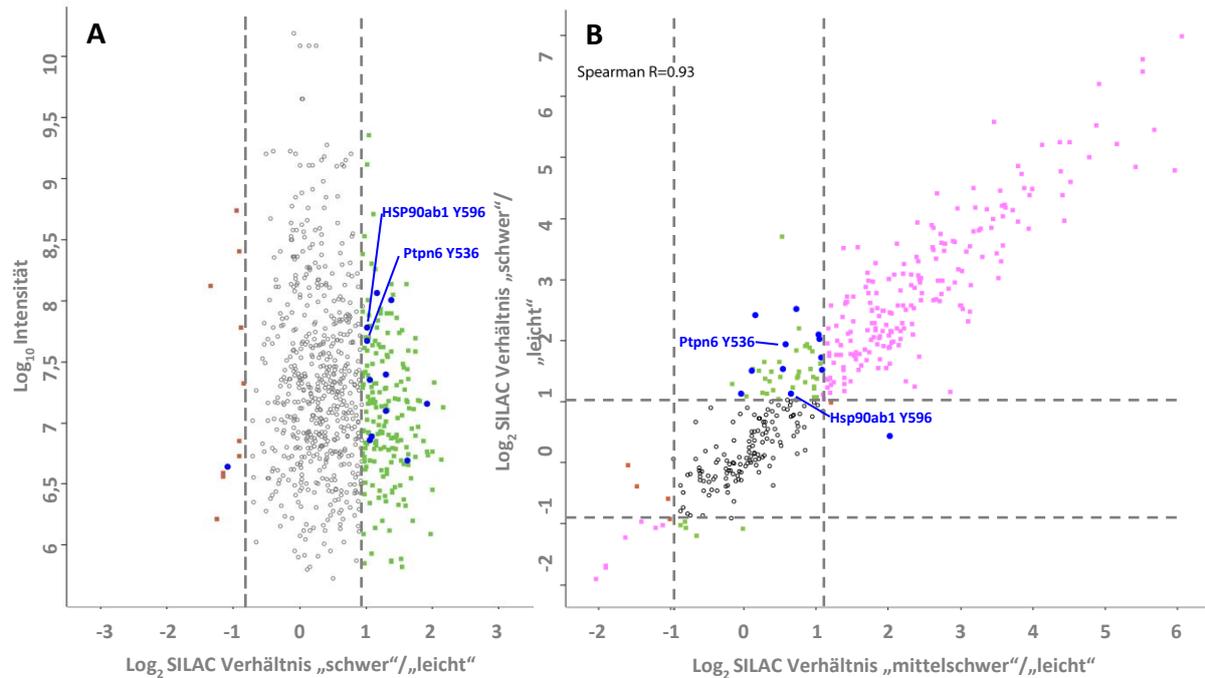


Abbildung 33: Graphische Darstellung der ermittelten Proteine in der Tyrosin-Phosphorylierung. In grün dargestellt sind die in pMy-FLT3-ITD-exprimierenden Zellen regulierten Proteine; die in pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierenden Zellen regulierten Proteine sind rot markiert. Die 12 Proteine, bei denen in beiden Experimenten in derselben Population die gleiche Seitenkette phosphoryliert war, sind blau dargestellt (siehe Tabellen 22 und 23). Die beiden Proteine Ptpn6 und HSP90ab1 werden später noch genauer betrachtet und sind deshalb hier namentlich aufgeführt. Die gestrichelten Hilfslinien dienen als Signifikanzgrenzen der regulierten Proteine und beschreiben jeweils die z-Werte -2 und 2 (nicht identisch mit den Achsenwerten -2 und 2). A: Ermittelte Proteine im Experiment mit zwei Populationen (pMy-FLT3-ITD- und pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierende Zellen). Auf der logarithmischen, horizontalen Achse ist das Verhältnis zwischen „schwer“ und „leicht“ (also den Populationen pMy-FLT3-ITD F691L und pMy-FLT3-ITD) abgebildet. Die logarithmische, vertikale Achse zeigt die Intensität des detektierten Signals. B: Ermittelte Proteine im Experiment mit drei Populationen (pMy-IRES-GFP-, pMy-FLT3-ITD- und pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierende Zellen). Auf der logarithmischen, horizontalen Achse ist das Verhältnis zwischen „mittelschwer“ und „leicht“ (also den Populationen pMy-FLT3-ITD und pMy-IRES-GFP) abgebildet. Die logarithmische, vertikale Achse zeigt das Verhältnis von „schwer“ zu „leicht“ (entspricht pMy-FLT3-ITD F691L- zu pMy-IRES-GFP-exprimierenden Zellen). Die rosa Markierungen zeigen regulierte Proteine die sich sowohl im Verhältnis „mittelschwer“ zu „leicht“ als auch im Verhältnis „schwer“ zu „leicht“ unterscheiden. Es zeigen sich in diesem Teil daher keine signifikanten Regulierungen zwischen pMy-FLT3-ITD- und pMy-FLT3-ITD F691L-exprimierenden Zellen.

Die Experimente wurden ebenfalls nach dem gleichen Ablauf wie die Experimente der globalen Phosphorylierung ausgewertet. *SLAM family member 5* wurde dabei als einziges signifikant reguliertes phosphoryliertes Protein detektiert, das in beiden Teilexperimenten in F691L⁺ eine verminderte Phosphorylierung im Vergleich zu FLT3-ITD⁺ zeigt (Tabelle 22). Für F691L⁺ ergaben sich 11 Proteine, die eine signifikant verstärkte Phosphorylierung zeigten (Tabelle 23).

UniProt-ID	Name des Proteins	Name des Gens	Phosphorylierte Position und Aminosäure	Phosphorylierungsverhältnis (F691L ⁺ /FLT3-ITD ⁺)
E9Q9E8	<i>SLAM family member 5</i>	Cd84	264 (Y)	0,47

Tabelle 22: Massenspektrometrisch identifizierte, in pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)- gegenüber pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen signifikant vermindert detektierte Proteine der Tyrosin-Phosphorylierung. Die erste Spalte gibt die Protein-ID der bioinformatischen Datenbank UniProt an. Entsprechend der ID finden sich in den Spalten zwei und drei das zugeordnete Protein bzw. das kodierende Gen. Die vierte Spalte zeigt die Position der phosphorylierten Aminosäuren-Seitenkette im Protein. Der Buchstabe entspricht der phosphorylierten Aminosäure (Y: Tyrosin). Die fünfte Spalte zeigt das Verhältnis der Phosphorylierung der beiden Ziellinien: ein Wert von weniger als 0,5 bedeutet mindestens eine um die Hälfte reduzierte Detektion des phosphorylierten Proteins in F691L⁺ im Vergleich zu FLT3-ITD⁺.

UniProt-ID	Name des Proteins	Name des Gens	Phosphorylierte Position und Aminosäure	Phosphorylierungsverhältnis (F691L ⁺ /FLT3-ITD ⁺)
Q8CI51	<i>PDZ and LIM domain protein 5</i>	Pdlim5	251 (Y)	3,79
P29351-3	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6</i>	Ptpn6	536 (Y)	3,36
Q5SNZ0-3	<i>Girdin</i>	Ccdc88a	1801 (Y)	3,07
E9Q3W4	<i>Plectin</i>	Plec	4622 (Y)	2,9
P42208	<i>Septin-2</i>	Sept2	17 (Y)	2,6
E9Q2A6	<i>Protein-tyrosine kinase 2-beta</i>	Ptk2b	580 (Y)	2,49
I7HJS1	<i>Emerin</i>	Emd	161 (Y)	2,46
E9PXZ8	<i>Cytokine-dependent hematopoietic cell linker</i>	Clnk	96 (Y)	2,23
Q3TTA7-2	<i>E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B</i>	Cblb	763 (Y)	2,08
F8VPL2	<i>Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha</i>	Pik3c2a	542 (Y)	2,08
P11499	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	Hsp90ab1	596 (Y)	2,03

Tabelle 23: Massenspektrometrisch identifizierte, in pMy-FLT3-ITD F691L (F691L⁺)- gegenüber pMy-FLT3-ITD (FLT3-ITD⁺)-exprimierenden Ba/F3-Zellen signifikant vermehrt detektierte Proteine der Tyrosin-Phosphorylierung. Die erste Spalte gibt die Protein-ID der bioinformatischen Datenbank UniProt an. Entsprechend der ID finden sich in den Spalten zwei und drei das zugeordnete Protein bzw. das kodierende Gen. Die vierte Spalte zeigt die Position der phosphorylierten Aminosäuren-Seitenkette im Protein. Der Buchstabe entspricht der phosphorylierten Aminosäure (Y: Tyrosin). Die fünfte Spalte zeigt das Verhältnis der Phosphorylierung der beiden Ziellinien: ein Wert von mehr als 2 bedeutet mindestens eine um das Doppelte erhöhte Detektion des phosphorylierten Proteins in F691L⁺ im Vergleich zu FLT3-ITD⁺. Die phosphorylierten Seitenketten in den fettmarkierten Zeilen besitzen einen in der Literatur beschriebenen funktionellen Effekt.

Drei in Tabelle 23 aufgeführten phosphorylierten Tyrosin-Seitenketten sind hinsichtlich ihres Effektes beschrieben. Die Phosphorylierung der *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6* an Position 536 führt zu einer Aktivierung des Enzyms, woraus ein Wachstum der Zellen resultiert.^{101, 102} Die Phosphorylierung von Girdin (Tyrosin an Position 1801) führt zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation und inhibiert

dadurch die Apoptose.¹⁰³ Die Phosphorylierung von Emerin an der Position 161 löst die Regulierung nachgeschalteter Proteine aus.¹⁰⁴

Zusammenfassend ist mit den Experimenten der Massenspektrometrie durch Analyse des globalen Phosphoproteoms und der Tyrosin-Phosphorylierungen die erfolgreiche Quantifizierung von phosphorylierten Aminosäureresten gelungen. Die Analyse ergab differentiell regulierte Phosphorylierungen für FLT3-ITD⁺ und F691L⁺, wobei sich die Gesamtheit der Regulierungen im globalen Phosphoproteom stärker unterscheidet als im Experiment der Tyrosin-Phosphorylierung.

6. Diskussion

Die Klassifikation der akuten Leukämien der WHO (letztmals 2016 überarbeitet veröffentlicht) beschreibt die AML als eine Gruppe von heterogenen Erkrankungen unterschiedlicher Ursache. Als Resultat kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation und Freisetzung unreifer, funktionsloser Zellen ins periphere Blut, welche zu verschiedensten Symptomen führt.²

Die Subtypen der AML werden durch die WHO zunehmend unter zytogenetischen und molekularbiologischen Aspekten klassifiziert, da eine solche Einteilung zufriedenstellender mit der Prognose korreliert und die Patienten einer gezielteren Therapie zugeführt werden können.²

Eine wichtige Ursache für die Entstehung der AML ist die Mutation von Proteinen, die dadurch in ihrer Funktionsweise gestört werden. In AML-Zellen von erwachsenen Patienten wird in ca. 30% der Fälle eine Mutation der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 nachgewiesen. Die Häufigkeit der Mutationen des FLT3-Proteins macht dieses zu einer interessanten Zielstruktur, sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Entwicklung neuer Medikamente. Mittlerweile sind FLT3-ITD-Inhibitoren in Form von Midostaurin sogar Teil der Erstlinientherapie der AML in Deutschland.²⁰

Die bei weitem am Häufigsten vorkommende Mutation von FLT3 ist die interne Tandemduplikation im Bereich der inaktivierenden juxtamembranen Domäne. Durch diese kommt es zu einer Dimerisierung ohne Liganden und zur dauerhaften Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden.^{45, 50}

Eine Art der Resistenzentwicklung gegenüber Kinase-Inhibitoren stellen sekundäre Punktmutationen des FLT3 Gens dar. Beispiele hierfür sind die „gatekeeper“ Mutation F691L oder die Mutation D835V des *activation loops*. Diese verhindern die Inaktivierung des Rezeptors bzw. senken die Bindungsaffinität von Typ II-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie AC220 deutlich. Daraus resultiert eine geringere Wirkung des Inhibitors. Trotz gleichem Wirkspiegel des Inhibitors kommt es dennoch zu einem Therapieversagen.⁶²

Die Hypothese, die zu den hier durchgeführten Experimenten und Untersuchungen führte, stellt nicht die fehlende Bindungsunfähigkeit der Inhibitoren als alleinige Ursache des Therapieversagens in den Mittelpunkt, sondern postuliert, exemplarisch an der Mutation F691L gezeigt, aberrante Signalwege, beispielsweise durch eine veränderte Lokalisation des Proteins FLT3, als Auslöser der fehlenden Wirkung. Hieraus könnten sich wiederum alternative Therapieansätze für Patienten mit Rezidiv einer AML nach initial erfolgreicher FLT3-Inhibitor-Therapie ergeben.

6.1. Vorexperimente

In einem ersten Schritt wurde das mutierte FLT3-ITD durch retrovirale Transduktion in murine Ba/F3- und 32D-Zellen eingebracht, die selbst kein FLT3-ITD exprimieren. Die transduzierten Zellen exprimierten dadurch nur jeweils eine mutierte Form des FLT3-Moleküls. Der Vergleich der FLT3-Expression von pMy-IRES-GFP-exprimierenden Zellen mit pMy-FLT3-ITD-, pMy-FIT3-ITD F691L- und FLT3-ITD D835V-exprimierenden Zellen zeigte, dass der physiologische Wildtyp (pMy⁺) wenig FLT3 exprimiert (Abbildung 15).

Weiterhin wurden die transduzierten Zellen wie von Nosaka und Kollegen beschrieben durch das Einbringen von FLT3-ITD und den beiden zusätzlichen TKD-Mutanten F691L und D835V im Wachstumsverhalten Interleukin-3 unabhängig (Tabellen 16, 17 und 18).⁹³

Die mit pMy-IRES-GFP transduzierten Zellen hingegen konnten in Interleukin-3-freiem Medium wie in der Literatur beschrieben nicht überleben (Tabelle 19).¹⁰⁵ Dass nicht alle Zellen innerhalb von 36 Stunden als apoptotisch identifiziert wurden, mag an der Methode der Durchflusszytometrie liegen, welche im untersuchten Fall die Viabilität der Zellen nur anhand der Größe und Granularität detektierte. Eine möglicherweise genauere Überprüfung hätte mit einem Apoptose-Assay durchgeführt werden können.

Auch nach mehrmaligen Transduktionsversuchen ließ sich in keiner der beiden verwendeten murinen Zelllinien für D835V⁺ im Vergleich zu FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ eine annähernd vergleichbare, detektierbare Überexpression von FLT3 im *Western Blot* erzielen (nicht als Abbildung dargestellt). Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen zeigte aber eine vergleichbare Expression von FLT3 (ebenfalls nicht

dargestellt). Aus diesem Grund ist wohl nicht von einer geringeren Transduktionseffizienz des Vektors pMy-FLT3-ITD D835V auszugehen. Es wäre denkbar, dass die Mutation D835V in FLT3-ITD zu einer anderen Lokalisation von FLT3-ITD in der Zelle führt und das Protein beim Lysieren nicht vollständig von den restlichen, zu verwerfenden Zellbestandteilen getrennt wurde. Andererseits könnte die Mutation jedoch auch dafür sorgen, dass das Protein schneller dem Proteinabbau zugeführt wird. Da sich die Expression von FLT3 in FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ in den durchgeführten *Western Blots* jedoch vergleichbar zeigte, wurde das Hauptaugenmerk auf diese beiden Populationen gerichtet.

Von Smith und Kollegen wurde 2012 im Fachjournal *Nature* die AC220-Resistenz von sekundären Punktmutationen des FLT3-ITD-Proteins beschrieben.⁶⁷ Diese Resistenz konnte durch XTT-*Proliferationsassays* für die eingebrachten Mutationen F691L und D835V bestätigt werden (Abbildung 16).

6.2. Lokalisation von FLT3-ITD in Ba/F3-Zellen

Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass das endogene Vorkommen von FLT3 in den verwendeten Ba/F3-Zellen nicht zweifelsfrei geklärt werden kann. Zwar wurden in der Vergangenheit Veröffentlichungen publiziert, beispielsweise von Spiekermann et al. oder Zheng et al., die den Wildtyp von Ba/F3-Zellen als FLT3-frei beschreiben, jedoch wird in diesen Publikationen keine Quelle für den Ursprung dieser Information angegeben.^{106, 107} Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) von der die Zellen unmittelbar vor der Transduktion bezogen wurden, gibt darüber hinaus eine unbekannte Herkunft der Herstellung der Zelllinie an. Es war jedoch selbst nach intensiver Literaturrecherche keine Publikation zur erstmaligen Herstellung und Verwendung von Ba/F3-Zellen auffindbar. Die hier durchgeführten Experimente weisen für pMy⁺ Ba/F3-Zellen sowohl im *Western Blot* (Abbildung 15, bereits in der Diskussion erwähnt) als auch in der Immunfluoreszenz (Abbildung 19) ein schwaches Signal für FLT3 auf. Einmalig wurde daraufhin ein *Western Blot* der drei regelmäßig verwendeten Populationen pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ mit dem Wildtyp (WT) von Ba/F3-Zellen ohne transduziertem Vektor angefertigt. Die Analyse zeigte eine vergleichbare Detektion von FLT3 in WT-Zellen und pMy⁺ sowie für FLT3-ITD in

FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ (nicht abgebildet). Weiterhin wurden aus diesen WT-Ba/F3-Zellen *Cytospins* angefertigt, die zur Detektion einer eventuellen Auto-Fluoreszenz im Bereich der Wellenlänge von GFP verwendet wurden. Auch dieses Experiment legt das Vorkommen von FLT3 in den verwendeten BA/F3-Zellen nahe: In den Wildtyp-Zellen ermöglichte der Antikörper gegen FLT3 die Detektion eines Signales vergleichbar mit dem in pMy⁺ (nicht abgebildet). Aus diesem Grund ist zumindest für die vorliegenden, untersuchten BA/F3-Zellen von einer endogenen Expression von FLT3 auszugehen. Wodurch der in der Literatur publizierte Unterschied schlussendlich zustande kommt, kann nicht abschließend eruiert werden.

Durch die endogene Expression von FLT3 in den verwendeten Ba/F3-Zellen besitzen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ eine heterozygote Expression von FLT3, da neben der eingebrachten FLT3-Mutation zusätzlich zu einem geringen Anteil der Wildtyp von FLT3 exprimiert wird. Allerdings liegt der Wildtyp im Vergleich zu FLT3-ITD in deutlich geringeren Mengen in der Zelle vor. Die heterozygote Expression stellt dabei einen Phänotyp dar, der auch in vielen Patientenzellen gefunden wird. Die Ergebnisse lassen sich somit nicht ohne weiteres auf AML-Zellen übertragen, die mit einem Verlust des Wildtyp-Allels einhergehen. Für die Patientengruppe mit dem Verlust des Wildtyp-Allels zeigen klinische Daten eine besonders schlechte Prognose.^{108, 109}

Die in Abbildung 17 dargestellte unterschiedliche Expression der beiden FLT3-Varianten konnte mehrmals reproduziert werden. Das Verhältnis von FLT3_{130kDa} zu FLT3_{160kDa} bei FLT3-ITD⁺ betrug ca. 1:2 und bei F691L⁺ ca. 1:1. Das Molekulargewicht der beiden Varianten ist in den beiden untersuchten Populationen minimal höher als beim FLT3-Wildtyp, da es sich bei FLT3-ITD-Mutationen um eine Insert-Mutation von Aminosäuren handelt. Allerdings ist die eingebrachte Aminosäuresequenz nur zwölf Aminosäuren lang und bezogen auf die Gesamtlänge des FLT3-Proteins von 933 Aminosäuren zu vernachlässigen.

Der ermittelte Unterschied der beiden FLT3-Varianten sollte im Rahmen der Experimente mit einem zweiten Verfahren belegt werden. Dies wurde mit immunhistochemischen Färbungen von *Cytospins* der Ba/F3-Zellen erzielt

(Abbildungen 19, 20 und 21). Diese sollten die Hypothese durch eine unterschiedliche intrazelluläre Expression von FLT3-ITD in FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ untermauern.

Die konfokalen Aufnahmen zeigten in den Populationen pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ eine mit Ausnahme des Zellkerns weitestgehend homogene Verteilung von FLT3 in der gesamten Zelle. In FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ war zudem eine punktuelle Anreicherung in der Nähe des Zellkerns zu erkennen. Diese war in den F691L⁺ einen Deut stärker als in FLT3-ITD⁺ ausgeprägt (Abbildungen 20 und 21). Die Anreicherungen deckten sich zudem mit den am stärksten detektierten Arealen der Proteindisulphidisomerase (PDI), welche im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist.¹¹⁰ Dies legt eine benachbarte Lokalisation der FLT3-Anreicherungen zum ER nahe und deutet entsprechend auf eine intrazelluläre Lokalisation hin. Nicht gänzlich auszuschließen ist, dass dieser Effekt auf der Überexpression von FLT3-ITD in der Zelle beruht. Hierfür konnte von Koch und Kollegen gezeigt werden, dass vermutlich aufgrund überlasteter Transportwege zur Zelloberfläche bereits die Überexpression von Wildtyp-FLT3 zu einer erhöhten intrazellulären Lokalisation von FLT3 führt.¹¹¹

Die Detektion von viererlei Strukturen in einem Frequenzbereich von 405 nm bis 633 nm bringt fast zwangsläufig eine Überschneidung der Absorptionsspektren der einzelnen Fluoreszenz-Farbstoffe mit sich. Die Verwendung eines alternativen sekundären Antikörpers zur Darstellung der PDI (z.B. 514 nm) könnte eine Überlappung der Kanäle genauso reduzieren, wie das Ausblenden des Kanals für GFP. Allerdings war es für die durchgeführten Experimente gewollt, GFP in den Zellen darzustellen, um den Transduktionserfolg verschiedener Zellen einer Population zu vergleichen. Es war eine deutliche Varianz des exprimierten GFP zu erkennen (Abbildung 21). Da bei der Transduktion ein Vielfaches an *transducing units* pro Zelle verwendet wurde, war eine Aufnahme von mehreren Vektoren pro Zelle zu erwarten. Die Verteilung der aufgenommenen Vektoren ist am ehesten durch eine Gaußsche-Glockenkurve zu beschreiben, deren Maximum je nach MOI variiert. Um ein gleiches Expressionslevel einer gesamten Population zu gewährleisten, könnten die Zellen nach erfolgreicher Transduktion beispielsweise mit dem FACS Aria II einzeln sortiert und anschließend einzeln kultiviert werden, sodass sämtliche Zellen als Klone einer einzelnen transduzierten Zelle hervorgingen.

Nach Durchführung der Immunfluoreszenz-Experimente zeigte sich jedoch, dass sich Suspensionszellen für subzelluläre Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz nicht besonders eignen, da nach der Zentrifugation der Zellen der Zellkern dominierte und nur wenig Cytoplasma zu erkennen war. Auch quantitative Bestimmungen von FLT3-ITD sind mit dieser Art der Immunfluoreszenz nicht möglich. Die *Cytospins* sollten in Zukunft deshalb mit einer Zelllinie durchgeführt werden, die sich für Lokalisationsstudien eignet. In anderen Publikationen wurde hierfür beispielsweise die Zelllinie Cos-7 verwendet.^{52, 111}

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen zur Lokalisation von FLT3 nur Hinweise auf ein vermehrtes intrazelluläres Vorkommen von FLT3-ITD und FLT3-ITD F691L im Vergleich zum FLT3-Wildtyp in pMy⁺. Die beiden mutierten FLT3 Moleküle könnten ihrerseits noch einmal unterschiedlich lokalisiert sein. Dies zeigte sich unter anderem sowohl durch eine verstärkte Expression der FLT3_{130kDa}-Isoform, als auch durch die Immunfluoreszenz-Aufnahmen des konfokalen Mikroskops.

6.3. Analyse ausgewählter Effektoren von FLT3

Verschiedene Publikationen zeigen, dass sich die Signalwege von FLT3 und FLT3-ITD unterscheiden. Die Stimulation von physiologischem Wildtyp-FLT3 durch den FLT3-Liganden löst die Signalkaskaden von PI3K und MAPK aus.¹¹² FLT3-ITD hingegen aktiviert über intrazelluläres FLT3 zusätzlich STAT5.⁵² Anhand der durchgeführten *Western Blots* wurde weiterhin FLT3-ITD von FLT3-ITD mit der zusätzlichen Mutation F691L unterschieden.

Abbildung 22 zeigt deutliche Unterschiede der Phosphorylierung (und damit der Aktivierung) von ERK. FLT3-ITD⁺ weisen ein sichtbar stärkeres Signal von phosphoryliertem ERK auf, während F691L⁺ nur etwa 20% dieser Expression erreicht. Sollte sich die massive Phosphorylierung von ERK in FLT3-ITD⁺ aufgrund der Überexpression von FLT3 in den Zellen einstellen, so wäre demnach eine verstärkte Expression von phosphoryliertem ERK in F691L⁺ zu erwarten. Die unterschiedliche Expression des phosphorylierten ERK konnte in mehreren *Western Blots* verifiziert werden, jedoch stammten alle Proben aus demselben Lysat, sodass ein Artefakt durch

die Zellyse oder die Transduktion nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Da sich später in den Untersuchungen der Massenspektrometrie jedoch keine signifikanten Regulierungen für phosphoryliertes ERK zeigte, wurde diese Beobachtung im Rahmen der Dissertation nicht weiter untersucht.

Abbildung 23 bildet auch für STAT5 einen unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus und eine erhöhte Gesamtexpression in F691L⁺ ab. Diese ist deutlich stärker ausgeprägt als in pMy⁺ und FLT3-ITD⁺. Eine erhöhte Aktivität und eine verstärkte Expression von STAT5 der beiden Populationen waren aufgrund der Expression von FLT3-ITD im Vergleich zu pMy⁺ entsprechend der Literatur zu erwarten.⁵² Warum sich diese jedoch in FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ unterscheidet ist mithilfe der Literatur nicht zu belegen. Vermutlich lässt sich dieser Effekt durch das verstärkte Vorkommen der immaturren 130 kDa-schweren FLT3-ITD-Isoform in F691L⁺ erklären (Abbildung 17).

Zur Beurteilung der Aktivität von SYK fehlt die Analyse eines *Western Blots* unter Verwendung eines Antikörpers gegen phosphoryliertes SYK. Der verwendete Antikörper lieferte im durchgeführten *Western Blot* keine zufriedenstellende spezifische Bindung an SYK, durch den die Aktivierung von SYK gezeigt hätte werden können. Abbildung 24 beschränkt sich daher auf das Expressionslevel des gesamten SYK der Zellen. Die Abbildung zeigt jedoch, dass es keine (unterschiedliche) Induktion von SYK durch die transduzierten Vektoren gibt.

Zur Überprüfung der Signalwege von FLT3-ITD an der Zelloberfläche hätte weiterhin die Detektion von PI3K oder weiterer Proteine dieser Signalkaskade mittels *Western Blot* erfolgen können. Die abschließend durchgeführten Experimente zum Phosphoproteom zeigten jedoch in den durchgeführten Auswertungen keine Unterschiede.

6.4. Untersuchung des Einflusses ausgewählter Kinasen auf die Proliferation von pMy⁺, FLT3-ITD⁺, F691L⁺ und D835V⁺

Das in Abbildung 25 abgebildete Ansprechen der Ba/F3- und 32D-Zellen bei Zugabe des FLT3-Inhibitors AC220 (Quizartinib) ist in beiden Zelllinien annähernd identisch. Die Hemmung von FLT3-ITD⁺ trat, wie in der Literatur beschrieben, bereits in sehr

niedrigen Dosen ein ($IC_{50} = 1,2 \text{ nmol/l}$). Die benötigte Hemmkonzentration von F691L⁺ und D835V⁺ zeigte sich wie zu erwarten viel höher. Für F691L⁺ betrug diese jeweils über 100 nmol/l und auch für D835V ist diese Größenordnung in der Literatur angegeben.^{113, 114}

Bei allen durchgeführten *in-vitro* XTT-Assays wurde bei pMy⁺ dem Medium zusätzlich Interleukin-3 zugefügt. Andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die AC220-Sensibilität für FLT3-ITD-exprimierende Ba/F3-Zellen (ohne zusätzliche Punktmutationen) verloren geht, sofern sie mit IL-3 kultiviert werden (bisher nicht veröffentlicht). Es ist möglich, dass dieser Effekt auf dem Vorkommen des zusätzlichen Wildtyps von FLT3 in den Ba/F3-Zellen (siehe Kapitel 6.2. Lokalisation von FLT3-ITD in Ba/F3-Zellen) beruht. Dies ließe sich durch das Verwenden einer FLT3-Wildtyp-freien Zelllinie bestätigen.

Trotz anfänglicher Hoffnung bezüglich eines Effektes der Hemmung der Tyrosinkinase SYK in den Populationen FLT3-ITD⁺, F691L⁺ und D835V⁺ durch R406 (Abbildung 26) scheint sich dieses Verhalten nach Durchführung der *Proliferationsassays* mit den SYK-Inhibitoren Bay 61-3606 und PRT062607 (Abbildung 27) als *off-target*-Phänomen von R406 darzustellen. Aufgrund der geringen Spezifität von R406 beruht dessen Wirkung auf die untersuchten Zellen vermutlich auf der Hemmung von FLT3 und ist als solcher Effekt bereits in der Literatur beschrieben.¹¹⁵ Dennoch zeigt das Experiment, dass in Zellpopulationen mit mutiertem FLT3 im Vergleich zu Wildtyp-FLT3-exprimierenden pMy⁺ bereits in geringeren Wirkstoffkonzentrationen eine komplette Zellproliferationshemmung ausgelöst wird. Die Verwendung von R406 bei FLT3-ITD-Mutationen, insbesondere bei zusätzlichen Veränderungen von SYK, stellt demnach eine zumindest denkbare Alternative dar.

Ohne dies mit Kristallisationsdaten belegen zu können, ist davon auszugehen, dass R406 am FLT3-Rezeptor wie ein Typ I-Tyrosinkinase-Inhibitor agiert, da sich die Hemmkonzentrationen von R406 bei den beiden Resistenzmutanten F691L⁺ und D835V⁺ im Vergleich zu FLT3-ITD⁺ nicht unterscheiden.

Die Unterschiede zwischen pMy⁺ und FLT3-ITD⁺ bzw. F691L⁺ bei Verwendung der anderen beiden SYK-Inhibitoren (Bay 61-3606 und PRT062607) waren zu gering, als

dass der von Puissant und Kollegen beschriebene Effekt der effektiveren Hemmung von SYK in FLT3-ITD- im Vergleich zu FLT3-WT-exprimierenden Zellen nachgewiesen hätte werden können.⁹⁴ Weiterhin handelt es sich bei den verwendeten Inhibitoren um zwei sehr selektive SYK-Inhibitoren: Die IC₅₀ von SYK bei Verwendung PRT062607 wird mit 1-2 nmol/l und die von Bay 61-3606 mit 7,5 nmol/l angegeben. Da ein Effekt im durchgeführten XTT-Assay jedoch erst bei sehr viel höheren Konzentrationen eintrat, ist dieser vermutlich durch die Inhibition anderer Proteine zu erklären. In der Literatur finden sich Publikationen, die eine Inhibition anderer Proteine, beispielsweise FGR (PRT062607) oder LYN (Bay 61-3606) aufzeigen.^{116, 117}

Die Verwendung der weiteren Kinase-Inhibitoren bewirkte entweder keine selektive Hemmung von FLT3-ITD-mutierten Zellen (für Ibrutinib: Abbildung 28) oder gar keine Hemmung (für PP1: Abbildung 29 und für PP2: Abbildung 30). Es finden sich in der Literatur jedoch Publikationen, die eine erhöhte Sensitivität von FLT3-ITD-exprimierenden AML-Patientenzellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen gegenüber Ibrutinib belegen.¹¹⁸ Wodurch das von der Literatur abweichende Ergebnis erzielt worden ist, kann nicht geklärt werden. Da das XTT-Experiment mit Ibrutinib jedoch nur einmalig durchgeführt wurde, ist das erzielte Ergebnis möglicherweise nicht repräsentativ.

Zusammenfassend ließen sich durch die Verwendung der Kinase-Inhibitoren keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Sensitivität bei FLT3-ITD⁺, F691L⁺ und D835V⁺ feststellen. Allerdings gelang mit dem SYK-Inhibitor R406 schon in niedrigen Dosen eine selektive Suppression der Zellproliferation aller Zellen mit mutiertem FLT3-ITD-Rezeptor.

6.5. Vergleich des Phosphorylierungsstatus von pMy⁺, FLT3-ITD⁺ und F691L⁺

Die Methode der Massenspektrometrie bot die Möglichkeit das gesamte Phosphoproteom zu untersuchen und nicht nur einzelne Zielstrukturen zu analysieren. Die hier regulierten Phosphoproteine lassen sich mit einer anderen Methode

(beispielsweise *Western Blot*) verifizieren und es könnte der Effekt von Kinase-Inhibitoren auf die Zellproliferation untersucht werden.

Zur Validierung der erzielten massenspektrometrischen Daten wurden Vergleiche der Rohdaten mit bereits in der Literatur publizierten Phosphoproteomen von FLT3-ITD-exprimierenden Zellen angefertigt. Knapp 43% der von Choudhary und Kollegen detektierten, phosphorylierten Proteine in FLT3-ITD-exprimierenden 32D-Zellen finden sich mit derselben Phosphorylierung in den hier ermittelten Daten von Ba/F3-Zellen wieder.⁵² Ein Vergleich der Tyrosin-Phosphorylierung fällt noch höher aus: Mehr als die Hälfte (57,3%) aller in den Experimenten der Tyrosin-Phosphorylierung detektierten Proteine und deren jeweilige Seitenkette stimmen mit den ermittelten Daten einer Publikation zu den Signalwegen von FLT3 von Zhang und Kollegen der *Havard Medical School* überein.¹¹⁹

Die Aufarbeitung der massenspektrometrisch ermittelten Daten legt eine Vielzahl von konkordant regulierten, phosphorylierten Proteinen dar. Das Experiment der Tyrosin-Phosphorylierung (Abbildung 33) weist einen hohen Anteil an regulierten Proteinen auf, die sich von FLT3-Wildtyp-exprimierenden pMy⁺ unterscheiden, jedoch nicht in den beiden Populationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺. Dies spricht dafür, dass weite Teile der aktivierten Signalwege bei mutiertem FLT-ITD und FLT-ITD mit der Resistenzmutation F691L übereinstimmen.

Die Betrachtung aller massenspektrometrischen Experimente führt jedoch zu dem Schluss, dass es sehr wohl Unterschiede in der Aktivierung der nachgeschalteten, aktivierten Signalwege von FLT3-ITD und FLT3-ITD mit F691L gibt. Sowohl die Population FLT3-ITD⁺ als auch die Population F691L⁺ scheint eine eigene Phosphorylierungssignatur zu besitzen (siehe Abbildungen 32 und 33). Durch die unterschiedliche Phosphorylierung solch vieler Proteine ist davon auszugehen, dass es sich um die Aktivierung von unterschiedlichen Signalwegen handelt. Das Experiment mit drei Populationen des globalen Phosphoproteoms zeigt ein Spearman R von 0,64. Die detektierten Daten mit den entsprechend nachgeschalteten Signalwegen unterscheiden sich im Vergleich zur Tyrosin-Phosphorylierung (Spearman R=0,93) stärker voneinander.

In den Versuchen zum globalen Phosphoproteom wurde das *40S ribosomal protein S6* (RPS6) ermittelt. Das Protein zeigte in F691L⁺ eine signifikant stärkere Phosphorylierung von Serin an Position 235. Diese Phosphorylierung ist in der Literatur vielfach beschrieben, da sie zur Karzinogenese beiträgt und die Wirkung von DNA-Schäden auf die Zellen mildert.¹²⁰ Auch in der AML-Forschung wurde diese Phosphorylierung bereits beschrieben.¹²¹ RPS6 ist ein bekanntes Substrat der PIM-Kinasen und deren Inhibition geht mit einer geringeren Phosphorylierung von S235 von RPS6 einher.¹²² Wie bereits in der Einleitung beschrieben, aktiviert intrazelluläres FLT3-ITD STAT5, welches zur verstärkten Transkription der PIM-Kinasen führt.⁵² Das Experiment zum globalen Phosphoproteom zeigt nun einen nachgeschalteten Effekt der vermehrten STAT5-Aktivierung in F691L⁺ (Abbildung 23). Vermutlich bewirkt die stärkere Aktivierung von STAT5 die Transkription der PIM-Kinasen, die eine verstärkte Phosphorylierung von S235 in RPS6 auslösen. Eine erhöhte PIM-Expression führt zu einem Funktionsverlust von Tyrosinkinase-Inhibitoren.⁷¹ Inwiefern dies für F691L⁺ tatsächlich einen Überlebensvorteil im Vergleich zu FLT3-ITD⁺ bietet, kann jedoch mit den durchgeführten Experimenten nicht dargestellt werden und sollte in Zukunft näher untersucht werden.

Neben den sieben in der Massenspektrometrie festgestellten Proteinen, für die ein Effekt durch Phosphorylierung der Seitenkette beschrieben ist, gab es in den erstellten Proteinlisten auch weitere regulierte Seitenketten, die bereits in der AML beschrieben wurden. Ein Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung von Tyrosin an Position 264 von *SLAM family member 5* in der Population von FLT3-ITD⁺. Diese Phosphorylierung wurde bereits (im zusätzlichen Material anderer Publikationen) in FLT3-ITD-exprimierenden Zellen aufgeführt.⁵² Ein funktioneller Effekt dieser Phosphorylierung ist in der Literatur allerdings noch nicht beschrieben.

In F691L⁺ zeigte sich die Phosphorylierung des *tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6* (PTPN6), auch als SHP-1 bekannt, herauf-reguliert. Die Phosphorylierung von Tyrosin an der Position 536 bewirkt eine Aktivierung von SHP-1.¹²³ Aktiviertes SHP-1 reguliert in hämatopoetischen Zellen die an Zytokin-Rezeptoren-, Rezeptor-Tyrosinkinasen- und an weitere Oberflächenrezeptorengekoppelten Signalwege herunter.¹²⁴ Für FLT3-ITD-exprimierende Zellen sind niedrige

SHP-1 Expressionen beschrieben: auf exogene Wachstumsfaktoren reagieren diese Zellen mit Hyperproliferation und erhalten einen Wachstumsvorteil.¹²⁵

Weiterhin wurde bei den Versuchen der Tyrosin-Phosphorylierung das phosphorylierte Protein *heat shock protein HSP 90-beta* (HSP90) in F691L⁺ hoch-reguliert entdeckt. In einem anderen Forschungsprojekt unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass im Labor geringe Wirkspiegel von HSP90-Inhibitoren Burkitt-Lymphom-Zellen in die Apoptose führen, ohne dass physiologische B-Zellen zugrunde gehen. Die Inhibition von HSP90 reduziert die Stabilität der assoziierten *Client*-Kinasen und beeinflusst dadurch die Signalweiterleitung.⁹² FLT3-ITD ist selbst eine solche Client-Kinase und es wurde bereits in der Vergangenheit eine Wirkung von HSP90-Inhibitoren gegen Tyrosinkinase-Inhibitor-resistente Mutanten von FLT3-ITD beschrieben. Es ist zu erwarten, dass der Einsatz von HSP90-Inhibitoren eine selektive Wirkung auf FLT3-ITD-positive Zellen besitzt, sich die Populationen FLT3-ITD⁺ und F691L⁺ hinsichtlich ihres Überlebens jedoch nicht unterscheiden würden.¹²⁶ Auch ist von Yao und Kollegen bereits eine synergistische Wirkung von FLT3-Inhibitoren und HSP90-Inhibitoren bei FLT3-ITD-positiven Zellen beschrieben.¹²⁷

Auffällig zeigt sich in den Versuchen der Tyrosin-Phosphorylierung jedoch auch, dass es in beiden Experimenten eine Verschiebung der detektierten Proteine in Richtung der Population F691L⁺ gegeben hat. Insgesamt wurden mehr Proteine und Aminosäuren der Fraktion F691L⁺ als FLT3-ITD⁺ detektiert und analysiert. Vermutlich wurde die Proteinkonzentration von lysierten F691L⁺ falsch niedrig bestimmt wodurch ein falsches Mischungsverhältnis resultiert.

7. Zusammenfassung

Aufgrund der starken Heterogenität und Komplexität der akuten myeloischen Leukämie ist diese bis heute nicht zufriedenstellend zu behandeln. Die bestmögliche Therapie wird mittlerweile zunehmend auf die Erkrankung des Einzelnen angepasst. Vermehrt gewinnen Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Therapie an Bedeutung. Diese Inhibitoren hemmen Proteine auf zellulärer Ebene.

Bei etwa 30% der AML-Patienten lassen sich Mutationen des FLT3-Gens nachweisen. Das Gen kodiert für die *fms like tyrosine kinase 3*, eine Rezeptor-Tyrosinkinase an der Zelloberfläche von unreifen Blutzellen des Knochenmarks. Durch Mutationen des FLT3-Gens erhalten diese Zellen einen Proliferationsvorteil gegenüber den physiologischen Blutzellen.

Am häufigsten kommt es zu *in frame*-Insertionen des FLT3-Gens, vor allem im Bereich der juxtamembranen Domäne: sogenannte interne Tandemduplikationen (ITD). Weiterhin kommen zu einem geringeren Teil Punktmutationen einzelner Codons, zum Beispiel im Bereich des *activation loops* oder im Bereich des *gatekeepers* vor. Durch das Auftreten der Punktmutationen, die entweder bereits zum Zeitpunkt der Diagnose vorliegen oder erst während einer Therapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor entstehen können, verändert sich das Bindungsverhalten vieler solcher gegen FLT3-gerichteten Inhibitoren. Durch Letzteres kann ein mögliches Therapieversagen beispielsweise während der Behandlung mit AC220 (Quizartinib) erklärt werden (Smith et al.⁶⁷).

In der vorliegenden Dissertationsschrift sind Unterschiede der Signalwege zwischen FLT3-ITD und FLT3-ITD mit der zusätzlichen *gatekeeper*-Punktmutation F691L herausgearbeitet. Dafür wurden die beiden FLT3-Mutationen in den Vektor pMy-IRES-GFP eingebracht und retroviral in Ba/F3-Zellen transduziert. Nach Überprüfung der Expression von FLT3-ITD und dem Wachstumsverhalten unter Zugabe von AC220 (Quizartinib), wurden verschiedene Signalkaskaden von FLT3 mittels *Western Blot* untersucht. Hierbei zeigten sich sowohl Unterschiede für die Expression von phosphoryliertem ERK als auch von phosphoryliertem STAT5.

Durch verschieden starke Expressionen der FLT3_{130kDa}- und FLT3_{160kDa}-Varianten wurde eine unterschiedliche Lokalisation von FLT3-ITD in Zellen mit und ohne die Mutation F691L postuliert. Allerdings ließ sich diese experimentell mittels Immunfluoreszenz nicht belegen, da die Methode für die verwendeten Suspensionszellen nicht ausreichend geeignet war.

In den durchgeführten Versuchen zum Wachstumsverhalten der Zellen bei der Verwendung von Kinaseinhibitoren konnte bei der Verwendung des SYK-Inhibitors R406 eine dosisabhängige Proliferationshemmung der FLT3-ITD-mutierten Ba/F3- und 32D-Zellen beobachtet werden. Die Hemmung von FLT3 durch R406 wurde in der Literatur bereits beschrieben (Brasemann et al.¹¹⁵).

Die abschließenden Experimente der Massenspektrometrie mit SILAC-Markierung lassen mit der Detektion von mehreren hundert signifikant regulierten phosphorylierten Proteinen in den beiden FLT3-ITD-exprimierenden Populationen auf die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege schließen. Durch das Vergleichen einzelner Telexperimente ergaben sich Proteine, deren Phosphorylierung mehrfach in die gleiche Richtung reguliert war. Für Zellen, die zusätzlich zur ITD-Mutation die Mutation F691L besaßen, konnten insgesamt sieben hoch-regulierte, phosphorylierte Proteine ermittelt werden, bei denen ein zellulärer Effekt durch die Phosphorylierung der entsprechenden Aminosäurereste in der Literatur beschrieben ist.

Das im Western Blot nachgewiesene, in Zellen mit der Mutation F691L stärker phosphorylierte STAT5 ist aller Voraussicht nach Ursache der nachgewiesenen verstärkten Phosphorylierung von RPS6 im Experiment der globalen Phosphorylierung. Die PIM-Kinasen als Substrate einer STAT5-induzierten Transkription phosphorylieren RPS6 an Serin 235. Dies führt seinerseits zu einer verstärkten Translation von mRNA weiterer Gene. Die genauen Zusammenhänge der hier ermittelten Unterschiede müssen jedoch weiter untersucht werden.

In Zukunft könnte zudem die Untersuchung der beiden Proteine SHP-1 oder HSP90 weitere Aufschlüsse über die unterschiedlichen Signalwege geben. Für beide Proteine wurden Phosphorylierungen detektiert, die in den untersuchten Zellen mit FLT3-ITD bzw. der zusätzlichen Punktmutation F691L unterschiedlich reguliert sind.

8. Abstract

Acute myeloid leukemia is characterized by a distinct heterogeneity and complexity. Therefore, no coherent satisfying treatment exists. Recently, the respective therapy is mainly adjusted to the individual patient and tyrosine kinase inhibitors (TKI) become more important. These inhibitors block specific proteins on a cellular level.

About 30% of all adult AML patients exhibit mutations of the FLT3-gene. The gene encodes the fms like tyrosine kinase 3, a cell surface receptor tyrosine kinase of immature blood cells in the bone marrow. Through mutations of the FLT3 gene, these cells gain an advantage in proliferation compared to physiologic blood cells.

The most common mutations of the FLT3 gene are in-frame insertions, mostly located in the part that encodes the juxtamembrane domain. Those mutations are known as internal tandem duplications (ITD). To a lesser extent, there are point mutations of several codons e.g., in the area of the activation loop or localized at the gatekeeper. These point mutations change the binding capacity of FLT3 targeting TKIs and are present at the time of AML diagnosis or can develop during treatment with TKIs. As a consequence, the respective cells may not respond to treatment with e.g. AC220 (Quizartinib) anymore resulting in a therapeutic failure (Smith et al.⁶⁷).

The objective of this work was to investigate the signaling pathways of FLT3-ITD and FLT3-ITD plus the additional gatekeeper point mutation F691L describing similarities and differences. Therefore, these two mutations were introduced into the vector pMy-IRES-GFP and retroviral transduced into murine Ba/F3 cells. Subsequently, the expression was checked for FLT3 and the proliferation of the transduced cells during treatment with AC220 was observed. Afterwards, several signaling pathways were analyzed by Western blotting. In these experiments, differences in expression of phosphorylated ERK and phosphorylated STAT5 could be shown for the mutations of interest.

An observed difference in expression of FLT3_{130kDa} and FLT3_{160kDa} variants led to the conclusion of varying FLT3-ITD localizations depending on the additional point mutation F691L. However, this hypothesis could not be verified by the performed

immunofluorescence experiments since this method was not suitable for the used suspension cells.

In the proliferation assay, the SYK inhibitor R406 has shown to be a potent inhibitor of FLT3-ITD mutated BA/F3 and 32D cells whereas, proliferations of FLT3- wildtype cells could only be inhibited at much higher R406 concentrations. This is in contrast to Braselmann, who showed previously an inhibitory effect for R406 on FLT3. (Braselmann et al.¹¹⁵).

The concluding mass spectrometry experiments with SILAC-labeled cells showed several hundred significantly regulated phosphorylated proteins in both FLT3-ITD expressing populations implying an activation of different signaling pathways. By comparing parts of these experiments, several proteins could be identified whose changes in phosphorylation went multiple times into the same direction. For the population with both mutations (FLT3-ITD and F691L) seven upregulated, phosphorylated proteins have been detected for which a phosphorylation of the specific amino acid residue has been described in the literature already.

In Western blots, STAT5 was more phosphorylated when cells expressed FLT3 carrying the F691L in addition to the ITD mutation. This could explain why RPS6 was detected to be stronger phosphorylated in the global phosphorylation experiment. PIM kinases as target proteins of a STAT5 induced transcription can phosphorylate serine 235 of RPS6 resulting in an enhanced transcription of mRNA. The exact impact has to be examined in future experiments.

The two proteins SHP-1 and HSP90 represent further targets for a better understanding of the differently activated pathways. Differential phosphorylation of both proteins has been detected in FLT3-ITD and in FLT3-ITD plus the TKD mutation F691L expressing cells.

9. Literaturverzeichnis

- 1 Brandts C, Kim A, Serve H. *Die Akute Myeloische Leukämie (AML) des Erwachsenen: Wissenswerte Informationen rund um die AML für Patienten und Angehörige*. 4 ed. Frankfurt; 2017.
- 2 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
- 3 Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-365.
- 4 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-458.
- 5 Chen SJ, Shen Y, Chen Z. A panoramic view of acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(6):586-587.
- 6 Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-2074.
- 7 Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-4187.
- 8 Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*. 1951;4(1):39-59.
- 9 Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt A-S, Hagberg O, Höglund M. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 2012;119(17):3890-3899.
- 10 Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447.
- 11 Döhner K, Thiede C, Jahn N, et al. Prognostic and predictive impact of npm1/flt3-itd genotypes as defined by 2017 european leukemianet risk categorization from aml patients treated within the international ratify study. *HemaSphere*. 2019;3:81-82. doi:10.1097/01.HS9.0000559252.96061.3e
- 12 Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood*. 2012;120(15):2963-2972.
- 13 Harada Y, Nagata Y, Kihara R, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leu Res*. 2018;66:20-27.

- 14 Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control*. 2008;19(4):379-390.
- 15 De Lima M, Strom SS, Keating M, et al. Implications of potential cure in acute myelogenous leukemia: development of subsequent cancer and return to work. *Blood*. 1997;90(12):4719-4724.
- 16 Teepen JC, Curtis RE, Dores GM, et al. Risk of subsequent myeloid neoplasms after radiotherapy treatment for a solid cancer among adults in the United States, 2000-2014. *Leukemia*. 2018;32(12):2580-2589.
- 17 Lange BJ, Kobrinsky N, Barnard DR, et al. Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. *Blood*. 1998;91(2):608-615.
- 18 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. *Akute Myeloische Leukämie (AML): Leitlinie*. [Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie]; 2019.
- 19 Bertoli S, Bérard E, Huguet F et al. Time from diagnosis to intensive chemotherapy initiation does not adversely impact the outcome of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121:2618-2626.
- 20 Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-464.
- 21 Amadori S, Suci S, Selleslag D, et al. Gemtuzumab Ozogamicin Versus Best Supportive Care in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Unsuitable for Intensive Chemotherapy: Results of the Randomized Phase III EORTC-GIMEMA AML-19 Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(9):972-979.
- 22 Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(26):2684-2692.
- 23 Burchert A, Bug G, Finke J et al.: Sorafenib As Maintenance Therapy Post Allogeneic Stem Cell Transplantation for FLT3-ITD Positive AML: Results from the Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicentre Sormain Trial. *Blood*. 2018. 132:661 (Abstract). doi:10.1182/blood-2018-99-112614
- 24 Percival MEM, Tao L, Medeiros BC, Clarke CA. Improvements in the early death rate among 9380 patients with acute myeloid leukemia after initial therapy: A SEER database analysis. *Cancer*. 2015;121(12):2004-2012.
- 25 Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):760-769.
- 26 Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2018;392(10147):593-606.
- 27 Kavanagh S, Murphy T, Law A, et al. Emerging therapies for acute myeloid leukemia: translating biology into the clinic. *JCI Insight*. 2017;2(18). doi:10.1172/jci.insight.95679.

- 28 Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-2221.
- 29 Wouters BJ, Delwel R. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):42-52.
- 30 Mohr S, Doebele C, Comoglio F, et al. Hoxa9 and Meis1 Cooperatively Induce Addiction to Syk Signaling by Suppressing miR-146a in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2017;31(4):549-562.e11. doi:10.1016/j.ccell.2017.03.001.
- 31 Gorcea CM, Burthem J, Tholouli E. ASP2215 in the treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia with FLT3 mutation: background and design of the ADMIRAL trial. *Future Oncol*. 2018;14(20):1995-2004.
- 32 DiNardo CD, Stein EM, Botton S de, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*. 2018;378(25):2386-2398.
- 33 Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(6):722-731.
- 34 DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2019;133(1):7-17.
- 35 Norsworthy KJ, By K, Subramaniam S, et al. FDA Approval Summary: Glasdegib for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2019;25(20):6021-6025.
- 36 Carow CE, Kim E, Hawkins AL, et al. Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q12--q13. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;70(3-4):255-257.
- 37 Rosnet O, Marchetto S, de Lapeyriere O, Birnbaum D. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene*. 1991;6(9):1641-1650.
- 38 Small D, Levenstein M, Kim E, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):459-463.
- 39 Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-1542.
- 40 Agnès F, Shamon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. 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*. 1994;145(2):283-288.
- 41 Kandeel EZ, El Sayed G, Elsharkawy N, et al. Impact of FLT3 Receptor (CD135) Detection by Flow Cytometry on Clinical Outcome of Adult Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(8):541-547.
- 42 Zhang S, Fukuda S, Lee Y, et al. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med*. 2000;192(5):719-728.

- 43 Nogami A, Oshikawa G, Okada K, et al. FLT3-ITD confers resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors by protecting the mTOR/4EBP1/Mcl-1 pathway through STAT5 activation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(11):9189-9205.
- 44 Liu K, Victora GD, Schwickert TA, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009;324(5925):392-397.
- 45 Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 2004;13(2):169-178.
- 46 Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(9):650-665.
- 47 Schmidt-Arras DE, Böhmer A, Markova B, Choudhary C, Serve H, Böhmer FD. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*. 2005;25(9):3690-3703.
- 48 Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:1019-1049.
- 49 Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97(1):89-94.
- 50 Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. 2002;21(16):2555-2563.
- 51 Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*. 2000;96(12):3907-3914.
- 52 Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell*. 2009;36(2):326-339.
- 53 Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*. 1997;11(10):1605-1609.
- 54 Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2001;73(4):429-437.
- 55 Chao Q, Sprankle KG, Grotzfeld RM, et al. Identification of N-(5-tert-butylisoxazol-3-yl)-N'-(4-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)imidazo[2,1-b]1,3-benzothiazol-2-ylphenyl)urea dihydrochloride (AC220), a uniquely potent, selective, and efficacious FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitor. *J Med Chem*. 2009;52(23):7808-7816.
- 56 Röllig C, Serve H, Hüttmann A, et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1691-1699.
- 57 Larrosa-Garcia M, Baer MR. FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(6):991-1001.

- 58 Cortes J, Perl AE, Döhner H, et al. Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(7):889-903.
- 59 Cortes JE, Tallman MS, Schiller GJ, et al. Phase 2b study of 2 dosing regimens of quizartinib monotherapy in FLT3-ITD-mutated, relapsed or refractory AML. *Blood*. 2018;132(6):598-607.
- 60 Perl AE, Altman JK, Cortes J, et al. Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(8):1061-1075.
- 61 Thom C. Preliminary data on ASP2215: tolerability and efficacy in acute myeloid leukemia patients. *Future Oncol*. 2015;11(18):2499-2501.
- 62 Smith CC, Lin K, Stecula A, Sali A, Shah NP. FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors. *Leukemia*. 2015;29(12):2390-2392.
- 63 Kindler T, Lipka DB, Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood*. 2010;116(24):5089-5102.
- 64 Cortes JE, Khaled S, Martinelli G, et al. Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(7):984-997.
- 65 Alvarado Y, Kantarjian HM, Luthra R, et al. Treatment with FLT3 inhibitor in patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia is associated with development of secondary FLT3-tyrosine kinase domain mutations. *Cancer*. 2014;120(14):2142-2149.
- 66 Cortes JE, Kantarjian H, Foran JM, et al. Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. *J Clin Oncol*. 2013;31(29):3681-3687.
- 67 Smith CC, Wang Q, Chin CS, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2012;485(7397):260-263.
- 68 Wodicka LM, Ciceri P, Davis MI, et al. Activation state-dependent binding of small molecule kinase inhibitors: structural insights from biochemistry. *Chem Biol*. 2010;17(11):1241-1249.
- 69 Dayal N, Opoku-Temeng C, Hernandez DE, et al. Dual FLT3/TOPK inhibitor with activity against FLT3-ITD secondary mutations potentially inhibits acute myeloid leukemia cell lines. *Future Med Chem*. 2018;10(7):823-835.
- 70 McMahon CM, Ferng T, Canaani J, et al. Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. 2019;9(8):1050-1063.
- 71 Green AS, Maciel TT, Hospital M-A, et al. Pim kinases modulate resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Sci Adv*. 2015;1(8):e1500221. doi:10.1126/sciadv.1500221.

- 72 Natarajan K, Xie Y, Burcu M, Linn DE, Qiu Y, Baer MR. Pim-1 kinase phosphorylates and stabilizes 130 kDa FLT3 and promotes aberrant STAT5 signaling in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74653. doi:10.1371/journal.pone.0074653.
- 73 Doebele C, Kovar J, Yepes D, et al. Phosphoproteomic Profiling of the Signaling Output of FLT3-ITD and Its AC220-Resistant Mutants Reveals Profound Signaling Differences and Differential Responsiveness to Inhibition of Downstream Kinases. *Blood*. 2015;126(23):2453. doi:10.1182/blood.V126.23.2453.2453.
- 74 Ji Y, Kovar J, Lohmeyer J, et al. Phosphoproteomic Profiling of the Signaling Output of FLT3-ITD and an AC220-Resistant Mutant in Human Acute Myeloid Leukaemia. *J Am Soc Mass Spectrom*. [MP693]. 2018;29(Suppl 1):95. doi:10.1007/s13361-018-1971-5.
- 75 Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1007-1014.
- 76 Brandts CH, Sargin B, Rode M, et al. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res*. 2005;65(21):9643-9650.
- 77 Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008;26(12):1367-1372.
- 78 Mizuki M, Schwable J, Steur C, Choudhary C, Agrawal S, Sargin B, Steffen B, Matsumura I, Kanakura Y, Böhmer FD, Müller-Tidow C, Berdel WE und Serve H. *Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations*. *Blood*. 2003. 101(8):3164-3173
- 79 Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-1523.
- 80 Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-448.
- 81 Rothe G. Technische und methodische Grundlagen in der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tarnok A, Rothe G, eds. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: S. Karger; 2007:27-70.
- 82 Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 4. rev ed. Berlin: Springer Spektrum; 2014. Experimentator.
- 83 Doumas BT. Standards for total serum protein assays--a collaborative study. *Clin Chem*. 1975;21(8):1159-1166.
- 84 Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7. rev ed. Berlin: Springer Spektrum; 2016. Experimentator.
- 85 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual : Vol. 2*. 2. ed. S.l.: Cold Spring Harbor; 1989.
- 86 BioRad. *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell: Instruction Manual*. [Catalog numbers 170-3930, 170-3935, 170-3989, 170-3836].

- 87 Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(5):376-386.
- 88 Ong S-E, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*. 2006;1(6):2650-2660.
- 89 Lössner C, Warnken U, Pscherer A, Schnölzer M. Preventing arginine-to-proline conversion in a cell-line-independent manner during cell cultivation under stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) conditions. *Anal Biochem*. 2011;412(1):123-125.
- 90 Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. 2010;190(4):491-500.
- 91 Oellerich T, Oellerich MF, Engelke M, et al. β 2 integrin-derived signals induce cell survival and proliferation of AML blasts by activating a Syk/STAT signaling axis. *Blood*. 2013;121(19):3889-99.
- 92 Walter R, Pan K-T, Doebele C, et al. HSP90 promotes Burkitt lymphoma cell survival by maintaining tonic B-cell receptor signaling. *Blood*. 2017;129(5):598-608.
- 93 Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J*. 1999;18(17):4754-4765.
- 94 Puissant A, Fenouille N, Alexe G, et al. SYK is a critical regulator of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2014;25(2):226-242.
- 95 Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev*. 2012;6(1):e8. doi:10.4081/oncol.2012.e8.
- 96 Abrams CS, Zhao W, Belmonte E, Brass LF. Protein kinase C regulates pleckstrin by phosphorylation of sites adjacent to the N-terminal pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23317-23321.
- 97 Roux PP, Shahbazian D, Vu H, et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14056-14064.
- 98 Ren H-Y, Wang J, Yang F, et al. Cytoplasmic TRAF4 contributes to the activation of p70s6k signaling pathway in breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6(6):4080-4096.
- 99 Chaudhuri P, Rosenbaum MA, Sinharoy P, Damron DS, Birnbaumer L, Graham LM. Membrane translocation of TRPC6 channels and endothelial migration are regulated by calmodulin and PI3 kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(8):2110-2115.
- 100 Lee C-P, Huang Y-H, Lin S-F, et al. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces disassembly of the nuclear lamina to facilitate virion production. *J Virol*. 2008;82(23):11913-11926.

- 101 Tao T, Yang X, Zheng J, et al. PDZK1 inhibits the development and progression of renal cell carcinoma by suppression of SHP-1 phosphorylation. *Oncogene*. 2017;36(44):6119-6131.
- 102 Bhattacharya R, Kwon J, Wang E, Mukherjee P, Mukhopadhyay D. Src homology 2 (SH2) domain containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) dephosphorylates VEGF Receptor-2 and attenuates endothelial DNA synthesis, but not migration. *J Mol Signal*. 2008;3:8. doi:10.1186/1750-2187-3-8.
- 103 Kuga D, Ushida K, Mii S, et al. Tyrosine Phosphorylation of an Actin-Binding Protein Girdin Specifically Marks Tuft Cells in Human and Mouse Gut. *J Histochem Cytochem*. 2017;65(6):347-366.
- 104 Tiffitt KE, Bradbury KA, Wilson KL. Tyrosine phosphorylation of nuclear-membrane protein emerin by Src, Abl and other kinases. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 20):3780-3790.
- 105 Palacios R, Steinmetz M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*. 1985;41(3):727-734.
- 106 Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W. Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clin Cancer Res*. 2003;9(6):2140-2150.
- 107 Zheng R, Bailey E, Nguyen B, et al. Further activation of FLT3 mutants by FLT3 ligand. *Oncogene*. 2011;30(38):4004-4014.
- 108 Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*. 2001;61(19):7233-7239.
- 109 Li L, Bailey E, Greenblatt S, Huso D, Small D. Loss of the wild-type allele contributes to myeloid expansion and disease aggressiveness in FLT3/ITD knockin mice. *Blood*. 2011;118(18):4935-4945.
- 110 Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1699(1-2):35-44.
- 111 Koch S, Jacobi A, Ryser M, Ehninger G, Thiede C. Abnormal localization and accumulation of FLT3-ITD, a mutant receptor tyrosine kinase involved in leukemogenesis. *Cells Tissues Organs (Print)*. 2008;188(1-2):225-235.
- 112 Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *J Hematol Oncol*. 2011;4:13. doi:10.1186/1756-8722-4-13.
- 113 Clark JJ, Cools J, Curley DP, et al. Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518. *Blood*. 2004;104(9):2867-2872.
- 114 Nguyen B, Williams AB, Young DJ, et al. FLT3 activating mutations display differential sensitivity to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget*. 2017;8(7):10931-10944.

- 115 Braselmann S, Taylor V, Zhao H, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):998-1008.
- 116 Coffey G, DeGuzman F, Inagaki M, et al. Specific inhibition of spleen tyrosine kinase suppresses leukocyte immune function and inflammation in animal models of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(2):350-359.
- 117 Yamamoto N, Takeshita K, Shichijo M, et al. The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylaminonicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(3):1174-1181.
- 118 Pillinger G, Abdul-Aziz A, Zaitseva L, et al. Targeting BTK for the treatment of FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia. *Sci Rep.* 2015;5:12949. doi:10.1038/srep12949.
- 119 Zhang Y, Askenazi M, Jiang J, Luckey CJ, Griffin JD, Marto JA. A robust error model for iTRAQ quantification reveals divergent signaling between oncogenic FLT3 mutants in acute myeloid leukemia. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9(5):780-790.
- 120 Khalaileh A, Dreazen A, Khatib A, et al. Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2013;73(6):1811-1820.
- 121 Trost M, Sauvageau M, Héroult O, et al. Posttranslational regulation of self-renewal capacity: insights from proteome and phosphoproteome analyses of stem cell leukemia. *Blood.* 2012;120(8):e17-27. doi:10.1182/blood-2011-12-397844.
- 122 Yuan LL, Green AS, Bertoli S, et al. Pim kinases phosphorylate Chk1 and regulate its functions in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2014;28(2):293-301.
- 123 Mkaddem SB, Murua A, Flament H, et al. Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nat Commun.* 2017;8(1):246. doi:10.1038/s41467-017-00294-0.
- 124 Tonks NK, Neel BG. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell.* 1996;87(3):365-368.
- 125 Chen P, Levis M, Brown P, Kim KT, Allebach J, Small D. FLT3/ITD mutation signaling includes suppression of SHP-1. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5361-5369.
- 126 Yu C, Kancha RK, Duyster J. Targeting oncoprotein stability overcomes drug resistance caused by FLT3 kinase domain mutations. *PLoS ONE.* 2014;9(5):e97116. doi:10.1371/journal.pone.0097116.
- 127 Yao Q, Nishiuchi R, Kitamura T, Kersey JH. Human leukemias with mutated FLT3 kinase are synergistically sensitive to FLT3 and Hsp90 inhibitors: the key role of the STAT5 signal transduction pathway. *Leukemia.* 2005;19(9):1605-1612.

10. Danksagung

Ohne das ständige Antreiben meiner Familie und vieler weiterer Unterstützer hätte ich die Dissertation wohl erst in ferner Zukunft fertiggestellt.

11. Curriculum vitae

12. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchung FLT3-ITD-abhängiger Signalsignaturen in der akuten myeloischen Leukämie

in der Medizinischen Klinik II (Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie, Hämostaseologie, Rheumatologie, Infektiologie), Zentrum für Innere Medizin am Universitätsklinikum Frankfurt, Abteilung Hämatologie und medizinische Onkologie in der AG Oellerich unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Thomas Oellerich und Dr. phil. nat. Carmen Döbele (vormals zudem betreut durch Prof. Dr. med. Hubert Serve) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden teilweise in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- Doebele C, **Kovar J**, Yepes D, Münch S, Schnütgen F, Bohnenberger H, Köhler A, Urlaub H, Serve H, Oellerich T. Phosphoproteomic Profiling of the Signaling Output of FLT3-ITD and Its AC220-Resistant Mutants Reveals Profound Signaling Differences and Differential Responsiveness to Inhibition of Downstream Kinases. *Blood*. 126(23):2453. 2015. doi:10.1182/blood.V126.23.2453.2453.
- Ji Y, **Kovar J**, Lohmeyer J, Münch S, Schnütgen F, Köhler A, Häupl B, Urlaub H, Serve H, Oellerich T, Doebele C. Phosphoproteomic Profiling of the Signaling Output of FLT3-ITD and an AC220-Resistant Mutant in Human Acute Myeloid Leukaemia. *J Am Soc Mass Spectrom*. [MP693]. 29(Suppl 1):95. 2018. doi:10.1007/s13361-018-1971-5.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)