

Technische Universität München

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar

Molekulare Mechanismen der Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren bei Leukämien

Michael Sigl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Nikolas von Bubnoff
2. Prof. Dr. Angela Krackhardt

Die Dissertation wurde am 23.08.2016 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.05.2017
angenommen.

Inhalt

INHALT		I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		IV
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIALIEN	3
2.1	Chemikalien und biogene Substanzen	3
2.2	Molekulargewichtsmarker	5
2.3	Medien und Zusätze für die Zellkultur	5
2.4	Antikörper	6
2.5	Enzyme	7
2.6	Zelllinien	7
2.7	Bakterienstämme	7
2.8	Molekularbiologische Kitsysteme und Verbrauchsmaterialien	8
2.9	Membranen	8
2.10	DNA-Konstrukte und Vektoren	9
2.11	Oligonukleotide	9
2.11.1	Primer für Klonierungen	9
2.11.2	Primer für die Mutagenese mittels PCR	11
2.11.3	Primer für den Taqman	11
2.11.4	Oligonukleotid für die miR Klonierung	11
2.12	Standardgeräte	11
2.13	Lösungen, Puffer und Gele	13
		I

3	METHODEN	15
3.1	Gentechnische Verfahren	15
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
3.1.2	Insertionsmutagenese mittels PCR	16
3.1.3	Quantitative RT-PCR	17
3.1.4	Verdau durch Restriktionsenzyme	17
3.1.5	Dephosphorylierung	18
3.1.6	Ligation von doppelsträngigen DNA-Molekülen	18
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	19
3.1.8	DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel	20
3.1.9	Integration eines PCR-Produkts in einen Vektor	20
3.1.9.1	Ligations-abhängige Methode mit sticky ends	20
3.1.9.2	Ligations-unabhängige Methode nach dem TOPO [®] -Verfahren	21
3.1.10	RNA-Isolation	21
3.1.11	Herstellung von cDNA	22
3.1.12	Erstellung eines Vektors mit zielgenspezifischer shRNA	22
3.2	Arbeiten mit Bakterien	23
3.2.1	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	23
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	24
3.2.3	Sequenzierung	24
3.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	24
3.3.1	Kultivierung der Zelllinie Ba/F3	24
3.3.2	Kultivierung von Phoenix-E-Zellen	25
3.3.3	Tiefkühlkonservierung der Zellen	26
3.3.4	Zellzahlbestimmung	26
3.3.5	Transfektionsmethoden	27
3.3.5.1	Nukleofektion	27
3.3.5.2	Retrovirale Transfektion	28
3.3.5.2.1	Transfektion von Phoenix E mit dem retroviralen Vektor	29
3.3.5.2.2	Ernte des retroviralen Zellüberstandes	30
3.3.5.2.3	Retrovirale Infektion von Ba/F3-Zellen	30
3.3.6	Selektion transfizierter Zellen	30
3.3.6.1	Selektion durch IL-3-Entzug	31
3.3.6.2	Selektion über Resistenzmarker	31
3.3.7	Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid	31
3.4	Proteinbiochemische Methoden	32
3.4.1	Herstellung von Zelllysaten	32
3.4.2	SDS-Gelelektrophorese	33
3.4.3	Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)	34

3.4.4	Nachweis transferierter Proteine durch Immunhistochemie	34
3.4.5	Quantifizierung transferierter Proteine mittels Densitometrie	35
3.5	Biologische Untersuchungen	36
3.5.1	Messung der proliferativen Aktivität von Zellen	36
4	UNTERSUCHUNG DER KANDIDATENGENE SOCS1 UND PTPLAD2 IN EINEM MODELL DER FLT3-ITD-KINASE-UNABHÄNGIGEN RESISTENZ	37
4.1	Allgemeines zur FLT3-ITD-Mutation	37
4.1.1	Häufigkeit des Auftretens und Bedeutung	37
4.1.2	Molekulargenetischer Hintergrund	38
4.1.2.1	Die FLT3-Rezeptortyrosinkinase und ihre ITD-Mutation	38
4.1.2.2	Die Rolle von JAK2, STAT5 und SOCS1 in FLT3-ITD-positiven Zellen	41
4.1.3	FLT3-Inhibitoren bei der Behandlung der AML	43
4.2	Fragestellung	45
4.3	Ergebnisse	48
4.3.1	Validierung der Genexpressionsdaten von SOCS1 und Darstellung zugehöriger Interaktionspartner	48
4.3.2	Untersuchung des (p)JAK2-Abbaus mittels Cycloheximid	49
4.3.3	Validierung der Genexpressionsdaten von PTPLAD2 und PTPLAD2-Überexpression	52
4.3.3.1	Validierung der Genexpressionsdaten von PTPLAD2	52
4.3.3.2	PTPLAD2-Überexpression und Testung der neu entstandenen Klone auf ihre PKC412-Sensibilität	53
4.3.4	Unterdrückung der PTPLAD2-Expression mittels einer pLMPmiR ^{PTPLAD2}	55
4.3.5	SOCS1-Überexpression	58
4.4	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse	60
5	DIE K294S_INSFPQ-MUTATION IN BCR-ABL	62
5.1	Allgemeines zur chronischen myeloischen Leukämie (CML)	62
5.1.1	Epidemiologie	62
5.1.2	Pathophysiologie	62
5.1.3	Klinische Symptome	63
5.1.4	Diagnose	63
5.1.5	Verlauf	64
5.1.6	Therapie	65
5.1.6.1	Imatinib	65
5.1.6.2	Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation	66

5.1.6.3	Allogene Stammzelltransplantation	67
5.2	Fragestellung	67
5.3	Vorgehensweise	69
5.3.1	Genaue Lokalisation und Charakterisierung der Mutation	69
5.3.2	Experimentelles Vorgehen	70
5.4	Ergebnisse	71
5.5	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse	73
6	LITERATURVERZEICHNIS	75
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
8	DANKSAGUNG	89

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μm	10^{-6} Meter
A	Ampere
A.d.	Aqua destillata
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat

ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm	10 ⁻² Meter
CML	chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie e.V.
dl	10 ⁻¹ Liter
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat(e)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
et al.	et alii
ETO	<i>Eight twenty-one</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>

FL	<i>FLT ligand</i>
Flt3, FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
for	<i>forward</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRB	<i>Growth factor receptor-bound protein</i>
Gy	Gray
HA	Hämagglutinin
Hb	Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRIS	<i>International Randomized Study of Interferon and STI571</i>
ITD	<i>Internal tandem duplication</i>
JAK	Januskinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Mol pro Liter; molar
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mg	10 ⁻³ Gramm

min	Minute(n)
miR	miR30-basierende shRNA
miR30	microRNA30
ml	10 ⁻³ Liter
mM	10 ⁻³ Mol pro Liter
mm ³	Kubikmillimeter
MNE	<i>Mean normalized expression</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5(3-Carboxymethonyphenol)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
N	Nukleotide
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	10 ⁻⁹ Gramm
nl	10 ⁻⁹ Liter
nM (nmol/l)	10 ⁻⁹ Mol pro Liter
nm	10 ⁻⁹ Meter
nmol	10 ⁻⁹ Mol
OD	optische Dichte
par	<i>parental</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PI3	Phosphoinositid-3
pJAK	phosphorylierte Januskinase

pSTAT	phosphoryliertes STAT
PTPLAD2	<i>Protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PY	phosphoryliertes Tyrosin
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Stammzellfaktor (<i>Stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SH	<i>Src-homology</i>
SHC	<i>Src homologous and collagen</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TKD	Tyrosinkinasedomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TYK	Tyrosinkinase
U	<i>Units</i>
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

V	Volt
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis (<i>weight/volume</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World health organization</i>)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin

T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1 Einleitung

Bei der Behandlung maligner Erkrankungen, die in Deutschland bei einem bedeutenden Anteil der jährlichen Sterbefälle todesursächlich sind [Statistisches Bundesamt 2015], spielt neben der Chirurgie und Strahlentherapie klassischerweise auch die Applikation systemisch wirksamer Medikamente eine wesentliche Rolle. Diese konservative Form der Krebstherapie wird seit fast einem Jahrhundert dominiert durch den Einsatz zytotoxischer Arzneimittel, deren Wirkung sich relativ unspezifisch vor allem an sich schnell teilenden Zellen entfaltet. Dabei werden nicht nur sich stark vermehrende Tumorzellen abgetötet oder in ihrem Wachstum gehemmt, sondern auch gesunde Zellen mit hoher Proliferationsrate. Aus diesem Grund treten bei vielen Patienten, die sich einer solchen Behandlung unterziehen, eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen wie Haarverlust, Myelosuppression oder gastrointestinale Probleme auf. Bei bestimmten Krebserkrankungen besteht seit einiger Zeit jedoch die Möglichkeit im Rahmen einer *targeted therapy* Substanzen einzusetzen, die relativ spezifisch gegen molekulare Ziele in und an Tumorzellen gerichtet sind und so im Allgemeinen deutlich verträglicher sind als traditionelle Zytostatika [Urruticoechea, Alemany et al. 2010; Gerber 2008].

Diese Art der zielgerichteten Therapie basiert auf grundlegenden Erkenntnissen auf dem Gebiet der Genetik und Molekularbiologie. So ist es gängige Lehrmeinung, dass „Krebs [...] durch Veränderungen des Genoms verursacht wird“ [Wagener et Müller 2010]. Demnach können durch Veränderungen an bestimmten Genen, die wichtige Funktionen hinsichtlich des Zellwachstums und der Zellentwicklung übernehmen, aus somatischen Zellen oder auch Keimbahnzellen Krebszellen entstehen (maligne Transformation). Dies geschieht entweder über eine Aktivierung sogenannter Protoonkogene oder über die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Beim erstgenannten Mechanismus werden Protoonkogene, die normalerweise eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären Antwort auf Wachstumssignale oder auch innerhalb des Zellzyklus spielen, durch Mutationen, Gen-Rearrangements oder Genamplifikationen zu Onkogenen aktiviert. Dies hat zur Folge, dass die daraus hervorgehenden Genprodukte qualitativ oder auch quantitativ hinsichtlich ihrer Funktion

derart verändert sind (*gain of function*), dass ein onkogenes Zellwachstum begünstigt wird. Von Onkogenen exprimierte Proteine lassen sich dabei bekanntermaßen vor allem Rezeptortyrosinkinasen, intrazellulären Tyrosinkinasen, Serin-Threonin-Kinasen, G-Proteinen, Wachstumsfaktoren oder auch nukleären Proteinen zuordnen. Im Gegensatz dazu können maligne Zellen auch durch eine Inaktivierung bestimmter Gene, sogenannter Tumorsuppressorgene, entstehen. Dabei führt der Funktionsverlust oder die Funktionsverringering (*loss of function*) der aus diesen Genen hervorgehenden Produkte, die für gewöhnlich auf Zellproliferation und Apoptose eine hemmende Wirkung ausüben, zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Dies geschieht ebenfalls durch Mutationen oder Rearrangements in den jeweiligen zugrundeliegenden Genen [Rosenberg et Krontiris 1995; Wagener et Müller 2010].

Die Identifizierung solcher molekularen und genetischen Veränderungen in den unterschiedlichen Tumorentitäten ermöglichte die Entwicklung von Medikamenten im Sinne der *targeted therapy*, die seit ca. 15 Jahren eingesetzt werden. Dabei stehen in der klinischen Praxis im Moment zwei unterschiedliche Wirkstoffklassen und damit verbunden auch zwei alternative Herangehensweisen zur Verfügung. Zum einen kommen niedermolekulare Substanzen zum Einsatz, die auf unterschiedlichen Ebenen die Weiterleitung von Wachstumssignalen negativ beeinflussen können. Zum anderen kann auf monoklonale Antikörper zurückgegriffen werden, die den Tumor gegenüber Wachstumsfaktoren isolieren oder auch Interaktionen zwischen Wachstumsfaktoren und dazugehörigen Zellrezeptoren unterbinden. Darüber hinaus ist beschrieben, dass diese Eiweiße einen zytotoxischen Effekt auf Krebszellen ausüben können, der entweder direkt im Rahmen der komplementvermittelten Zytolyse (CDC) oder indirekt über Effektorzellen (z.B. natürliche Killerzellen) bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) ausgeübt wird [Urruticoechea, Alemany et al. 2010; Gerber 2008; Natsume, Niwa et al. 2009].

In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass der monoklonale Antikörper Trastuzumab als erste Substanz überhaupt im Sinne einer *targeted therapy* erfolgreich eingesetzt wurde. Das seit 2000 in Deutschland zugelassene Medikament richtet sich dabei gegen die Rezeptortyrosinkinase HER2/neu, welche bei etwa 20 bis 25 Prozent aller Brustkrebspatientinnen überexprimiert ist. Als ein weiterer Meilenstein der *targeted therapy* gilt außerdem die Einführung von Imatinib, dem Prototypen der niedermolekularen Substanzen. Dabei bindet dieser Wirkstoff mit hoher Spezifität in der

ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase BCR-ABL, wodurch die chronische myeloische Leukämie (CML) einer neuen Art der Therapie zugänglich wurde [Urruticoechea, Alemany et al. 2010; Untch, Jackisch et al. 2006; Müller-Tidow, Krug et al. 2007].

So werden aktuell neben Imatinib auch weitere Vertreter der niedermolekularen Substanzen als Therapeutika gegen Neoplasien verabreicht, unter anderem bei der Behandlung FLT3-mutierter akuter myeloischer Leukämien (PKC412; vgl. Kapitel 4) oder auch bei der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (Imatinib, Dasatinib, Nilotinib; vgl. Kapitel 5). Die dabei auftretenden Resistenzen und die dahinter stehenden molekularen Mechanismen sollen in dieser Arbeit näher beleuchtet werden. Dies geschieht anhand der Untersuchung zweier Kandidatengene in einem Modell der FLT3-ITD-Kinase-unabhängigen Resistenz (vgl. Kapitel 4) sowie der Charakterisierung einer neuen BCR-ABL Resistenzmutation (vgl. Kapitel 5).

2 Materialien

2.1 Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Aqua ad iniectabilia, steril	B. Braun, Melsungen
Bacto™ Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten	Roche, Mannheim
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dasatinib	BMS, New York, USA

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Mannheim
dNTP Mix, 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie, Taufkirchen
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glycin	Merck, Darmstadt
Imatinib	Novartis, Basel, Schweiz
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka Chemie, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Fluka Chemie, Taufkirchen
Nilotinib	Novartis, Basel, Schweiz
Phosphate buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin

PKC412	Novartis, Basel, Schweiz
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal [®] West Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trockenmilchpulver	Fluka Chemie, Taufkirchen
Tween 20	Fluka Chemie, Taufkirchen

2.2 Molekulargewichtsmarker

100 bp DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Diphtherietoxin	Calbiochem, La Jolla, USA
DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Hygromycin B	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine [™] 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM [®] I Reduced Serum Media	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

PBS, 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PKC412	Novartis, Basel, Schweiz
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Puromycin Dihydrochlorid	Calbiochem, La Jolla, USA
rekombinantes, murines Interleukin 3	R&D Systems, Wiesbaden
RPMI-1640-Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.4 Antikörper

Anti-ABL (8E9)	BD Pharmingen™, Heidelberg
Anti- α - β -Aktin (AC-15)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-c-myc (9E10)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-HA (Y-11)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-JAK2	Upstate Biotechnology, New York, USA
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus IgG IRDye 680	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Anti-SOCS1	Zymed Laboratories, San Francisco, USA
Anti-STAT5 (G-2)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Anti-Phospho-JAK2 (21870-R)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Phospho-STAT5 (18E5)	Thomas Wheeler und Henry Sadowski, Hamilton, Neuseeland
Anti- α -Phospho-Tyrosin (pY20)	PharMingen, San Diego, USA
Anti- α -Phospho-Tyrosin (4G10)	Upstate Biotechnology, New York, USA
Anti-PTPLAD2	Abcam, Cambridge, UK
Anti- α -Tubulin (TU-02)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.5 Enzyme

rAPid Alkaline Phosphatase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion TM Hot Start DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finland

2.6 Zelllinien

Ba/F3	DSMZ, Braunschweig
Phoenix E	Gary Nolan, Stanford, USA

2.7 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5 α TM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
---	----------------------------

One Shot® TOP10 Chemically Competent

E.coli

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.8 Molekularbiologische Kitsysteme und Verbrauchsmaterialien

Amaya® Cell Line Nucleofector® Kit V

Lonza Cologne, Köln

CellTiter 96® AQUEOUS Non-Radioactive Cell

Proliferation Assay

Promega, Mannheim

CL-XPosure Film

Thermo Scientific, Karlsruhe

QIAGEN® Plasmid Maxi Kit

Qiagen, Hilden

QIAGEN® Plasmid Mini Kit

Qiagen, Hilden

NucleoSpin® Extract II Kit

Macherey-Nagel, Düren

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Rapid DNA Ligation Kit

Roche, Penzberg

RevertAid H Minus First Strand cDNA

Synthesis Kit

Thermo Scientific, Karlsruhe

SuperSignal West Pico, Dura, Femto

Thermo Scientific, Karlsruhe

TRIzol® Reagent

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.9 Membranen

PVDF-Membran Immobilon-FL

Millipore, Schwalbach am Taunus

PVDF-Membran Immobilon-P

Millipore, Schwalbach am Taunus

2.10 DNA-Konstrukte und Vektoren

pBABEpuro	Addgene, Cambridge, USA
pBABEpuro + PTPLAD2	diese Arbeit
pBABEpuro + SOCS1	diese Arbeit
pBluescript SK + p185 ^{BCR-ABL}	Jana Sänger
pBluescript SK + p185 ^{BCR-ABL + 9N}	diese Arbeit
pCR TM -Blunt II-TOPO [®]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pCR TM -Blunt II-TOPO [®] + SOCS1	diese Arbeit
pcDNA 3.1/Zeo(-)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pcDNA 3.1/Zeo(-) + p185 ^{BCR-ABL + 9N}	diese Arbeit
pEF-Flag1 mSOCS	Jana Sänger
pLMP	Thermo Scientific, Karlsruhe
pLMPmiR ^{Kon.}	Corinna Albers
pLMPmiR ^{PTPLAD2}	diese Arbeit

2.11 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG (Ebersberg) bestellt.

2.11.1 Primer für Klonierungen

BCR-ABL XbaI for

5'CCACTAAAGCGAGTGAGCTGGACTTGG3'

BCR-ABL SphI rev

5'GGTGGATGAGTCAAACCTGCTTGCCAGC3'

miR30 common for

5'CAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG3'

miR30 common rev

5'CTAAAGTAGCCCCTTGAATTCCGAGGCAGTAGGCA3'

SOCS1 BamHI for

5'ATATATGGATCCATGGCATCAATGCAGAAGCTGATCTCAGAG3'

SOCS1 EcoRI rev

5'TATATAGAATCCTCAGATCTGGAAGGGGAAGAACTCAGGTA3'

SOCS1 Myc for

5'ATGGCATCAATGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGTAGCA3'

SOCS1 rev

5'TCAGATCTGGAAGGGGAAGGAACTCAGGTAG3'

PTPLAD2 BamHI for

5'TATGGATCCATGGGGCCCTCGGTGCTGCCAGCC3'

PTPLAD2 for

5'ATGGGGCCCTCGGTGCTGCCAG3'

PTPLAD2 HA EcoRI for

5'ATATATGAATTCGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGGCCCTCGGTGCTGCC
AGCCTGGCTGCAG3'

PTPLAD2 HA Sall rev

5'TATATAGTCGACTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACACGTTCTTCTGTTTGACAG3'

PTPLAD2 Sall rev

5'TATATAGTCGACTCACACGTTCTTCTGTTTGACAGAAAAAAC3'

PTPLAD2 rev

5'TCACACGTTCTTCTGTTTGACAG3'

2.11.2 Primer für die Mutagenese mittels PCR

BCR-ABL + 9N

5'CTGCACCAGGTTAGGGTGTGAGGGAAACTGATCTCCTTCATCACCGCC3'

2.11.3 Primer für den Taqman

PTPLAD2 Taq for

5'GGCTGCAGCCCAGGTATAGGAAG3'

PTPLAD2 Taq rev

5'CCAGTATCCATGAGTGGCCACAG3'

2.11.4 Oligonukleotid für die miR Klonierung

PTPLAD2 miR

5'TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGTATAGGAAGAATGTATATCTAGTGAAGCCACAGATGTAGATATAC
ATTCTTCCTATACCTTGCCTACTGCCTCGGA3'

2.12 Standardgeräte

ABI PRISM® 7700

Applied Biosystems, Foster City,
USA

Agarosegel Elektrophoresekammer

Biometra, Göttingen

Agarosegel Elektrophoresekammer

Kodak, New Haven, USA

Analysenwaage BP 221S

Sartorius, Göttingen

CO₂-Inkubator SW J 500 TV BB

Nunc, Wiesbaden

Digitalwaage LC 1200 S

Sartorius, Göttingen

Elisa Reader Sunrise™	Tecan, Crailsheim
Entwickler Optimax®	Protec, Oberstenfeld
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät CB162	Carl Stuart Limited, Dublin, Irland
Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad, München
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
Nucleofector® Elektroporator	Lonza Cologne, Köln
Odyssey®	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
PCR-Thermocycler Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter inoLab®	WTW, Weilheim
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydewang, Dänemark
Stromgeneratoren PowerPac 25, PowerPac200	Bio-Rad, München
Sub-Cell® Model 192	Bio-Rad, München
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hofer, Holliston, USA
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel

Zentrifuge Megafuge R 1.0

Thermo Scientific, Karlsruhe

2.13 Lösungen, Puffer und Gele

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in A.d.
Blockierlösung für Western-Blot:	5 % (w/v) Trockenmilchpulver 0,1 % Tween 20 in PBS
DNA Probenpuffer (10-fach):	60 % Glycerol 0,2 % Bromphenolblau 0,2 M EDTA in A.d.
LB-Medium (flüssig):	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextract 1 % NaCl in A.d. 1 M NaOH (pH 7,0)
LB-Medium (fest):	1,5 % Bacto-Agar in flüssigem LB-Medium
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat

	1 Protease-Inhibitor Tablette
	ad 10 ml A.d.
Sammelgel:	5 % Polyacrylamid-Lösung
	12,5 mM Tris/HCl (pH 6,8)
	0,1 % SDS
	0,3 % APS
	0,1 % TEMED
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8)
	200 mM DTT
	4 % SDS
	0,2 % Bromphenolblau
	20 % Glycin in A.d.
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris
	1,1 % Essigsäure
	10 mM EDTA (pH 8,0) in A.d.
Transferpuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20 % Methanol
	0,1 % SDS in A.d.
Trenngel:	7-9 % Polyacrylamid-Lösung
	375 mM Tris/HCl (pH 8,8)

0,1 % SDS

0,3 % APS

0,1 % TEMED

3 Methoden

3.1 Gentechnische Verfahren

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird verwendet, um eine bestimmte Nukleotidsequenz aus einem vorliegenden doppelsträngigen DNA-Molekül (*template*) in vitro zu vervielfältigen (amplifizieren) [Mullis, Faloona et al. 1986].

Bei einer doppelsträngigen DNA, die als Matrize dient, werden dabei zuerst die beiden komplementären Einzelstränge durch einen Denaturierungsprozess bei 95-100 °C [Schochetman, Ou et al. 1988] getrennt. Bei der folgenden Hybridisierung, welche bei niedrigerer Temperatur stattfinden muss, lagert sich an jeweils einen Einzelstrang ein so genannter Primer an, welcher sich als synthetisiertes Oligonukleotid zu einem bestimmten DNA-Abschnitt komplementär verhält. Es werden demnach zwei unterschiedliche Primer benützt, die so konzipiert sind, dass das 5'-Ende des einen Primers den Anfang der zu vervielfältigenden Sequenz auf dem einen Strang markiert, das 5'-Ende des zweiten Primers das Ende der Sequenz auf dem zweiten Strang [Schochetman, Ou et al. 1988; Mullis, Faloona et al. 1986]. Es folgt die Elongation, bei der eine thermostabile DNA-Polymerase [Saiki, Gelfand et al. 1988] ausgehend vom 3'-Ende beider Primer, unter Verwendung von Desoxynukleosidtriphosphaten, komplementäre Stränge im Bezug auf die vorliegende Nukleotidsequenz synthetisiert, wodurch zwischenzeitlich wieder Doppelstränge entstehen. Neben der eben beschriebenen 5'→3' Polymerase-Aktivität besitzt die in dieser Arbeit verwendete PhusionTM Hot Start DNA Polymerase laut Datenblatt ebenso wie die verwendete Pfu DNA Polymerase [Lundberg, Shoemaker et al. 1991] eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität, wodurch die Fehlerraten dieser Enzyme bedeutend gesenkt werden. Die drei Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation stellen einen Zyklus dar, welcher mehrmals nacheinander wiederholt wird, sodass sich

die DNA-Konzentration dabei exponentiell erhöht [Mullis, Faloona et al. 1986]. All dies findet innerhalb eines Thermocyclers statt, der hinsichtlich der Anzahl der Zyklen, der Dauer der einzelnen Schritte und der dabei verwendeten Temperaturen frei programmierbar ist. Dabei und auch beim Ansatz einer PCR-Reaktion mit allen dazugehörigen Chemikalien wurden die Empfehlungen der Hersteller der verwendeten Polymerasen berücksichtigt.

Eine Polymerase-Kettenreaktion kann nicht nur dazu verwendet werden, eine Nukleotidsequenz eins zu eins zu vervielfältigen, sondern auch dazu das DNA-Molekül um Nukleotide zu erweitern. So können die Primer in einer PCR um Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen ergänzt werden, wodurch später der Einbau des Produkts in einen Klonierungsvektor ermöglicht wird [Mullis, Faloona et al. 1986]. Außerdem ist es möglich, Primer um Nukleotidsequenzen zu erweitern, die für ein bestimmtes Epitop kodieren [Brizzard 2008]. Wird das daraus resultierende PCR-Produkt translatiert, kann das entstandene Protein anhand dieses Epitops mit einem passenden Antikörper nachgewiesen werden. Dies spielt insbesondere bei der Expression von Proteinen eine Rolle, für deren Nachweis noch kein Antikörper zur Verfügung steht.

3.1.2 Insertionsmutagenese mittels PCR

Um eine Insertion in DNA-Moleküle einzuführen, wird eine spezielle Technik der PCR-basierten „*site-directed mutagenesis*“ verwendet, die sogenannte „Megaprimer“-Methode [Sarkar et Sommer 1990].

Dabei werden wie bei einer gewöhnlichen PCR zwei flankierende Primer benötigt, die das zu vervielfältigende DNA-Molekül nach beiden Seiten hin begrenzen (vgl. Kapitel 3.1.1). Soll das *template* nicht nur amplifiziert werden, sondern gleichzeitig um eine Insertion erweitert werden, wird ein dritter Primer, der so genannte Mutagenese-Primer, benötigt. Bei der Konstruktion dieses Primers muss darauf geachtet werden, dass die Insertionssequenz zu beiden Seiten hin von Nukleotiden begleitet wird, die genau die Stelle der Insertion am *template* definieren.

Zuerst wird eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, bei der das *template*, ein flankierender Primer und der Mutagenese-Primer eingesetzt werden. Dieses PCR-

Produkt wird mittels Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.1.7) und Gelextraktion (vgl. Kapitel 3.1.8) aufgereinigt und steht nun für das weitere Procedere als Megaprimer zur Verfügung. Anschließend erfolgt eine zweite PCR, wobei der Megaprimer, der zweite flankierende Primer und dasselbe *template* wie in der ersten PCR eingesetzt werden. Eine erneute Aufreinigung liefert das gewünschte DNA-Produkt.

3.1.3 Quantitative RT-PCR

Um das Expressionslevel eines Gens bestimmen zu können, wird eine quantitative RT-PCR auf Basis einer SYBR-Green I Fluoreszenz durchgeführt [Morrison, Weis et al. 1998; Ponchel, Toomes et al. 2003].

Bei dieser speziellen Technik wird dem PCR-Ansatz ein Farbstoff hinzugefügt, der nach Einlagerung in doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzsignal aussendet. Die bei jedem Zyklus gemessene Signalstärke, welche mit der Menge an PCR-Produkten korreliert, lässt in Verbindung mit der Anzahl der Zyklen Rückschlüsse über die ursprüngliche Fülle an Genkopien zu, die in der als *template* eingesetzten cDNA zu finden ist.

Dabei wurden die Herstellervorgaben des verwendeten Kits Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG beachtet, der ABI PRISM[®] 7700 diente als Fluoreszenzdetektor und die gemessenen Expressionslevel wurden auf Vergleichswerte der Gene GAPDH oder „TATA-Box“ normiert.

Die statistische Auswertung erfolgte auf Basis der *Mean Normalized Expression* (MNE) [Simon 2003].

3.1.4 Verdau durch Restriktionsenzyme

Es ist eine Vielzahl von Restriktionsenzymen (Restriktionsendonukleasen) bekannt, die in drei Hauptgruppen unterteilt werden, wobei vor allem Vertreter der Hauptgruppe zwei in der Molekularbiologie Verwendung finden [Sambrook, Fritsch et al. 1989]. Diese Enzyme können an doppelsträngige DNA binden und diese an einer spezifischen Erkennungssequenz, welche von Enzym zu Enzym für gewöhnlich unterschiedlich ist, durchschneiden (verdauen). Manche Endonukleasen trennen die bei-

den komplementären Doppelstränge der DNA an sich gegenüberliegenden Stellen auf, wodurch zwei glatte DNA-Enden (*blunt ends*) entstehen. Bei anderen Restriktionsenzymen sind die beiden Trennpunkte versetzt, wobei Enden entstehen, bei denen ein DNA-Strang gegenüber dem zweiten vorsteht (*sticky ends*). Dabei kann ein DNA-Molekül gleichzeitig von zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut werden, wenn beide im eingesetzten Puffer gut funktionieren.

Der Verdau von DNA wurde insbesondere im Hinblick auf verwendeten Puffer, Reaktionszeit und Reaktionstemperatur nach den Vorgaben des Restriktionsenzymherstellers durchgeführt.

3.1.5 Dephosphorylierung

Bei Vektoren, die nach ihrem Verdau (vgl. Kapitel 3.1.4) kompatible oder glatte Enden besitzen, besteht die Gefahr einer Selbst-Ligation, welche die spätere Integration eines PCR-Produkts mittels Ligation (vgl. Kapitel 3.1.6) verhindert. Um dem entgegenzuwirken, ist in diesen Fällen der Einsatz von alkalischen Phosphatasen notwendig, welche die zur Rezirkularisierung benötigten 5'-Phosphatgruppen an den Vektoren abspalten. Ein erneuter Ringschluss ist dann nur noch unter Einbeziehung der phosphorylierten 5'-Enden der in dieser Hinsicht unbehandelten PCR-Produkte möglich [Pashley et Kendall 2003].

Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers der verwendeten rAPid Alkaline Phosphatase vorgegangen.

3.1.6 Ligation von doppelsträngigen DNA-Molekülen

Doppelsträngige DNA-Moleküle mit *blunt ends* oder komplementären *sticky ends* (vgl. Kapitel 3.1.4) können unter Verwendung einer DNA-Ligase miteinander verbunden werden. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch eine Reaktion, bei der neue Phosphodiesterbindungen zwischen an 5'-Enden gelegenen Phosphatresten und benachbarten 3'-Hydroxylgruppen geschaffen werden [Sambrook, Fritsch et al. 1989].

Die Vorgaben des Herstellers des verwendeten Rapid DNA Ligation Kit wurden dabei beachtet.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und hoch effektive Methode für die Identifikation, Aufreinigung und Trennung von DNA-Fragmenten, deren Größen in etwa zwischen 0,5 und 25 Kilobasen liegen. Dieses Verfahren macht sich den Umstand zu Nutze, dass sich die Wanderungsgeschwindigkeiten von DNA-Molekülen bei angelegtem elektrischen Feld innerhalb eines Agarose-Gels umgekehrt proportional zum \log_{10} ihres Molekulargewichts verhalten. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen entlang des DNA-Rückgrates bewegen sich diese Moleküle Richtung Anode und werden so entsprechend ihres Gewichtes voneinander getrennt. Anschließend können die separierten DNA-Fragmente durch interkaliertes Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden [Voytas 2003].

Konkret wird zuerst Agarose, deren Konzentration sich nach der Größe der DNA-Moleküle richtet, in einem TAE-Puffer aufgekocht. Anschließend wird die geschmolzene Agarose auf 55 °C abgekühlt und nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) in eine Gelform gegossen, die mit einem Kamm zur Bildung von Geltaschen versehen ist. Dabei sind eventuell entstandene Blasen zu entfernen. Nach Aushärtung des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel in eine mit geeignetem Puffer versehene Elektrophoresekammer überführt. Zusätzlich werden die Geltaschen mit einem DNA-Standard und den aufzutrennenden DNA-Proben, die zuvor mit einem Proben-Puffer versetzt wurden, geladen. Ein nun an das Gel angelegtes elektrisches Feld (ca. 1-10 Volt pro Zentimeter Gel) lässt die Nukleinsäuremoleküle wie zuvor beschrieben wandern und dabei mit Ethidiumbromid interkalieren. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung lassen sich unter UV-Licht (260-360 nm) die nun rot- bis orangeleuchtenden DNA-Moleküle nachweisen und deren Molekülgröße anhand des mitgelaufenen DNA-Standards bestimmen. Im Folgenden können die im Interesse stehenden Moleküle abfotografiert und deren Größe somit dokumentiert werden [Voytas 2003].

Es wurde bei der Durchführung dieser Methode TAE-Puffer (vgl. Kapitel 2.13) zum Aufkochen der Agarose, deren Anteil an den verwendeten Gelen 1-2 % betrug, ver-

wendet. Als DNA-Standard wurden zwei unterschiedliche Molekulargewichtsmarker (vgl. Kapitel 2.2) ausgewählt.

3.1.8 DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel

Nach erfolgreicher elektrophoretischer Auftrennung (vgl. Kapitel 3.1.7) können DNA-Moleküle aus einem Stück Gel, welches zuvor aus der gesamten Agarosematrix mit einem Skalpell gewonnen wurde, unter Visualisierung durch UV-Licht herauspräpariert werden [Gründemann et Schömig 1996].

Dazu wurde das NucleoSpin[®] Extract II Kit verwendet und nach dessen Gebrauchsanweisung vorgegangen.

3.1.9 Integration eines PCR-Produkts in einen Vektor

Im Rahmen einer Klonierung stehen mehrere Vorgehensweisen zur Verfügung, um ein PCR-Produkt in einen Vektor zu integrieren. Grundsätzlich lassen sich diese in zwei Hauptgruppen unterteilen: Ligations-abhängige und Ligations-unabhängige Methoden. Dabei können die erstgenannten analog zu den Enden der zu integrierenden PCR-Produkte weiter in drei Unterkategorien aufgeschlüsselt werden: Klonierungen mit *sticky ends*, *blunt ends* und T-A Klonierungen [Guo et Bi 2002].

Konkret wurden für die Arbeit zwei Verfahren ausgewählt, die im Folgenden vorgestellt werden.

3.1.9.1 Ligations-abhängige Methode mit *sticky ends*

Zuerst wird eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.1). Die dabei verwendeten Primer sind so konstruiert, dass jeder der beiden Oligonukleotide am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease trägt, welche auch im Vektor vorhanden ist. So entsteht ein PCR-Produkt, an dessen 5'-Ende ein Restriktionsenzym X und an dessen 3'-Ende ein Restriktionsenzym Y schneiden kann. Beide Restriktionsenzyme, die so ausgewählt wurden, dass sie *sticky ends* produzieren, sind demnach auch in der Lage, den Vektor an einer unterschiedlichen Stelle zu spalten. Das weitere Procedere sieht vor, dass in zwei getrennten Reaktionen sowohl der Vektor als auch das PCR-Produkt von beiden Restriktionsendo-

nukleasen (vgl. Kapitel 3.1.4) verdaut werden. Da sich die zwei Erkennungssequenzen im zirkulären Vektor relativ nahe sind, wird dieser in ein sehr großes DNA-Molekül, welches weiterverwendet wird, und ein viel kleineres Stück aufgetrennt. Anschließend wird im Rahmen einer Ligation (vgl. Kapitel 3.1.6) das PCR-Produkt in den Rest-Vektor an der entstandenen Lücke integriert, wodurch wieder ein ringförmiges Molekül entsteht. Zwischen den einzelnen Schritten werden die im Interesse stehenden Nukleinsäuremoleküle mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.1.7 und 3.1.8) aufgereinigt [Guo et Bi 2002; Sambrook, Fritsch et al. 1989].

3.1.9.2 Ligations-unabhängige Methode nach dem TOPO[®]-Verfahren

Das TOPO[®]-Verfahren ermöglicht es dem Anwender ein DNA-Insert ohne kompatible Enden in einen Vektor einzubauen, ohne dass dabei Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen oder Ligationsvorgänge benötigt werden. Eine zentrale Rolle nehmen bei dieser Methode Typ-I-DNA-Topoisomerasen ein, welche am Vektor Einzelstrangbrüche herbeiführen, um sich anschließend an die so entstandenen Enden kovalent zu binden. Im nächsten Schritt lösen sich diese Enzyme unter Einfügung des Inserts wieder von den Vektornukleotiden ab [Knippers 2006].

Es wurden dabei die Vorgaben des verwendeten Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit angewandt.

3.1.10 RNA-Isolation

RNA, welche als Ausgangsmaterial zur Herstellung von cDNA (vgl. Kapitel 3.1.11) benötigt wird, kann durch ein von Chomczynski und Sacchi im Jahre 1987 beschriebenes Verfahren aus Zellen gewonnen werden. Dabei werden die Zellbestandteile durch ein Vorgehen, in dem Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Chloroform eine wesentliche Rolle spielen, in drei Phasen aufgetrennt: eine wässrige Phase, eine Interphase und eine Phenolphase. Die RNA kann anschließend aus der wässrigen Phase unter Einsatz von Isopropanol präzipitiert werden [Chomczynski et Sacchi 1987].

Diese Methode und die darin beschriebenen Chemikalien lieferten die Grundlagen für das zur RNA-Isolation eingesetzte TRIzol[®] Reagenz, nach dessen Anleitung vorgegangen wurde. Die Lagerung der so herausgelösten RNA erfolgte bei – 80 °C.

3.1.11 Herstellung von cDNA

mRNA, welche aus Zellen isoliert wird (vgl. Kapitel 3.1.10), kann enzymatisch in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Bei dem dafür nötigen Prozess binden zuerst spezielle Primer, deren Längen normalerweise zwischen 12 und 18 Nukleotiden variieren, an die Poly(A)-Schwänze der eingesetzten mRNA-Moleküle. Von diesen Startermolekülen ausgehend synthetisiert eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) zur RNA komplementäre DNA-Einzelstränge, wodurch cDNA-mRNA-Hybridmoleküle entstehen. In einem zweiten Schritt fügt eine so genannte RNase H den mRNA-Einzelsträngen in den Hybridmolekülen Einkerbungen und Lücken hinzu. Die dabei noch verbliebenen Oligonukleotide dienen im weiteren Verlauf als Primer für eine nun verwendete DNA-Polymerase, die aus den Einzelsträngen doppelsträngige cDNA-Moleküle erschafft [Sambrook, Fritsch et al. 1989].

Wie im zur cDNA-Herstellung verwendeten Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit beschrieben, wurde die so erschaffene komplementäre DNA als Matrize bei einer PCR oder auch bei einer quantitativen RT-PCR weiterverwendet.

3.1.12 Erstellung eines Vektors mit zielgenspezifischer shRNA

Die Verwendung von vektorbasierter *small hairpin* RNA (shRNA), der das Prinzip der RNA-Interferenz zugrunde liegt, ermöglicht eine dauerhafte und stabile Stilllegung von Genen in lebenden Zellen [Albers, Illert et al. 2011]. Dabei wird ein eigens dafür klonierter Vektor in eine Zelle eingebracht, um zielgenspezifische shRNA zu exprimieren. Diese trägt nach diversen Prozessierungen unter anderem zur Spaltung und zum Abbau von mRNA-Molekülen bei, die dem jeweiligen Gen zuzuordnen sind [Rao, Vorhies et al. 2009].

Zur Herstellung eines solchen Vektors wurde nach einer von Corinna Albers [Albers, Illert et al. 2011] veröffentlichten Technik vorgegangen. Zuerst errechnet dabei ein von Novartis Institutes for BioMedical Research entwickelter Algorithmus „Biopredsi“ eine für ein zu supprimierendes Gen spezifische Sequenz, welche aus 21 Basen besteht. Diese wird dann nach den Instruktionen des Herstellers des später verwend-

ten Vektors pLMP auf eine Abfolge von 97 Basen erweitert, womit das daraus abgeleitete Oligonukleotid an die Idee einer miR30-basierenden shRNA adaptiert wird. Dieses Molekül wird nun mittels einer PCR vervielfältigt und als Insert in den von Thermo Scientific bereitgestellten retroviralen Vektor pLMP integriert. Dabei wurde nach den Vorgaben der erwähnten Firma verfahren.

3.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Durch Transformation, unter der man im Allgemeinen die direkte Aufnahme von DNA in eine Zelle ohne einen speziellen Überträger versteht, kann rekombinante DNA in kompetente Bakterien eingeschleust werden, wo diese dann repliziert und gegebenenfalls über eine mRNA in Proteine translatiert wird [Thieman et Palladino 2007].

Konkret wird zur Transformation eines rekombinanten Vektors eine Methode angewendet, die einen Hitzeschock enthält und von Sambrook [Sambrook, Fritsch et al. 1989] in ähnlicher Weise beschrieben wird. Dabei werden zuerst 50 µl der kompetenten Bakterien, die normalerweise bei – 80 °C gelagert werden, auf Eis aufgetaut. Diese Zellen werden, immer noch den Temperaturen des Eises ausgesetzt, in Verbindung gebracht mit 2 bis 5 µl des Vektor-beinhaltenden Ligationsansatzes und anschließend für 30 Minuten inkubiert. Dieser Ansatz wird nun im Rahmen des erwähnten Hitzeschocks für 45 Sekunden auf 37 °C erwärmt, um im Folgenden wiederum für zwei Minuten auf Eis gelagert zu werden. Danach werden die so behandelten Bakterien auf LB-Agar-Platten aufgetragen, die je nach der auf dem Vektor kodierten Resistenz Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) enthalten. Diese werden mit dem Boden nach oben über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator gehalten. Die am nächsten Tag auf den Platten entstandenen Zellkolonien werden zum weiteren Wachstum in antibiotikahaltige LB-Flüssigmedien überführt, die anschließend bei 37 °C und 250 UpM über Nacht geschüttelt werden.

Als kompetente Bakterien wurden hierbei die käuflich erworbenen Escherichia Coli-Stämme DH5α und One Shot[®] TOP 10 verwendet.

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Viele der Verfahrensweisen zur Extraktion von DNA aus Zellen basieren auf einer Methode, die zum ersten Mal von Birnboim und Doly 1979 beschrieben wurde. Diese macht sich den Umstand zu Nutze, dass bei einem alkalischen pH (zwischen 12 und 12,5) lineare DNA, jedoch nicht zirkuläre DNA, lysiert wird [Reece 2004].

Auch die zur Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien (vgl. Kapitel 3.2.1) verwendeten Kit-Systeme von Qiagen[®] stellen eine Weiterentwicklung dieser alkalischen Lyse-Methode dar. Bei deren Anwendung bindet nach Angaben des Herstellers bei einem bestimmten pH-Wert die Plasmid-DNA an ein Anionen-Austauschharz, welches sich innerhalb rotierender Säulen befindet. Anschließend wird die so separierte DNA durch einen Waschvorgang von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verunreinigungen befreit. Die nun aufgereinigten Plasmide werden in einem Folgeschritt in einem salzhaltigen Puffer gelöst und durch eine Ausfällung mit Isopropanol konzentriert und entsalzt.

Abhängig vom Volumen der LB-Flüssigkeit, in der die transformierten Bakterien kultiviert wurden, und der damit verbundenen DNA-Menge wurde nach Vorgaben des Herstellers entweder das QIAGEN[®] Plasmid Mini Kit (2-5 ml LB-Medium) oder das QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit (100-500 ml LB-Medium) verwendet.

3.2.3 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech mit Hauptsitz in Konstanz durchgeführt.

3.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.3.1 Kultivierung der Zelllinie Ba/F3

Nach Angaben des Lieferanten, der Firma DSMZ mit Sitz in Braunschweig, sind Ba/F3-Zellen einer IL-3-abhängigen murinen Pro-B-Zelllinie zuzuordnen, deren Verdopplungszeit in etwa 20 Stunden beträgt.

Diese Zellen werden gemäß den Empfehlungen des eben genannten Unternehmens und nach üblichen Methoden der Forschungsgruppe [von Bubnoff, Veach et al. 2005] kultiviert. So werden die Suspensionszellen in RPMI-1640-Medium gehalten, welchem 10 % fötales Kälberserum (FCS) und ein gewisser Antibiotikaanteil (200 U Penicillin pro ml und 200 µg Streptomycin pro ml) zugesetzt sind. Dabei befinden sie sich innerhalb von liegenden Zellkulturflaschen, die in einem Inkubator einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem Luftanteil von 5 % CO₂ ausgesetzt sind. Um die maximale Dichte von 2,5 x 10⁶ Zellen pro ml nicht zu überschreiten, ist es nötig, die Zellkultur alle 1-3 Tage mit frischem Medium im Verhältnis von etwa 1:10 zu verdünnen.

Besondere Beachtung gilt in diesem Zusammenhang auch der Versorgung von Ba/F3-Zellen mit Zytokinen. Während parentale Zellen den Zusatz von 2 ng/ml Interleukin 3 benötigen, wachsen FLT3-ITD-positve Ba/F3-Zellen aufgrund von Rezeptorautophosphorylierung unabhängig von diesem Zytokin [Spiekermann, Bagrintseva et al. 2003]. Ebenso wird bei BCR-ABL-exprimierenden Zellen dieser Linie auf die Zugabe von IL-3 verzichtet [Wong, McLaughlin et al. 2003].

Das Medium der FLT3-ITD-Subklone C7 und C10 wird außerdem mit PKC412 in einer Konzentration von 10 nmol pro Liter versetzt.

3.3.2 Kultivierung von Phoenix-E-Zellen

Garry P. Nolan, Stanford University, USA stellte sowohl die Zellen als auch sämtliche Informationen darüber [Pear, Scott et al.] zur Verfügung.

Die adhärennten Phoenix-E-Zellen werden in DMEM-Medium, welches mit 10 % FCS versetzt ist, und bei denselben Brutschrankeinstellungen wie Ba/F3-Zellen in liegenden Zellkulturflaschen gehalten. Bei mikroskopisch festgestellter hoher Dichte werden Phoenix-E-Zellen zuerst mit PBS vorsichtig abgespült, um sie anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung zu beträufeln, die deren Ablösung vom Flaschenboden induziert. Nach kurzer Zeit im Brutschrank können die nun losgelösten Zellen mit Medium gewaschen, abzentrifugiert (4 Minuten bei ca. 1.400 UpM) und durch neues Medium verdünnt wieder ausplattiert werden.

Zur Gewährleistung der stabilen Expression der Strukturgene *gag*, *pol* und *env* (vgl. Kapitel 3.3.5.2) werden die Zellen alle drei Monate für sieben Tage mit Hygromycin B (200 µg/ml) und Diphtherietoxin (2 µg/ml) selektioniert.

3.3.3 Tiefkühlkonservierung der Zellen

Kryokonservierung ermöglicht eine Langzeitlagerung von Zellen, wobei im Gegensatz zur fortlaufenden Zellkultur ungewollte Veränderungen, wie zum Beispiel Differenzierungs- oder Dedifferenzierungsprozesse, vermieden werden [Wobus 2003].

Konkret werden dazu, in Anlehnung an die Empfehlungen der Lieferanten, zuerst $1-5 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert, bevor sie in 750 µl Medium überführt werden. Anschließend wird dieser Zellsuspension ein ebenso großes Volumen an Einfriermedium, welches sich aus 20 % FCS und 80 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zusammensetzt, hinzugegeben. Das Resultat daraus wird innerhalb eines Kryoröhrchens für ein paar Tage bei -80 °C eingefroren und danach zur endgültigen Lagerung in einen Stickstoff-tank verbracht.

Um den bei Raumtemperatur auftretenden zytotoxischen Effekt von DMSO [Burkhart, Leimbach et al. 2009] möglichst gering zu halten, wird beim Auftauen der Zellen darauf Wert gelegt das Dimethylsulfoxid möglichst rasch zu entfernen. Dazu wird, ebenso in Anlehnung an die von den Lieferanten nahegelegten Herangehensweisen, das aus dem Flüssigstickstoff entnommene Röhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Im nächsten Schritt wird die darin befindliche nun flüssige Zellsuspension mit frischem Medium (ca. 5 ml) verdünnt und zentrifugiert. Nach Absaugung des Überstandes kann das entstandene Zellpellet in neuem Medium resuspendiert werden, bevor die so aufgetauten Zellen weiter in Kultur gehalten werden.

3.3.4 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl von Zellen lässt sich mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmen. Dabei kann gleichzeitig die Vitalität der Kultur durch Zugabe des Farbstoffs Trypanblau beurteilt werden, der die Zellmembranen toter Zellen durchdringt und sie so hell-

bis dunkelblau anfärbt, während das Cytoplasma lebender Zellen unter einem Mikroskop weiterhin farblos erscheint [Schrödel 2010].

Dazu wird eine Zellsuspension mit einer 0,5-prozentigen Trypanblaulösung im Verhältnis von 1:1 gemischt und anschließend in vier sogenannte Großquadrate eingebracht, die im Spalt zwischen Deckglas und Kammerboden einer Zählkammer lokalisiert sind. Unter Einsatz eines Mikroskops werden die lebenden Zellen pro Großquadrat bestimmt und daraus ein Mittelwert errechnet. Dieser muss, um die korrekte Zellkonzentration (Zellzahl pro ml) der ursprünglich eingesetzten Zellsuspension zu erhalten, im Folgenden mit 2×10^4 multipliziert werden, da der Rauminhalt eines Großquadrates mit $0,1 \text{ mm}^3$ angegeben wird und zusätzlich der Verdünnungseffekt, der durch die Trypanblaulösung entstanden ist, mit dem Faktor 2 berücksichtigt werden muss.

3.3.5 Transfektionsmethoden

Als Transfektion wird ein Prozess bezeichnet, bei dem fremde Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen eingeschleust werden. Zu diesem Zweck stehen dem Wissenschaftler eine Reihe von Verfahrensweisen zur Verfügung, die sich in drei Gruppen unterteilen lassen: biologische, chemische und physikalische Methoden. Wird dabei das übertragene genetische Material in das Genom der Zielzelle integriert, spricht man von einer stabilen Transfektion. Ist dies nicht der Fall, können die eingeschleusten Nukleinsäuren durch äußere Einflüsse oder auch bei Zellteilungen wieder verloren gehen, weshalb dann von einer transienten Transfektion die Rede ist [Kim et Eberwine 2010].

Zur Transfektion von Ba/F3-Zellen mit rekombinanten Vektoren wurden die Nukleofektion (physikalische Grundlage) und die virale Transfektion (biologisch) eingesetzt.

3.3.5.1 Nukleofektion

Die Technik der Nukleofektion verwendet, basierend auf der konventionellen Methode der Elektroporation, neben kurzen Spannungsimpulsen auch zelltypspezifische Reagenzien. Dies ermöglicht den direkten Transfer von genetischem Material in den Zellkern, wodurch auch postmitotische Zellen transfiziert werden können. Außerdem

liefert die Nukleofektion hohe Transfektionsraten (bis zu 95 %) und stellt eine schonende Behandlung der Zellen sicher [Zeitelhofer, Vessey et al. 2007].

Zu dem Zweck einer Ba/F3-Transfektion wurde ein Nucleofector[®]- Elektroporator sowie ein Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®]-Kit V verwendet. Dabei werden zuerst gemäß den Vorgaben des Herstellers 2×10^6 Zellen in 100 μ l Cell Line Nucleofector[®] Solution V überführt. Anschließend wird die entstandene Zellsuspension mit 2 μ g DNA (Vektor) gemischt und in eine spezielle Küvette eingebracht. Diese wird in das Nucleofector[®]-Gerät gestellt, welches im Programm X-001 gestartet wird. Nach Ablauf des Programms werden die nun transfizierten Zellen mit einer Plastikpipette unter Zuhilfenahme von vorgewärmtem Medium (500 μ l) aus der Küvette entfernt und in die Vertiefung einer 6-Lochplatte gegossen, die ebenfalls vorgewärmtes Medium (1 ml) enthält. Zur weiteren Kultivierung werden die beschriebenen Verfahren angewendet (vgl. Kapitel 3.3.1).

3.3.5.2 Retrovirale Transfektion

Prinzipiell werden zum retroviralen Gentransfer zwei Komponenten benötigt, ein retroviraler Vektor und eine Verpackungszelllinie. Dabei sind retrovirale Vektoren, die ursprünglich vor allem auf Basis des Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV) entwickelt wurden, Plasmide, die über das Verpackungssignal Ψ , die retroviralen 5'- und 3'-LTR, eine Insertionsschnittstelle für das zu übertragende Gen und gegebenenfalls über einen Selektionsmarker verfügen, ohne jedoch für retrovirale Proteine zu kodieren. Diese Proteine, welche für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind, werden durch eine Verpackungszelllinie zur Verfügung gestellt. Diese exprimiert die zu diesem Zweck essentiellen Strukturgene (*gag*, *pol* und *env*) auf speziellen Plasmiden, die ihr vorher durch Transfektion eingeführt wurden. Dabei wird je nach Art der translatierten Hüllproteine (Produkte des viralen Gens *env*), die entscheidend sind für den späteren Wirtsbereich, zwischen ecotropen und amphotropen Verpackungszelllinien unterschieden. Um nun einen retroviralen Gentransfer zu vollziehen, wird zuerst eine solche Verpackungszelllinie mit einem retroviralen Vektor, in den zuvor das zu übertragende Gen integriert wurde, transfiziert. Die ab jetzt vom retroviralen Vektor hergestellten Transkripte werden als genomische RNA mit Hilfe der viralen Strukturproteine zu so genannten Virionen verpackt, die im Folgenden von der Verpackungszelllinie abgegeben werden. Die anschließend abgeernteten Viruspartikel infizieren die Zielzellen durch In-

teraktion des viralen Hüllproteins mit einem Zielzellrezeptor. Die so in den Zielzellen angelangte retrovirale RNA wird, nachdem sie durch eine reverse Transkriptase (Produkt des viralen Gens *pol*) in DNA umgeschrieben wurde, als Provirus in das Genom der infizierten Zellen integriert. [Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2011; Cepko, Fields-Berry et al. 1998]

Um unter Anwendung der Technik der retroviralen Transfektion rekombinante retrovirale Vektoren in Ba/F3-Zellen einzubringen, wurde die ecotrope Verpackungszelllinie Phoenix E eingesetzt. Diese adhären Zellen, von Garry Nolan zur Verfügung gestellt, leiten sich seiner Auskunft nach von einer menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie namens 293 ab. Sie exprimieren die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* über zwei Plasmide, von denen das eine zusätzlich für eine Hygromycin-B-Resistenz und das andere für eine Diphtherietoxin-Resistenz kodiert.

Konkret wurde in Anlehnung an ein von Pear [Pear, Scott et al.] veröffentlichtes Protokoll vorgegangen.

3.3.5.2.1 Transfektion von Phoenix E mit dem retroviralen Vektor

Zuerst muss der retrovirale Vektor in die Verpackungszelllinie Phoenix E überführt werden. Dies wird durch eine weitere Transfektionsmethode, der Lipofektion, bewerkstelligt. Dabei wird der Vektor von einem synthetischen kationischen Lipid umhüllt, das mit der Zellmembran fusioniert und dabei das Nukleinsäurekonstrukt in das Zellinnere befördert [Netzker 2006].

Dazu wurde das Lipofectamine™ 2000 Reagenz von Invitrogen verwendet und nach den bereitgestellten Herstellerangaben vorgegangen. In einem ersten Schritt werden 2 Millionen Phoenix-E-Zellen in einer Zellkulturschale (6 cm) unter der Aufwendung von 2 ml antibiotikafreiem DMEM-Medium ausplattiert. Am darauf folgenden Tag werden 10 µg rekombinanter Vektor mit 500 µl OptiMEM® I-Medium und getrennt davon 20 µl Lipofectamine™ 2000 mit ebenfalls 500 µl desselben Mediums verdünnt. Im Anschluss ist eine Inkubationszeit von fünf Minuten einzuhalten. Nach Mischung beider Ansätze wird das daraus entstehende Resultat für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach in die Zellkulturschale überführt, nachdem bei dieser das alte Medium durch neues ersetzt wurde.

Je nach Bedarf kommen bei dieser Prozedur mehrere Zellkulturschalen zum Einsatz.

3.3.5.2.2 Ernte des retroviralen Zellüberstandes

24 Stunden nach erfolgter Transfektion wird zunächst das Medium, das die adhären-ten Phoenix-E-Zellen versorgt, in der Zellkulturschale erneut ausgetauscht. In der Folge wird der Zellüberstand, in welchem nun die retroviralen Partikel enthalten sind, dreimal im Abstand von jeweils 12 Stunden abgeerntet, um anschließend durch einen 0,45 µm Filter gepresst zu werden. Die Lagerung des Zellüberstandes erfolgt bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

3.3.5.2.3 Retrovirale Infektion von Ba/F3-Zellen

Mit dem Ziel einer retroviralen Infektion werden parentale Ba/F3-Zellen zusammen mit 500 µl RPMI-1640-Medium und einer adäquaten Menge an IL-3 in eine 12-Lochplatte gegeben. Dieser Zellsuspension werden im Folgenden 2 ml des geernteten retroviralen Zellüberstandes, dem zuvor ebenfalls IL-3 zugesetzt wurde, und Polybrene in einer Konzentration von 2 µg/ml beigemischt. Die Lochplatte wird bei 2.400 UpM und 32 °C für 90 Minuten abzentrifugiert. Je 12 Stunden, 24 Stunden und 36 Stunden später wird sämtlicher Zellüberstand entfernt, bevor die übrig gebliebenen Zellen erneut mit frischen Viruspartikeln, RPMI-1640-Medium, IL-3 und Polybrene in den vorher benannten Mengen versorgt und abzentrifugiert werden.

Die beschriebene Methode zur retroviralen Infektion ist unter der Bezeichnung *spin infection* bekannt [Nakagawa et Opitz 2007].

3.3.6 Selektion transfizierter Zellen

Grundsätzlich sind zwei unterschiedliche Herangehensweisen möglich, um erfolgreich transfizierte Zellen zu selektieren. Falls durch Einschleusen des gewünschten Gens eine Änderung des Phänotyps einhergeht, kann genau dieser neu entstandene Unterschied genutzt werden, um nur diejenigen Zellen wachsen und überleben zu lassen, die das zu übertragende genetische Material auch erhalten haben und exprimieren. Dies lässt sich zum Beispiel durch spezielle Kulturbedingungen bewerkstelligen, die für untransfizierte Zellen abträglich sind. Bilden transfizierte Zellen jedoch voraussichtlich keinen zur Selektion geeigneten neuen Phänotyp aus, kommt alternativ die Technik der Kotransfektion zum Einsatz. Dabei wird den Zielzellen auf demselben Vektor ein zusätzliches Gen zugeführt, das einen Selektionsvorteil (z.B.

eine Resistenz) bietet. Jetzt kann analog zum ersten Verfahren eine Umwelt geschaffen werden, die transfizierten Zellen einen Vorteil bietet [Naylor 1994].

Zur Selektion transfizierter Ba/F3-Zellen kamen beide Methoden zum Einsatz:

3.3.6.1 Selektion durch IL-3-Entzug

Während parentale Ba/F3-Zellen den Zusatz von IL-3 benötigen (vgl. Kapitel 3.3.1), kann bei mit BCR-ABL-Konstrukten transfizierten Vertretern jener Zelllinie darauf verzichtet werden [Daley et Baltimore 1988].

Deshalb wurde parentalen Ba/F3-Zellen 3-5 Tage nach erfolgter Transfektion mit einem BCR-ABL-Konstrukt das IL-3 zur Selektion entzogen. Dies wurde erreicht, indem die Zellen abzentrifugiert und in neuem Medium ohne IL-3 resuspendiert wurden.

3.3.6.2 Selektion über Resistenzmarker

Alle frisch transfizierten Ba/F3-Zellen, die nicht durch einen IL-3-Entzug selektiert werden konnten (vgl. Kapitel 3.3.6.1), wurden über ein auf dem jeweiligen Vektor enthaltenes antibiotisches Resistenzgen (Puromycin) selektiert. Dazu wurde ihnen zwei Tage nach erfolgter Transfektion für einen Zeitraum von zehn Tagen 2 µg/ml Puromycin zugesetzt.

3.3.7 Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid

Grundsätzlich wird die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt Proteom genannt. Dabei erreicht ein bestimmtes Protein innerhalb eines solchen Proteoms ein bestimmtes *steady-state*-Level, wenn sich Proteinsynthese und Proteinabbau ausbalancieren. Verändert sich dieses *steady-state*-Level für ein bestimmtes Protein, so ist dies auf veränderte Raten in der Proteinsynthese und/oder im Proteinabbau zurückzuführen. In diesem Zusammenhang stellen Transkription und Translation wichtige Schritte innerhalb der Synthese dar, während der Proteinabbau hauptsächlich über das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt wird. Um differenzieren zu können, ob bei einem veränderten *steady-state* eines Proteins der Proteinaufbau und/oder der Proteinabbau ursächlich sind, ist es experimentell möglich, die Proteinsynthese mittels des Translationshemmers Cycloheximid auszuschalten.

So kann über einen bestimmten Zeitraum isoliert der Proteinabbau betrachtet werden [Alvarez-Castelao, Ruiz-Rivas et al. 2012].

Sollte die Proteinbiosynthese bei Ba/F3-Zellen geblockt werden, wurde Cycloheximid in einer Konzentration von 50 µg/ml dem Kulturmedium zugegeben.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Proteinen müssen die Zellen, in denen die Eiweiße enthalten sind, lysiert werden. Dies wird im Allgemeinen erreicht, indem deren Zellmembranen durch Ultraschall, Elektroporation, Hitze oder Chemikalien zerstört werden [Mao, Huang et al. 2010].

Zur Herstellung von Ba/F3-Zelllysaten wurde ein chemisches Verfahren gewählt, bei dem der eingesetzte Lysis-Puffer Substanzen enthält, die zu diesem Zweck für gewöhnlich verwendet werden. Konkret wurde dabei folgendermaßen vorgegangen:

Zuerst wird die Zellkonzentration in einer Zellkulturflasche bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.4). Daraufhin wird das Volumen an Zellsuspension entnommen, in welchem sich 5 Millionen Zellen befinden, und in ein Gefäß überführt. Dieses wird dann zentrifugiert (5 min bei 1.500 UpM) und der so entstandene Überstand vollständig abgesaugt. Anschließend werden die Zellen, welche sich am Boden des Gefäßes in Form eines Pellets angesammelt haben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Pellet wird mit neu hergestelltem und kühl gelagertem Lysis-Puffer (100 µl) resuspendiert und in ein anderes Röhrchen verbracht. Nach einer erneuten Zentrifugation (20 min, 14.000 UpM, 4 °C) wird der Überstand mit einer Pipette aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dort werden die proteinreichen Proben mit 50 µl 2-fachen SDS-Probenpuffer versetzt, für zehn Minuten bei 95 °C aufgeköcht und im Anschluss wiederum kurz zentrifugiert. Jetzt können sie für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt werden.

3.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Grundsätzlich ist die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in einer porösen Gelmatrix abhängig von ihrer Form, Größe und Nettoladung. Das Ziel einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es, Eiweiße ausschließlich in Abhängigkeit ihrer Größe zu trennen. Deshalb werden die eingesetzten Proteingemische zuerst mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) und einem Schwefelbrücken-spaltenden Thiolreagens, wie z.B. β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), versetzt. Dadurch werden die Proteine vollständig denaturiert und deren Polypeptidketten gleichmäßig mit dem negativ geladenen SDS besetzt, sodass die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Dadurch entstehen SDS-Proteinmizellen, welche hydrodynamisch äquivalente Konformationen und gleiche Ladungsdichten pro Längeneinheit aufweisen. Die so behandelten Proteine wandern anschließend bei der Anwendung eines diskontinuierlichen Systems nach Laemmli unter dem Einfluss einer angelegten Spannung zuerst durch ein Sammelgel, bevor sie in ein engporigeres Trenngel übertreten, wo sie in Abhängigkeit ihrer Größe durch den „Molekularsiebeffekt“ aufgetrennt werden [Eckert et Kartenbeck 1997].

Zuerst wurde dementsprechend ein Trenngel hergestellt, wobei dessen Polyacrylamid-Anteil abhängig vom gewünschten Auftrennungsbereich zwischen 7 und 9 Prozent lag. Dieses wurde in eine Gelvorrichtung gegossen und der darüber liegende und für das Sammelgel vorgesehene Raum mit Isopropanol gefüllt. Nach vollständiger Auspolymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und stattdessen ein frisch zubereitetes Sammelgel eingefüllt, in das anschließend zur Ausbildung von Taschen ein Kamm eingeführt wurde. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in einer vertikalen Flachgelappatur befestigt. Anschließend wurden die Probenaschen, nachdem die Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt worden war, mit Zellysaten und einem Molekulargewichtsmarker geladen. Abschließend wurde an das Gel eine Spannung (30-130 V) angelegt, welche die in den Proben enthaltenen Proteine in Bewegung setzte.

3.4.3 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Bei einem Western-Blot werden Proteine aus einem SDS-PAGE-Gel auf Membranen mit hoher Proteinbindungskapazität übertragen [Pingoud et Urbanke 1997].

Der Transfer wurde dabei elektrophoretisch (*Elektro-Blotting*) in der Technik des *Wet-blottings* bewerkstelligt [Baker et Dunn 1994].

Dazu wird zuerst eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) mit einer Schere zurechtgeschnitten, in Methanol geschwenkt und anschließend auf ein SDS-PAGE-Gel gelegt, welches sich in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale befindet. Membran und Gel werden nun zwischen zwei Schichten Zellulosefilterkarton (*Whatman*-Papier) eingespannt und in eine Kassette verpackt, welche im Folgenden senkrecht in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer platziert wird. Dabei muss darauf geachtet werden, dass entsprechend der späteren Wanderungsrichtung der negativ geladenen Proteine die PVDF-Membran zur Anode orientiert ist, während das Gel zur Kathode zeigt. Der Protein-Transfer wird durch Anlegung eines Stroms (Stromstärke 1 A) in Gang gesetzt. Die Dauer der Eiweiß-Wanderung hängt dabei maßgeblich von der Größe der im Interesse stehenden Proteine ab.

3.4.4 Nachweis transferierter Proteine durch Immunhistochemie

Die auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine werden mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen. Eine Möglichkeit dabei ist die Erkennung der im Interesse stehenden Proteine über Antikörper mit nachfolgender Chemolumineszenz [Pingoud et Urbanke 1997].

Dazu müssen zuerst reaktive Gruppen auf der Membran durch „Blocken“ abgedeckt werden, um eine unspezifische Bindung der später verwendeten Antikörper zu verhindern. Dies geschieht standardmäßig durch eine Schüttelinkubation der Membran in einer milchbasierten Blockierlösung (30 min, 37 °C). Bei der Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern muss laut Herstellerangaben zum Blocken Rinderserumalbumin (BSA) zum Einsatz kommen. Anschließend wird die Membran den sogenannten Primärantikörpern ausgesetzt, die spezifisch an Epitope der nachzuweisenden Proteine binden. Dazu wird die Membran über Nacht bei 4 °C in einer die Primärantikörper enthaltenden Lösung geschüttelt, die zuvor nach Herstellerangaben

zubereitet wurde. Am nächsten Tag wird die PVDF-Membran von ungebundenen Antikörpern befreit, indem sie dreimal für je 10 Minuten mit PBST-Puffer (PBS-Tween-Puffer: 0,1 % Tween 20 in PBS) gewaschen wird, um sie im Anschluss daran in einer Lösung inkubieren zu können (60 min, 37 °C), die in der Verdünnung von 1:10.000 die Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper enthält. Diese sind so konstruiert, dass sie gegen den F_C-Teil des Primärantikörpers gerichtet sind. Nach einer erneuten Befreiung der Membran von ungebundenen Antikörpern wird diese mit einer Chemolumineszenzlösung (*SuperSignal West*) in Verbindung gebracht. Die Lösung enthält ein Substrat, welches in Anwesenheit der an den Zweitantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase umgewandelt wird. Dies wiederum hat eine Lichtemission zur Folge, die über die Belichtung eines Hyperfilms nachgewiesen wird.

Alternativ zur Verwendung von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern können auch Zweitantikörper der Firma LI-COR[®] zum Einsatz kommen. Da diese nach Herstellerangaben mit Fluorophoren gekoppelt sind, senden sie von sich aus Licht spezifischer Wellenlängen im Nah-Infrarotbereich aus. Dadurch erübrigt sich eine anschließende Inkubation der Membran in der Chemolumineszenzlösung. Stattdessen wird das von diesen Antikörpern emittierte Licht über einen digitalen Scanner namens Odyssey[®] detektiert. Dabei müssen sich die Proteine statt auf der üblichen PVDF-Membran auf einer speziellen PVDP-Membran der Firma Millipore befinden.

3.4.5 Quantifizierung transferierter Proteine mittels Densitometrie

Proteinbanden eines Western-Blots (vgl. Kapitel 3.4.3 und 3.4.4) können mittels Densitometrie quantifiziert werden [Gassmann, Grenacher et al. 2009].

Zu diesem Zweck wurden Proteinbanden eingescannter Western-Blot-Filme durch „ImageJ 1.48“ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) einer densitometrischen Auswertung unterzogen. Dabei errechnete dieses frei erhältliche Programm über die Summe der in einer Bande enthaltenen Grauwerte für jede Bande einen Zahlenwert, der mit dem Schwärzungsgrad auf dem Film korreliert. Anschließend wurden die Zahlenwerte für die im Interesse stehenden Proteinbanden mit den zugehörigen Werten der jeweiligen Ladungskontrollen ins Verhältnis gesetzt.

3.5 Biologische Untersuchungen

3.5.1 Messung der proliferativen Aktivität von Zellen

Zur Messung der proliferativen Aktivität von Zellen kommt ein Verfahren zum Einsatz, bei dem das Tetrazolium-Salz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] eine wichtige Rolle spielt. Diese auch MTS genannte Substanz wird durch in metabolisch aktiven Zellen vorkommende Dehydrogenasen zu wasserlöslichem Formazan reduziert, dessen Quantität photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden kann. Die dabei gemessene Absorption ist direkt proportional zu der Anzahl von lebenden Zellen in der jeweils eingesetzten Kultur.

Konkret wurde bei diesem Verfahren nach den Angaben der Firma Promega vorgegangen, von der auch die theoretischen Informationen und der dabei verwendete CellTiter 96[®] AQUEOUS Non-Radioactive Cell Proliferation Assay stammen. Dementsprechend werden in die Vertiefungen von Flachboden-96-Loch-Platten jeweils 100 µl gegeben, die sich aus 9.000 Ba/F3-Zellen und farblosem RPMI-1640-Medium, dem bei Bedarf IL-3 zugefügt wird, zusammensetzen. Zusätzlich kann in diesem Volumen DMSO oder ein Inhibitor in der jeweils angegebenen Konzentration enthalten sein. Für die späteren Leerwertbestimmungen werden auch Löcher mit 100 µl purem Medium vorbereitet. Anschließend werden die Platten gemäß den allgemeinen Kulturbedingungen (vgl. Kapitel 3.3.1) für einen bestimmten Zeitraum in einem Inkubator gehalten. Im nächsten Schritt werden in jede zu messende Vertiefung 20 µl einer nach Herstellerangaben vorbereiteten Lösung gegeben, die das MTS enthält. Es erfolgt eine weitere Inkubation der Platten für zwei Stunden. Abschließend wird die Absorption bei 490 nm unter Zuhilfenahme eines ELISA-Platten-Readers bestimmt.

Von allen Proben wurden Dreifach-Messwerte erstellt, aus denen ein Mittelwert errechnet wurde.

4 Untersuchung der Kandidatengene SOCS1 und PTPLAD2 in einem Modell der FLT3-ITD-Kinase-unabhängigen Resistenz

4.1 Allgemeines zur FLT3-ITD-Mutation

4.1.1 Häufigkeit des Auftretens und Bedeutung

Während eine *Internal Tandem Duplication* (ITD) in der FLT3-Rezeptortyrosinkinase relativ selten bei Patienten, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) oder einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) erkrankt sind (<1 % und 3-5 %), nachgewiesen wird, findet sich diese Art der Mutation bei knapp einem Viertel aller an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) leidenden Menschen. Im Vergleich dazu lässt sich bei der AML eine Überexpression jener Kinase sogar in den meisten Fällen nachweisen [Small 2006; Gilliland et Griffin 2002].

Die AML, eine Neoplasie der Myelopoese, ist weniger eine einzelne Erkrankung, sondern vielmehr eine Gruppe von akuten Leukämien, die charakterisiert sind durch eine Proliferation und Akkumulation von unreifen hämatopoetischen Zellen sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut. Diese malignen Zellen verdrängen und inhibieren mit fortschreitendem Verlauf das Wachstum und die Differenzierung normaler erythrozytärer, myeloischer und megakaryozytärer Vorläuferzellen, was unbehandelt in der Regel innerhalb von Wochen bis Monaten zum Tode führt. Die Heterogenität der AML spiegelt sich in deren Einteilung wieder, die gemäß der WHO-Klassifikation anhand zytogenetischer, molekulargenetischer und morphologischer Veränderungen erfolgt [Miller 1995; Büchner, Niederwieser et al. 2010].

Ferner ist für die AML bekannt, dass das Auftreten einer FLT3-ITD-Mutation in den jeweiligen hämatopoetischen Zellen alleine nicht ausreichend ist, um die Erkrankung auszulösen. Wie alle zur Gruppe der Klasse-I-Mutationen gehörenden Vertreter verleiht auch die FLT3-ITD-Mutation den betroffenen Zellen einen Proliferations- bzw. Überlebensvorteil, ohne jedoch Einfluss auf die Differenzierung zu nehmen. Gemäß gängiger Lehrmeinung muss zur Entstehung einer akuten hämatopoetischen Neoplasie wie der AML zusätzlich zu einer Klasse-I-Mutation noch eine Klasse-II-Mutation hinzukommen. Klasse-II-Mutationen, die z.B. durch Translokationen mit Fusionspro-

teinbildung entstehen (z.B. AML1/ETO), bewirken primär eine Inhibition der hämatopoetischen Differenzierung [Gilliland et Griffin 2002; Lion et Kovar 2004]. Daher wird die AML im Gegensatz zur CML (vgl. Kapitel 5.1) zu den polygenetischen Erkrankungen gezählt [Small 2006]. Studienergebnisse belegen, dass der Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation bei bestimmten AML-Patienten unter 60 Jahren eine deutlich schlechtere Prognose nach sich zieht (vgl. Kapitel 4.1.3) [Gilliland et Griffin 2002].

4.1.2 Molekulargenetischer Hintergrund

4.1.2.1 Die FLT3-Rezeptortyrosinkinase und ihre ITD-Mutation

Die *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3), deren zugehöriges Gen auf Chromosom 13 zu verorten ist [Fathi et Chen 2011], wird wie c-KIT und PDGFR zur Klasse 3 der Rezeptortyrosinkinasen gezählt. Sie setzt sich zusammen aus einem extrazellulären ligandenbindenden Anteil, einer Transmembrandomäne, einer juxtamembranen Dimerisierungsdomäne und einer hochkonservierten intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, die durch ein Kinase-Insert unterbrochen wird [Meshinchi et Appelbaum 2009].

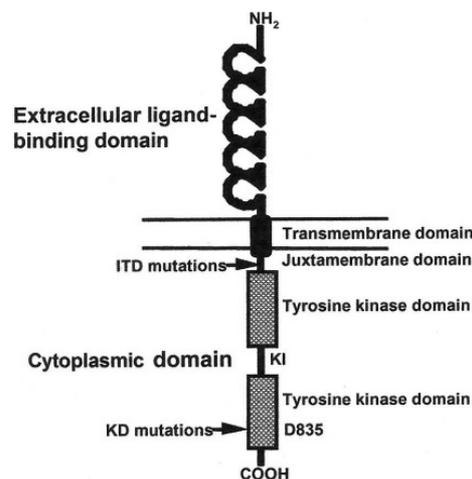


Abbildung 1: Aufbau von FLT3

FLT3 setzt sich aus einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen, wobei letztere sich in eine juxtamembranöse Dimerisierungsdomäne und eine Tyrosinkinasedomäne, welche durch ein Kinase-Insert unterbrochen wird, aufteilen lässt. Dabei sind die juxtamembranöse Dimerisierungsdomäne, in der ITD-Mutationen auftreten,

Dieser Vorgang ermöglicht es ATP-Molekülen sich an die dafür vorgesehenen Bindungsstellen anzulagern [Levis 2011] und führt dadurch zu einer Aktivierung der beiden beteiligten Tyrosinkinase, die im weiteren Ablauf mehrere Stellen der intrazellulären Kinase-Moiety phosphorylieren. An den so veränderten Bereichen des FLT3-Dimers bilden sich unter Beteiligung von Adaptorproteinen (z.B. GRB2 oder SHC-Proteine) verschiedene Proteinkomplexe, innerhalb derer es zu Protein-Proteininteraktionen kommt. Manche der dabei beteiligten Eiweiße werden auf diese Art und Weise in einen aktiven Zustand versetzt, was wiederum eine Kaskade an Phosphorylierungsreaktionen nach sich zieht. Im Rahmen dessen kommt es zu einer Aktivierung sekundärer Mediatoren, wodurch die stromabwärts gerichteten Signaltransduktionswege STAT, MAP-Kinase (ERK) und AKT/PI3-Kinase aktiviert werden. So gelangen verschiedene Transkriptionsmediatoren in den Kern und nehmen dort Einfluss auf die Regulation der Zelldifferenzierung, der Proliferation oder auch der Apoptose [Meshinchi et Appelbaum 2009; Grafone, Palmisano et al. 2012].

Zusätzlich ist bekannt, dass zur Gewährleistung einer optimalen FLT3-Funktion innerhalb einer gesunden Zelle das koordinierte Zusammenspiel weiterer Wachstumsfaktoren, zu denen der Stammzellfaktor SCF oder Interleukin 3 zu zählen sind, benötigt wird [Meshinchi et Appelbaum 2009].

Während die Wildtyp-Form der FLT3-Rezeptortyrosinkinase, wie eben beschrieben, nur in Anwesenheit des Liganden FL aktiviert wird, ist die ITD-Form dieses Moleküls konstitutiv aktiv. Das liegt daran, dass die auf DNA-Ebene zugrunde liegenden *Internal Tandem Duplications*, welche durch Verdopplung eines DNA-Fragments zustande kommen, innerhalb der für die juxtamembranöse Membran kodierenden Region liegen (Abbildung 1). Dabei besteht eine gewisse Variabilität hinsichtlich der Lage und Ausdehnung (von 3 bis über 400 Basenpaare) jener genetischen Veränderungen. Diese führen laut in-vitro-Studien dazu, dass die daraus hervorgehenden FLT3-ITD-Proteine ligandenunabhängig dimerisieren und so fortwährend aktiviert werden. Davon betroffene Zellen zeichnen sich unter anderem durch eine zytokinunabhängige Proliferation aus, die auch für Mutationen innerhalb der Tyrosinkinasedomäne (FLT3-TKD) beschrieben ist [Meshinchi et Appelbaum 2009].

Diese eben dargelegte und weitestgehend als klassisch anzusehende Theorie der konstitutiven und ligandenunabhängigen Aktivierung einer ITD-mutierten FLT3-

Rezeptortyrosinkinase ist nicht unumstößlich. Gemäß dieser Lehrmeinung dürften unterschiedliche Level an FL bei der FLT3-ITD-Form bezüglich der Aktivierung keine Rolle spielen. Dennoch weisen Untersuchungen darauf hin, dass FLT3-ITD-Rezeptortyrosinkinasen nur einen geringen Grad an Autophosphorylierung aufweisen, wenn sie in Zellen exprimiert werden, die keinerlei Liganden dieser Art vorweisen. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine ITD-Mutation in FLT3/ITD statt einer Unabhängigkeit eher eine Hypersensibilität gegenüber dem Liganden FL induziert [Levis 2011].

4.1.2.2 Die Rolle von JAK2, STAT5 und SOCS1 in FLT3-ITD-positiven Zellen

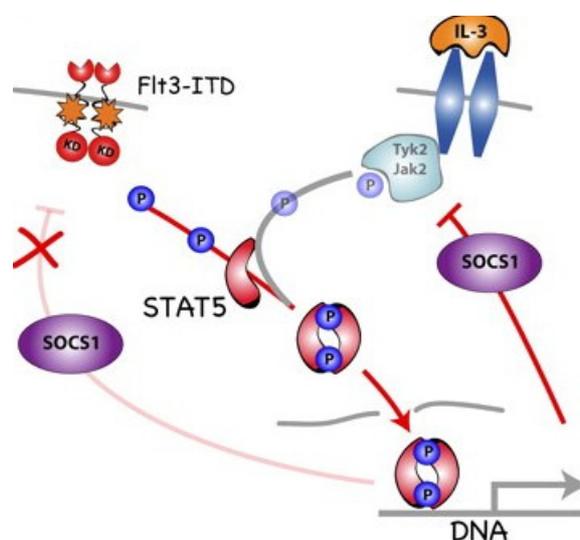


Abbildung 3: FLT3-ITD aktiviert STAT5 direkt und unterliegt dabei keiner negativen Rückkopplung durch SOCS1

FLT3-ITD aktiviert mittels Phosphorylierung direkt STAT5-Proteine, welche in diesem Zustand auf DNA-Ebene die Transkription von Zielgenen (u. a. SOCS1) hochregulieren. Translatierte SOCS1-Proteine fungieren nun als negative Regulatoren von STAT5, indem sie die Januskinase 2 (JAK2), welche ebenfalls STAT5-Moleküle phosphoryliert, z.B. am IL-3-Rezeptor inhibieren. Die direkte Aktivierung von STAT5 über FLT3-ITD bleibt von diesem negativen Rückkopplungsmechanismus jedoch unberührt [Choudhary, Brandts et al. 2007].

STAT-Proteine (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) fungieren als Transkriptionsfaktoren, die nach ihrer Aktivierung durch Tyrosinkinasen im phosphorylierten Zustand aus dem Cytoplasma in den Zellkern übertreten, wo sie im Zusammenspiel mit anderen Coaktivatoren zu einer erhöhten Transkriptionsrate ihrer Zielgene führen [Bromberg et Darnell 2000].

Dieser Mechanismus ist auch für das Protein STAT5 belegt (vgl. Abbildung 3), welches dadurch nachweislich zur zytokinunabhängigen Proliferation von FLT3-ITD-positiven Zellen beiträgt [Mizuki, Fenski et al. 2000]. In diesem Zusammenhang belegen in-vitro-Versuche, dass FLT3-ITD, im Gegensatz zur FLT3-Wildtyp-Form, STAT5-Moleküle direkt mittels Phosphorylierung aktiviert. Dem weiteren molekularen Mechanismus folgend gelangen nun derartige pSTAT5-Proteine als Dimere in den Zellkern, wo sie auf DNA-Ebene die Expression ihrer (wachstumsassoziierten) Zielgene forcieren [Choudhary, Brandts et al. 2007]. Unter diesen Genen befindet sich auch SOCS1, das einen negativen Feedbackmechanismus induziert. Fertige SOCS1-Moleküle dienen so als negative Regulatoren von STAT5, indem sie die Januskinase 2 (JAK2), welche neben JAK1, JAK3 und TYK2 ebenfalls STAT5-Proteine am IL-3-Rezeptor phosphoryliert, inhibieren. Der IL-3-Rezeptor selbst weist keine katalytische Aktivität auf [Choudhary, Brandts et al. 2007; Reddy, Korapati et al. 2000].

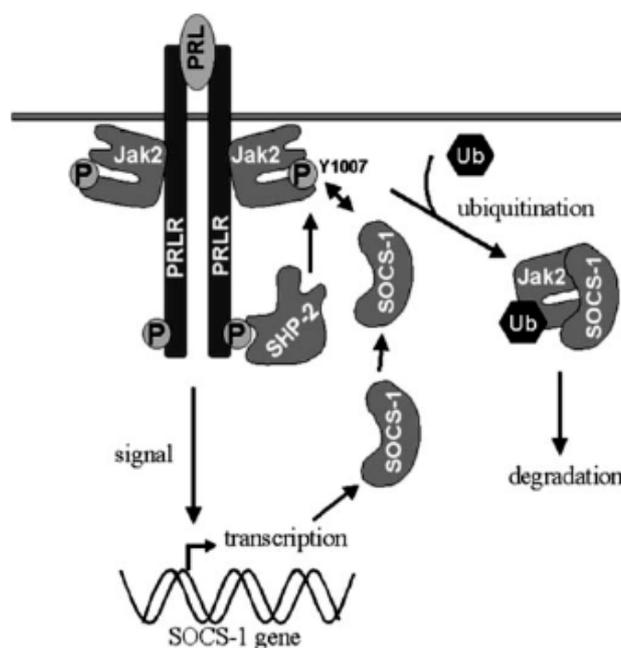


Abbildung 4: Abbau von pJAK2 durch SOCS1

pJAK2 forcieren (mittels STAT5) auf DNA-Ebene die Expression von SOCS1, welches wiederum pJAK2 über Ubiquitinierungsreaktionen einem proteasomalen Abbau zuführt (negativer Feedbackmechanismus) [Ali, Nouhi et al. 2003].

Dabei, so legen in-vitro-Experimente nahe, bindet SOCS1 über die SH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin-1007 in der Aktivierungsschleife von JAK2 und hemmt auf diese Weise die katalytische Aktivität dieser Kinase. Darüber hinaus wird der so

entstandene JAK2-SOCS1-Komplex Ziel von zellulären Ubiquitinierungsreaktionen, worüber JAK2 einem proteasomalen Abbau zugeführt wird (vgl. Abbildung 4) [Ali, Nouhi et al. 2003].

Die direkte Aktivierung von STAT5 über FLT3-ITD bleibt von diesem negativen Rückkopplungsmechanismus unberührt [Choudhary, Brandts et al. 2007], was das onkogene Potential von FLT3-ITD zusätzlich unterstreicht.

4.1.3 FLT3-Inhibitoren bei der Behandlung der AML

Bekanntermaßen wird die AML, die hämatologische Erkrankung, bei der am häufigsten eine FLT3-ITD-Mutation nachgewiesen wird (vgl. Kapitel 4.1.1), traditionell mit Chemotherapien und Stammzelltransplantationen behandelt [Fathi et Chen 2011]. In diesem Zusammenhang konnte Fröhling [Fröhling, Schlenk et al. 2002] in einem homogenen Kollektiv von an AML erkrankten Erwachsenen im Alter zwischen 16 und 60 Jahren, die mit einer Induktionstherapie gefolgt von einer Postremissionstherapie behandelt wurden, zeigen, dass Patienten mit einer FLT3-ITD-Mutation nach 36 Monaten mit nur 13 % eine signifikant geringere Überlebensrate hatten gegenüber Patienten, bei denen keine FLT3-Mutation festgestellt wurde (21 %). Die Überlebensrate aller AML-Patienten nach diesem Zeitraum lag bei 19 %. Des Weiteren wurden bei dieser Untersuchung Vorteile hinsichtlich der Remissionsdauer bei Patienten ohne FLT3-Mutation festgestellt. So befanden sich nach initialer Erreichung einer kompletten Remission nach 36 Monaten noch 23 % der AML-Patienten ohne FLT3-Mutation in diesem Stadium, im Vergleich zu nur 13 % in der FLT3-ITD-Gruppe, wobei die initialen Remissionsraten bei 76 % (ohne FLT3-Mutation) und 65 % (mit FLT3-ITD-Mutation) lagen. Ergänzend dazu zeigte Thiede [Thiede, Steudel et al. 2002], dass insbesondere FLT3-ITD-positive Patienten mit einem durch PCR-Amplifikation bestimmten Verhältnis von mutierter zu unmutierter FLT3-Rezeptortyrosinkinaseform von über 0,78 eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens haben im Vergleich zu FLT3-ITD-positiven Patienten mit einem Verhältnis von unter 0,78. Dabei lassen sich die Überlebensraten der letzten Gruppe vergleichen mit denen von AML-Patienten ohne ITD-Mutation.

Aufgrund solcher Daten wurden FLT3-selektive Inhibitoren entwickelt, von denen einige in klinischen Studien in Bezug auf ihre Wirksamkeit erprobt wurden [Fathi et Chen 2011].

Es konnte gezeigt werden, dass FLT3-Inhibitoren der ersten Generation als Monotherapie bei der Behandlung von Patienten mit einer therapierefraktären oder rückfälligen AML keine durchgreifenden und nachhaltigen Effekte erzielen können [Wander, Levis et al. 2014]. So weisen drei diesbezügliche Phase-I-Studien mit Sorafenib [Borthakur, Kantarjian et al. 2011; Pratz, Cho et al. 2010; Zhang, Konopleva et al. 2008] nur sehr geringe Raten an kompletten Remissionen aus (<10 %), wogegen in zwei Studien mit Midostaurin als Monotherapie [Stone, DeAngelo et al. 2005; Fischer, Stone et al. 2010] kein einziger Fall einer kompletten Remission zu beobachten war. Eine retrospektive Sorafenib-Monotherapie-Studie [Metzelder, Schroeder et al. 2012] an FLT3-ITD-positiven AML-Patienten weist in diesem Zusammenhang mit 23 % die höchste Rate an kompletten Remissionen aus. Im Vergleich dazu treten in allen sechs Studien deutlich häufiger signifikante Blastenreduktionen im peripheren Blut oder auch im Knochenmark auf, wobei dies bei Metzelder [Metzelder, Schroeder et al. 2012] in über 90 % der Fälle bei Patienten mit einer FLT3-ITD-positiven AML der Fall ist. Diese Behandlungserfolge sind in der Regel nur kurzfristig und treten vorwiegend bei Patienten mit FLT3-ITD-Mutationen auf. Deutlich höhere Remissionsraten inklusive eines vergleichsweise hohen Anteils an Komplettremissionen bei der Behandlung von Patienten mit therapierefraktären oder rückfälligen akuten myeloischen Leukämien zeigen dagegen erste Studien [Cortes, Kantarjian et al. 2013; Levis, Perl et al. 2012] für Quizartinib, einem FLT3-Inhibitor der zweiten Generation. So weist Levis [Levis, Perl et al. 2012] für Quizartinib als Monotherapie eine Rate an Komplettremissionen von 44 % bei FLT3-ITD-positiven AML-Patienten nach, währenddessen sie bei Patienten ohne diese Mutation bei 34 % liegt. Die in diesem Zusammenhang erreichten medianen Remissionsdauern werden mit 11,3 (ITD+) bzw. 5,0 (ITD-) Wochen angegeben. Somit erzielen FLT3-Inhibitoren als alleinige Therapie der AML nicht annähernd die Wirksamkeit, wie sie für Tyrosinkinaseinhibitoren bei der Behandlung der CML nachgewiesen ist (vgl. Kapitel 5.1.6).

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurden Studien initiiert, die der Frage nach synergistischen Effekten bei der Kombination von FLT3-Inhibitoren und klassischen Chemotherapeutika nachgingen. Erste Resultate weisen darauf hin, dass unter be-

stimmten Voraussetzungen sowohl Sorafenib (Ravandi, Alattar et al. 2013) als auch Midostaurin (Stone, Fischer et al. 2012) möglicherweise einen zusätzlichen Benefit bringen, wobei eine abschließende Klärung dieser Fragestellung nur durch weitere Studien erreicht werden kann.

Während der exakte Nutzen von Midostaurin bei der Therapie einer AML weiter unklar bleibt, findet dieses Medikament auch in dieser Arbeit seine Verwendung. Dabei wurde das Staurosporin-Derivat ursprünglich als Hemmer der Proteinkinase C entdeckt. Es stellte sich heraus, dass diese Substanz auch inhibitorische Eigenschaften gegenüber den Kinasen VEGFR, PDGFR, c-Kit und FLT3 aufweist. Zusätzlich zeichnet sich PKC412 durch eine ausgesprochene Zytotoxizität gegenüber FLT3-ITD-Zelllinien aus [Fathi et Chen 2011].

4.2 Fragestellung

Der bisweilen überschaubare klinische Erfolg von FLT3-Inhibitoren (vgl. Kapitel 4.1.3) bei der Behandlung hämatologischer Neoplasien wird nicht zuletzt auf zelluläre Resistenzmechanismen zurückgeführt [Moore, Faisal et al. 2012], deren Existenz auch bei der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (vgl. Kapitel 5.1.6) eine Rolle spielt. Dementsprechend spricht ein kleinerer Teil der Patienten mit AML von vornherein auf FLT3-Hemmer nicht an (primäre Resistenz), wogegen in der Mehrzahl der Fälle erst nach einem initialen Therapieerfolg eine Resistenz auftritt (sekundäre Resistenz) [Breitenbuecher, Markova et al. 2009].

Als eine Ursache für ein derartiges Therapieversagen gelten Mutationen im FLT3-ITD-Gen, deren Auftreten bereits in-vitro [Williams, Nguyen et al. 2013; von Bubnoff, Engh et al. 2009] als auch in einzelnen Fällen in-vivo [Breitenbuecher, Markova et al. 2009; Heidel, Solem et al. 2006; von Bubnoff, Rummelt et al. 2010] nachgewiesen wurde. In diesem Zusammenhang wird berichtet, dass Zellen, die eine solche resistenzverursachende Mutation aufweisen, auch in Anwesenheit eines FLT3-Inhibitors aktive FLT3-Rezeptortyrosinkinasen vorweisen [Williams, Nguyen et al. 2013; von Bubnoff, Engh et al. 2009; Heidel, Solem et al. 2006].

Darüber hinaus wird angenommen, dass auch eine FLT3-Überexpression und eine Aktivierung kompensatorischer Signalwege die Effizienz einer FLT3-Inhibitor-

Therapie deutlich einschränken können [Breitenbuecher, Markova et al. 2009]. Da über derartige alternative Resistenzmechanismen wenig bekannt ist, ist deren Erforschung von hoher klinischer Relevanz.

Aus diesem Grund sollen im Rahmen dieser Arbeit an einem Modell FLT3-ITD-Kinase-unabhängiger Resistenz mögliche neue Resistenzmechanismen gegenüber FLT3-Inhibitoren aufgedeckt werden. Zu diesem Zweck werden zwei Zellklone C7 und C10 herangezogen, die in einem Resistenzscreening von FLT3-ITD-positiven Ba/F3-Zellen (Mig EGFP FLT3-ITD) [von Bubnoff, Engh et al. 2009] generiert wurden. Im Rahmen dieses Screenings wurden Tyrosinkinaseinhibitor-resistente Zellklone erzeugt, die auf Sekundärmutationen innerhalb ihrer FLT3-ITD-Kinasedomäne untersucht wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass jeder der drei verwendeten Tyrosinkinaseinhibitoren (PKC412, Sorafenib und Sunitinib) ein ganz charakteristisches Profil an sekundären Resistenzmutationen innerhalb der FLT3-ITD-Kinasedomäne hervorruft, wobei sich die Profile untereinander kaum überlappen. Innerhalb dieser Untersuchungen zeigten die Klone C7 und C10 eine ausgesprochene Resistenz gegenüber PKC412, obwohl keine sekundären Resistenzmutationen innerhalb der FLT3-ITD-Kinasedomäne nachweisbar waren.

Eine bereits für die Klone C7 und C10 vorliegende Genexpressionsanalyse (Abbildung 5; erzeugt mittels Atlas arrays der Firma Clontech) zeigt in diesem Zusammenhang eine auffällige Expression der Gene SOCS1 und PTPLAD2 im Klon C10 im Vergleich zu C7 und nicht resistenten FLT3-ITD-Kontrollzellen (im Folgenden ITD genannt).

Die Expressionslevel an SOCS1 in C10 gegenüber C7 und ITD sind deutlich erhöht, während die Level an PTPLAD2 in C10 im Vergleich erniedrigt sind.

Somit sind SOCS1 und PTPLAD2 im Klon C10 mögliche Kandidatengene für eine FLT3-ITD-Kinase-unabhängige Resistenz. Ob die veränderte Expression dieser Gene in C10 tatsächlich in Zusammenhang mit der beobachteten PKC412-Resistenz steht, soll im Folgenden geklärt werden.

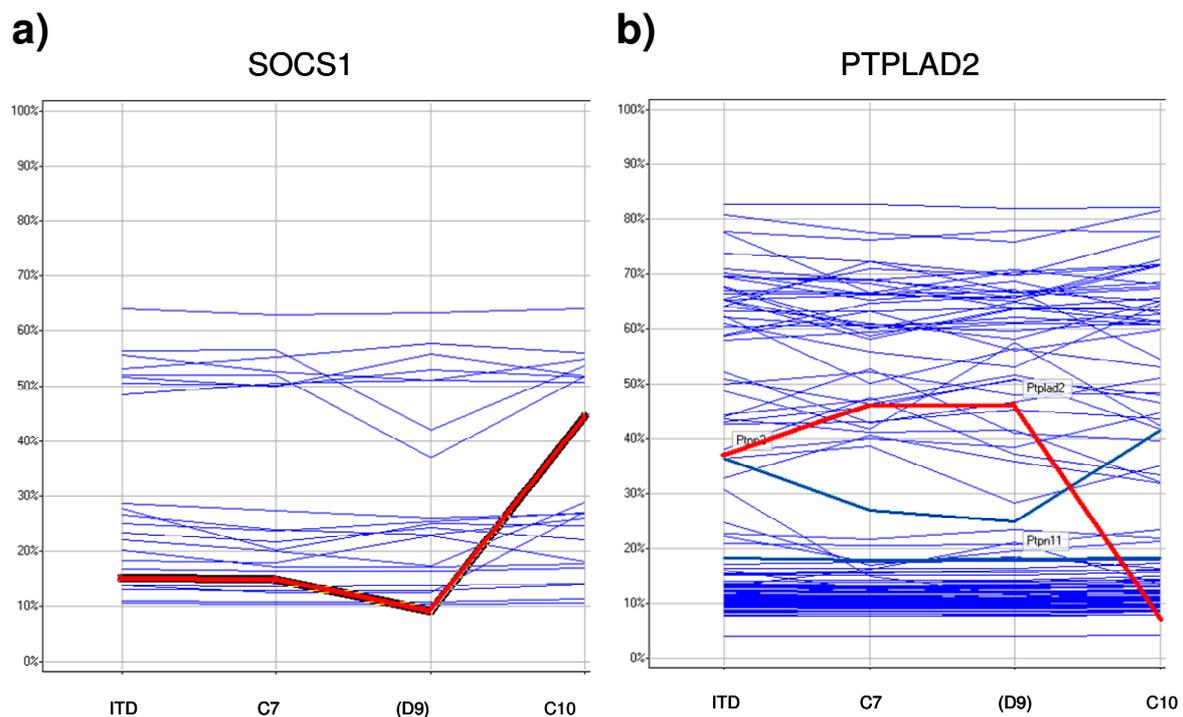


Abbildung 5: C10: Überexpression von SOCS1 und deutlich reduzierte Expression von PTPLAD2

a. Die rot eingefärbte Kurve zeigt die gegenüber einem Kontrollgen relative Expression von SOCS1 in ITD, C7, D9 (ein in dieser Arbeit nicht weiterverwendeter Klon) und C10 in einer Genexpressionsanalyse.

b. Die rot eingefärbte Kurve zeigt die gegenüber einem Kontrollgen relative Expression von PTPLAD2 in ITD, C7, D9 (ein in dieser Arbeit nicht weiterverwendeter Klon) und C10 in einer Genexpressionsanalyse.

Da SOCS1 innerhalb des FLT3-ITD-Signalwegs eine wichtige Rolle einnimmt (vgl. Kapitel 4.1.2.2), soll dieser in C10 näher untersucht werden. Dabei ist vor allem zu prüfen, inwieweit auch (p)JAK2 und (p)STAT5 in ihrer Expression verändert sind. PTPLAD2 (*Protein Tyrosine Phosphatase-Like A Domain containing 2*) wurde dagegen in der einschlägigen Literatur bisher nicht in Zusammenhang mit der FLT3-ITD-Mutation beschrieben. Nach bisherigen Erkenntnissen scheint das PTPLAD2-Gen, das laut Webseite des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; www.ncbi.nlm.nih.gov) auf dem menschlichen Chromosom 19 zu verorten ist, eine Rolle bei der Entstehung sehr langkettiger Fettsäuren zu spielen. Dort, so legen in-vitro-Experimente nahe, katalysiert das aus diesem Gen hervorgehende Protein als 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase eine Reaktion, die zur Verlängerung langkettiger Fettsäuren beiträgt [Ikeda, Kanao et al. 2008].

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Validierung der Genexpressionsdaten von SOCS1 und Darstellung zugehöriger Interaktionspartner

Um zu klären, ob die Überexpression von SOCS1 in C10 in Zusammenhang mit der beobachteten PKC412-Resistenz steht (vgl. Kapitel 4.2), wird in einem ersten Schritt die Expression von SOCS1 in ITD, C7 und C10 auf Proteinebene validiert, bei gleichzeitiger Darstellung der zugehörigen Interaktionspartner (p)JAK2 und (p)STAT5 (vgl. Kapitel 4.1.2.2).

Zu diesem Zweck wurden die Proteinmengen von SOCS1, (p)JAK2 und (p)STAT5 in ITD, C7 und C10 mittels Western-Blot bestimmt (Abbildung 6).

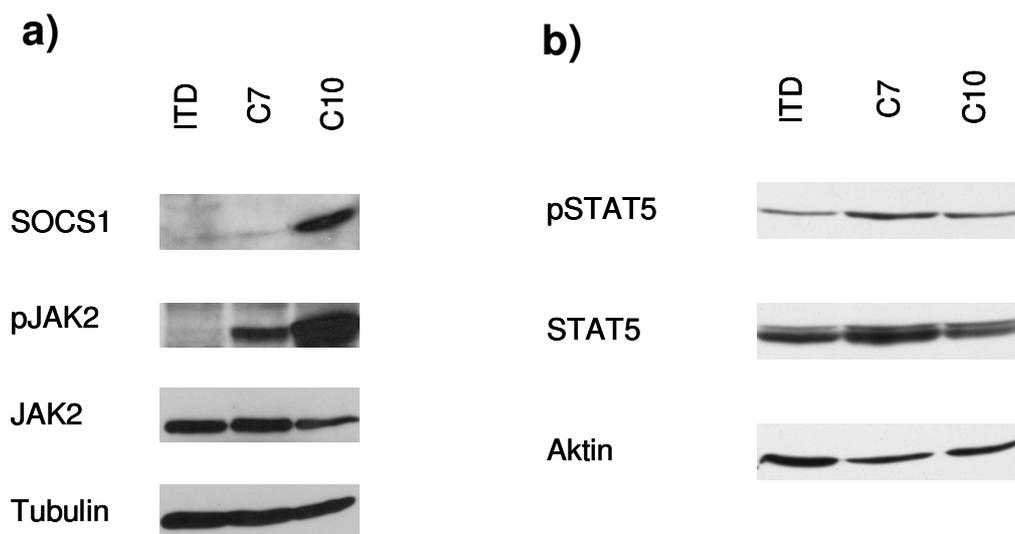


Abbildung 6: C10 exprimiert gegenüber ITD und C7 erhöhte Proteinmengen an SOCS1 und pJAK2

a. Ba/F3-Zellen (ITD, C7 und C10) wurden geerntet und deren Zelllysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem anti JAK2-Antikörper, einem anti pJAK2-Antikörper, einem anti SOCS1-Antikörper und einem anti α -Tubulin-Antikörper als Ladungskontrolle.

b. Ba/F3-Zellen (ITD, C7 und C10) wurden geerntet und deren Zelllysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem anti STAT5-Antikörper, einem anti pSTAT5-Antikörper und einem anti α - β -Aktin-Antikörper als Ladungskontrolle.

Dieses Experiment bestätigt auf Proteinebene, dass analog des in Kapitel 4.2. vorgestellten Genexpressionsarrays SOCS1 in C10 gegenüber ITD und C7 deutlich erhöht ist. Die Analyse der Interaktionspartner (p)JAK2 und (p)STAT5 ergab, dass C10

mehr phosphorylierte JAK2-Proteine aufweist, während die Menge an unphosphoryliertem JAK2 in allen drei Zellklonen ähnlich hoch erscheint. Des Weiteren sind in ITD, C7 und C10 vergleichbare STAT5-Level zu erkennen, wogegen pSTAT5 in C7 etwas vermehrt vorkommt.

Bemerkenswert an diesen Resultaten ist die Tatsache, dass pJAK2 in C10 hochreguliert ist. Eine abnorme Aktivierung dieses Proteins, welches unter anderem als Tyrosinkinase am IL-3-Rezeptor STAT5-Proteine phosphoryliert (vgl. Kapitel 4.1.2.2), wird in der einschlägigen Literatur [Mahon 2005] in Verbindung gebracht mit der Entstehung von myeloproliferativen Erkrankungen. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die gleichzeitige Anwesenheit hoher SOCS1-Level, obwohl die phosphorylierte Form von JAK2 durch SOCS1 einem proteasomalen Abbau zugeführt wird (vgl. Kapitel 4.1.2.2).

Da der Grund für die eben beschriebene Überexpression von pJAK2 in C10 völlig unklar ist, soll im Folgenden untersucht werden, ob ein gestörter (p)JAK2-Abbau als Ursache hierfür in Frage kommt.

4.3.2 Untersuchung des (p)JAK2-Abbaus mittels Cycloheximid

Um zu klären, ob ein gestörter (p)JAK2-Abbau ursächlich ist für die hohen (p)JAK2-Level in C10 (vgl. Kapitel 4.3.1), wurde mittels Cycloheximid (vgl. Kapitel 3.3.7) die Proteinbiosynthese in ITD, C7 und C10 blockiert. Dadurch konnte der Abbau von pJAK2 und JAK2 mittels Western-Blot über einen Zeitraum von sechs Stunden beobachtet werden, ohne dass dieser Prozess von einem im Normalfall gleichzeitig ablaufenden Proteinaufbau überlagert wurde (Abbildung 7). Anschließend wurden die Western-Blot-Banden durch Densitometrie (vgl. Kapitel 3.4.5) quantifiziert (Abbildung 8).

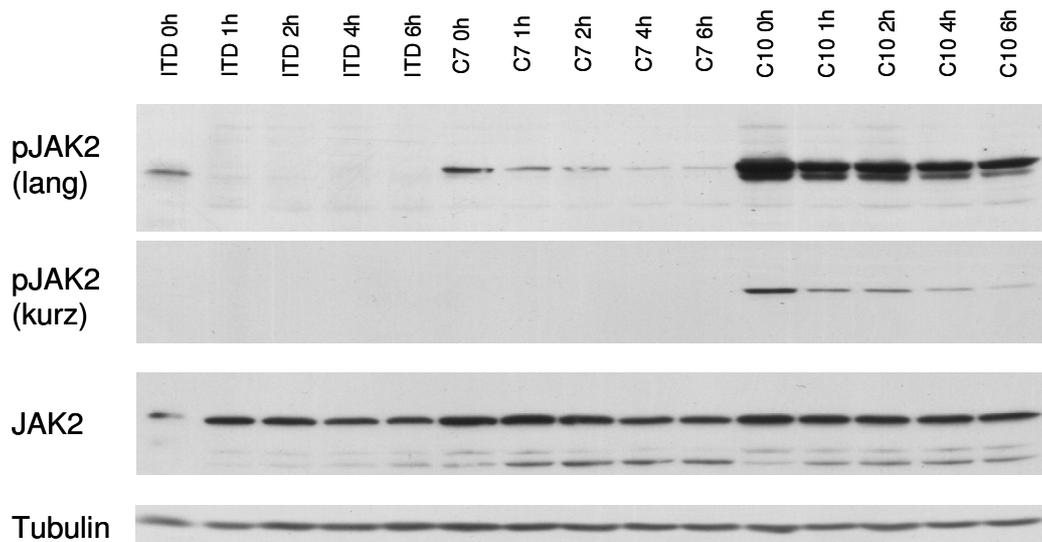
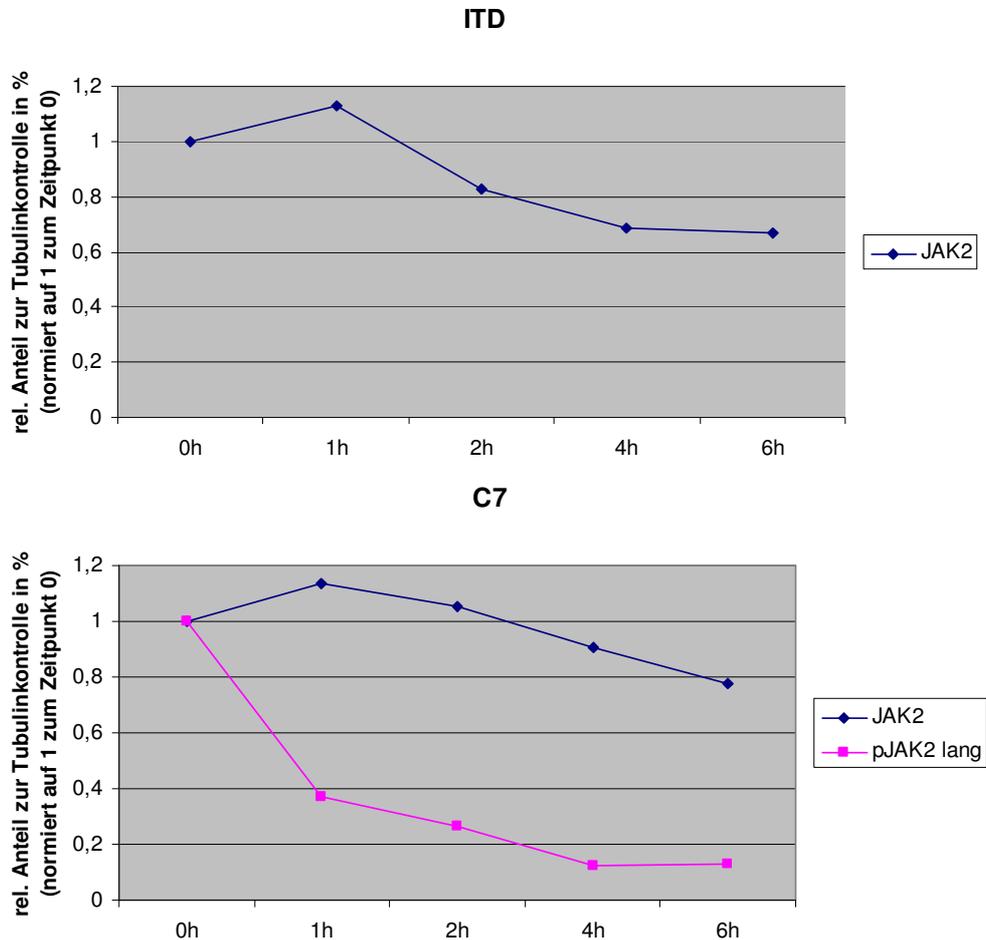


Abbildung 7: Western-Blot des Cycloheximid-Versuchs

Ba/F3-Zellen (ITD, C7 und C10) wurden mit Cycloheximid behandelt (vgl. Kapitel 3.3.7), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die zugehörigen Zelllysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem anti pJAK2-Antikörper (2 unterschiedliche Entwicklungszeiten), einem anti JAK2-Antikörper und einem anti α -Tubulin-Antikörper als Ladungskontrolle.



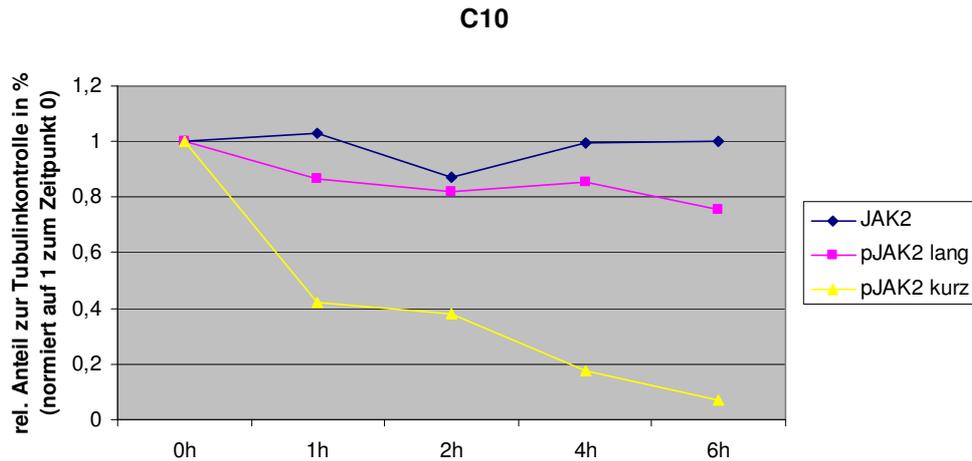


Abbildung 8: Identischer Abbau von pJAK2 in C7 und C10, verzögerter Abbau von JAK2 in C10

Die Proteinbanden aus Abbildung 7 wurden mittels Densitometrie quantifiziert (siehe Kapitel 3.4.5). Die vorliegende Abbildung zeigt so ermittelte Zahlenwerte für den Schwärzungsgrad der jeweiligen Proteinbanden, sortiert nach Zellklon (ITD, C7 und C10) und Zeitpunkt. Dabei ist die als Artefakt anzusehende pJAK2-Bande für ITD zum Zeitpunkt 0h in dieser Darstellung nicht abgebildet.

Aus Abbildung 8 ist zu entnehmen, dass die Proteinmengen an JAK2 nach sechs-stündiger Expositionsdauer gegenüber dem Translationshemmer Cycloheximid in ITD und C7 auf unter 80 % der Ausgangsmengen abgesunken sind, während sie in C10 im gesamten Beobachtungszeitraum mehr oder weniger konstant bleiben. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass der Abbau von JAK2 (vgl. Kapitel 4.1.2.2) im Klon C10 gehemmt sein könnte.

Vergleicht man zusätzlich in Abbildung 7 und Abbildung 8 pJAK2 in C7 (lange Entwicklungszeit) und C10 (kurze Entwicklungszeit), so muss die Abbaurate des phosphorylierten JAK2-Proteins in beiden Klonen als identisch angesehen werden.

Während demnach ein gestörter (p)JAK2-Abbau als Ursache für die hohen pJAK2-Level in C10 ausscheidet, könnte einer an diesem Punkt neu entstandenen Theorie folgend die niedrige Expression von PTPLAD2 (*Protein Tyrosine Phosphatase-Like A Domain containing 2*) (vgl. Kapitel 4.2) kausal dafür in Frage kommen. Es wäre möglich, dass PTPLAD2 als Phosphatase pJAK2 dephosphoryliert. Somit würden sich die hohen pJAK2-Level in C10 durch die niedrigen PTPLAD2-Level erklären lassen.

Trifft diese Theorie zu und wären die hohen pJAK2-Level Ursache für die PKC412-Resistenz in C10, dann müsste eine Normalisierung der PTPLAD2-Level in C10 eine Resensibilisierung dieses Klons gegenüber PKC412 zur Folge haben.

4.3.3 Validierung der Genexpressionsdaten von PTPLAD2 und PTPLAD2-Überexpression

Um der Hypothese eines durch niedrige PTPLAD2-Level induzierten PKC412-Resistenzmechanismus in C10 (vgl. Kapitel 4.3.2) nachzugehen, werden zuerst die Expressionsdaten von PTPLAD2 aus Kapitel 4.2 verifiziert und im Anschluss PTPLAD2 in ITD, C7 und C10 überexprimiert. Daraufhin werden die neu entstandenen Klone auf ihre Sensibilität gegenüber PKC412 getestet.

4.3.3.1 Validierung der Genexpressionsdaten von PTPLAD2

Um die PTPLAD2-Expressionsdaten zu bestätigen, wurde das entsprechende Gen auf RNA-Ebene in ITD, C7 und C10 mittels RT-PCR (vgl. Kapitel 3.1.3) quantifiziert (Abbildung 9).

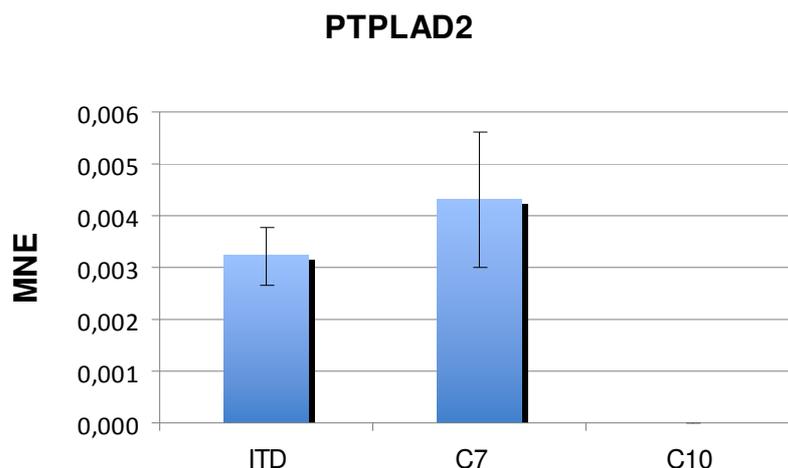


Abbildung 9: C10 exprimiert extrem wenig bzw. kein PTPLAD2

Aus Ba/F3-Zellen (ITD, C7 und C10) isolierte RNA (vgl. Kapitel 3.1.10) wurde in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel 3.1.11). Im Anschluss wurden aus diesem Material die Expressionslevel des Gens PTPLAD2 mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (vgl. Kapitel 3.1.3). Die statistische Auswertung erfolgte auf Basis der *Mean Normalized Expression* (MNE) [Simon 2003], wobei das Gen GAPDH als Referenz diente.

Als Ergebnis dieses Experiments kann festgehalten werden, dass analog des in Kapitel 4.2 vorgestellten Genexpressionsarrays PTPLAD2 in C10 gegenüber ITD und C7 deutlich erniedrigt bzw. nicht nachweisbar ist.

Ein Nachweis auf Proteinebene konnte dagegen nicht erfolgen, da der damals einzige zur Verfügung stehende Antikörper (Firma Abcam), der in der Lage sein sollte,

murines PTPLAD2 zu binden, nur unspezifische Banden anzeigte. Ein spezifischer Nachweis auf der Höhe von ca. 28 kDa konnte nicht erbracht werden.

4.3.3.2 PTPLAD2-Überexpression und Testung der neu entstandenen Klone auf ihre PKC412-Sensibilität

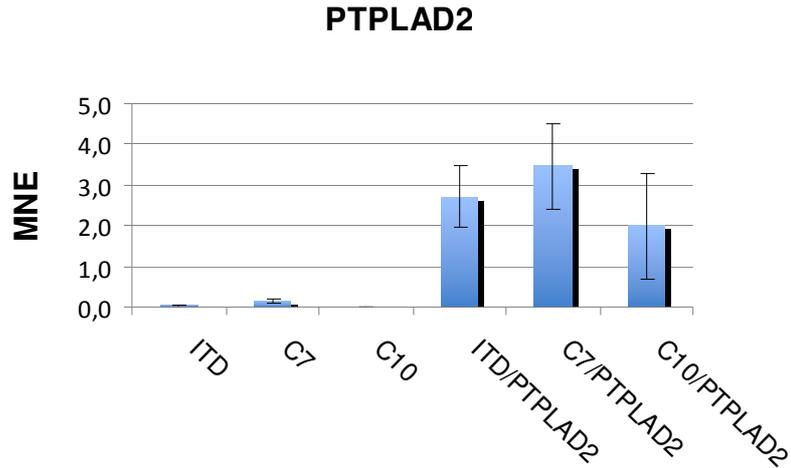
Im Anschluss sollte nun PTPLAD2 in ITD, C7 und C10 überexprimiert werden. Zuvor durchgeführte Sequenzierungen ergaben keine genetischen Unterschiede von PTPLAD2 im C7-Klon im Vergleich zu PTPLAD2 in den ITD-Zellen. Eine Sequenzierung der PTPLAD2-cDNA in C10 Zellen war nicht möglich, was auf die extrem niedrige Expression jenes Gens in C10 zurückgeführt wurde.

So wurde zuerst zur Vervielfältigung von murinem PTPLAD2 eine PCR durchgeführt, bei der cDNA von 3T3-Zellen (zur Verfügung gestellt von Richard Huss) als *template* diente. Im Rahmen einer zweiten PCR, bei der das Produkt der ersten PCR als Vorlage benutzt wurde, konnte der PTPLAD2-Sequenz neben den beiden Schnittstellen BamHI (bzw. EcoRI) und Sall ein HA-Tag flankierend zur Seite gestellt werden. Das daraus hervorgehende Konstrukt wurde über BamHI und Sall in den Vektor pBABE-puro subkloniert. Nach Überprüfung des Klonierungserfolges mittels Sequenzierung wurde der so entstandene Vektor pBABE-puro + PTPLAD2 in die ITD-Zellen, in C7 und in C10 retroviral transfiziert (vgl. Kapitel 3.3.5.2), bevor die daraus hervorgehenden Zellen selektioniert wurden (vgl. Kapitel 3.3.6.2).

Im weiteren Verlauf gelang es nicht, zur Überprüfung der Transfektion das HA-Tag in den jeweiligen Zellen immunhistochemisch nachzuweisen. Weder ein an das 5'-Ende noch ein an das 3'-Ende kloniertes HA-Tag konnte mittels Western-Blot detektiert werden, obwohl eine Positivprobe das gewünschte Resultat lieferte. Ein geeigneter PTPLAD2-Antikörper stand, wie bereits in Kapitel 4.3.3.1 erwähnt, ebenfalls nicht zur Verfügung.

Aus diesem Grund wurde die PTPLAD2-Expression zur Bestimmung des Transfektionserfolges über eine quantitative RT-PCR gemessen. Anschließend konnten Messungen bezüglich der proliferativen Aktivität durchgeführt werden, um das Wachstumsverhalten der PTPLAD2-überexprimierenden Zellen in Anwesenheit von PKC412 zu bestimmen (Abbildung 10).

a)



b)

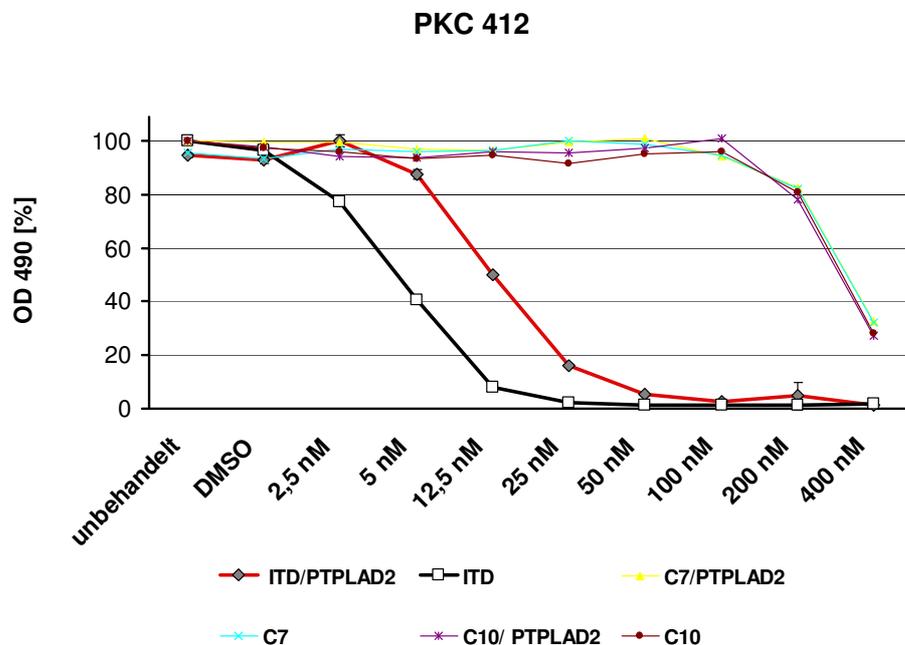


Abbildung 10: Die PTPLAD2-Überexpression in C10 führt zu keiner Wiederherstellung der Sensibilität gegenüber PKC412

a. Aus Ba/F3-Zellen (ITD, C7 und C10), transfiziert mit dem pBABEpuro + PTPLAD2-Konstrukt oder zur Kontrolle ohne Transfektion, isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurden aus diesem Material die Expressionslevel des Gens PTPLAD2 mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte auf Basis der *Mean Normalized Expression* (MNE) [Simon 2003], wobei die „TATA-Box“ als Kontrollgen diente.

b. Es wurden, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, Messungen bezüglich der proliferativen Aktivität von Ba/F3-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Ba/F3-Zellen (ITD, C7 und C10), transfiziert mit dem pBABEpuro + PTPLAD2-Konstrukt oder zur Kontrolle ohne Transfektion, PKC412 in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Abbildung zeigt die gemessenen optischen Dichten bei 490 nm in Prozent nach insgesamt 50 Stunden Inkubation mit PKC412 in den angegebenen Konzentrationen.

Wie Abbildung 10a belegt, weisen die transfizierten Zellen (ITD/PTPLAD2, C7/PTPLAD2 und C10/PTPLAD2) hohe PTPLAD2-Level aus. Im Vergleich dazu

kommen bei dem gewählten Maßstab die MNE-Werte der verwendeten Kontrollzellen (ITD, C7 und C10) kaum zur Darstellung.

Die Ergebnisse aus den Messungen der proliferativen Aktivität jener Zellen in Anwesenheit von PKC412 zeigt Abbildung 10b. Darin zeichnen sich die ITD-Zellen analog zu publizierten Resultaten der Arbeitsgruppe [von Bubnoff, Engh et al. 2009] durch eine deutliche Sensibilität gegenüber dem verwendeten Inhibitor aus, wobei der zugehörige IC50-Wert etwas unter 5 nM liegt. Eine PTPLAD2-Überexpression in diesen Zellen hat keinen signifikanten Effekt auf den IC50-Wert. Im Gegensatz dazu weisen die Klone C7 und C10 eine ausgesprochene PKC412-Resistenz auf, die nicht durch eine PTPLAD2-Überexpression durchbrochen werden kann.

Somit liefert diese Untersuchung einen Hinweis darauf, dass, vorausgesetzt die hohen pJAK2-Level stehen in Zusammenhang mit der beobachteten PKC412-Resistenz in C10, PTPLAD2 als Phosphatase von pJAK2 ausscheidet. Diese Hypothese soll nun im folgenden Kapitel untermauert werden.

4.3.4 Unterdrückung der PTPLAD2-Expression mittels einer pLMPmiR^{PTPLAD2}

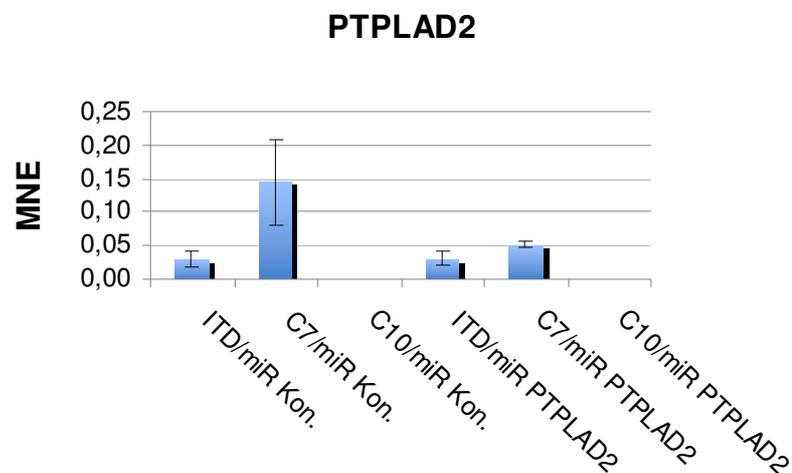
Falls, wie im vorausgehenden Kapitel angenommen, PTPLAD2 nicht die Phosphatase von pJAK2 ist, dürfte, vorausgesetzt die hohen pJAK2-Level stehen in Zusammenhang mit der beobachteten PKC412-Resistenz in C10, eine Unterdrückung der PTPLAD2-Expression in den ITD-Kontrollzellen nicht zu einer Resistenz dieses Klons gegenüber PKC412 führen. Darum sollte im Folgenden die Expression von PTPLAD2 mittels einer pLMPmiR^{PTPLAD2} in ITD, C7 und C10 unterdrückt werden. Daraufhin sollen die neu entstandenen Klone auf ihre Sensibilität gegenüber PKC412 getestet werden.

Zu diesem Zweck wurde, wie in Kapitel 3.1.12 beschrieben, ein pLMPmiR^{PTPLAD2}-Konstrukt kloniert, dessen zielgenspezifische shRNA gegen PTPLAD2 gerichtet ist. Nach Überprüfung des Klonierungserfolges mittels Sequenzierung wurde der so entstandene Vektor pLMPmiR^{PTPLAD2} sowie zur Kontrolle das Konstrukt pLMPmiR^{Kon.} in die ITD-Zellen, in C7 und in C10 retroviral transfiziert, bevor die daraus hervorgehenden Zellen selektioniert wurden (vgl. Kapitel 3.3.6.2).

Der Effekt dieser Vektorübertragung konnte in den so transfizierten Zellen nicht auf Proteinebene überprüft werden, da geeignete PTPLAD2-Antikörper nicht verfügbar waren (vgl. Kapitel 4.3.3). Aus diesem Grunde wurde die PTPLAD2-Expression zur Bestimmung des Transfektionserfolges über eine quantitative RT-PCR bestimmt. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass auf eine Transfektion der PTPLAD2-überexprimierenden Zellklone von Kapitel 4.3.3 mit dem pLMPmiR^{PTPLAD2}-Vektor verzichtet wurde, da der an PTPLAD2 angehängte HA-Tag in diesen Zellen ebenfalls nicht mittels Western-Blot nachweisbar war.

Da sich im Folgenden herausstellte, dass durch die Transfektion des Vektors pLMPmiR^{PTPLAD2} nur in C7 die Expression von PTPLAD2 suffizient supprimiert werden konnte (Abbildung 11a), wurde in einem weiteren Schritt das Wachstumsverhalten PTPLAD2-depletierter C7-Zellen unter PKC412-Einfluss bestimmt (Abbildung 11b).

a)



b)

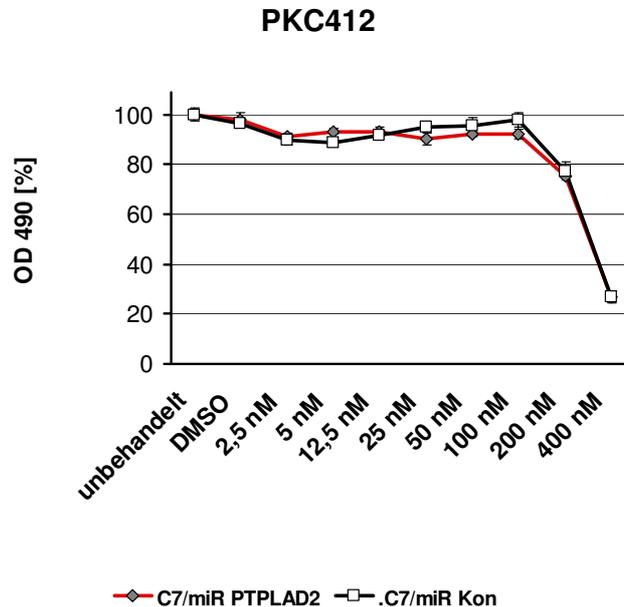


Abbildung 11: Eine erniedrigte Expression von PTPLAD2 beeinflusst nicht die proliferative Aktivität von C7 bei der Anwendung von PKC412

a. Aus Ba/F3-Zellen (ITD, C7 und C10), transfiziert mit dem pLMPmiR^{PTPLAD2}-Konstrukt oder zur Kontrolle mit dem pLMPmiR^{kon.}-Vektor, isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurden aus diesem Material die Expressionslevel des Gens PTPLAD2 mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte auf Basis der *Mean Normalized Expression* (MNE) [Simon 2003], wobei die „TATA-Box“ als Kontrollgen diente.

b. Es wurden, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, Messungen bezüglich der proliferativen Aktivität von Ba/F3-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Ba/F3-Zellen (C7), transfiziert mit dem pLMPmiR^{PTPLAD2}-Konstrukt oder zur Kontrolle mit dem pLMPmiR^{kon.}-Vektor, PKC412 in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Abbildung zeigt die gemessenen optischen Dichten bei 490 nm in Prozent nach insgesamt 50 Stunden Inkubation mit PKC412 in den angegebenen Konzentrationen.

Eine mögliche Erklärung für die insuffiziente Supprimierung von PTPLAD2 in ITD wäre, dass ITD-Zellen, im Gegensatz zu C7 und C10, zwingend auf ein bestimmtes Level an PTPLAD2-Proteinen angewiesen sind. Eine erniedrigte Expression jenes Gens könnte für sie, dieser Hypothese folgend, letal sein. Demzufolge wäre es möglich, dass im Rahmen der Transfektion alle erfolgreich mit dem pLMPmiR^{PTPLAD2}-Konstrukt versorgten ITD-Zellen zugrunde gegangen sind, während nur untransfizierte Zellen überlebt haben. Von diesen wäre dann durch den anschließenden Antibiotikaeinsatz eine Subpopulation selektioniert worden, die aus anderen Gründen gegenüber dem verwendeten Antibiotikum resistent waren.

Unabhängig von dieser Hypothese sind demzufolge in Abbildung 11b nur die proliferativen Aktivitäten von C7-Zellen mit erniedrigter (C7/miR PTPLAD2) und ursprünglicher (C7/miR Kon.) PTPLAD2-Expression unter PKC412-Einfluss zu sehen. Diesbezüglich konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Aus den Ergebnissen dieses und des vorausgegangenen Kapitels kann somit geschlossen werden, dass, vorausgesetzt die hohen pJAK2-Level stehen in Zusammenhang mit der beobachteten PKC412-Resistenz in C10, PTPLAD2 keine Phosphatase von pJAK2 ist und somit auch als Kandidatengen für eine FLT3-ITD-Kinase-unabhängige Resistenz in diesem Modell ausscheidet.

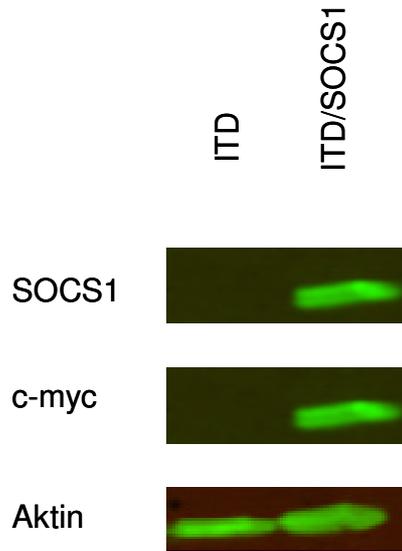
4.3.5 SOCS1-Überexpression

Nachdem PTPLAD2 als Kandidatengen (vgl. Kapitel 4.3.3 und 4.3.4) ausgeschlossen worden ist, soll nun im Folgenden untersucht werden, inwieweit die erhöhte SOCS1-Expression in C10 (vgl. Kapitel 4.2. und 4.3.1) als Ursache für die Resistenz dieses Klons gegenüber PKC412 in Frage kommt. Wäre dies der Fall, so müsste eine SOCS1-Überexpression in den ITD-Kontrollzellen zu einer PKC412-Resistenz führen.

Um dies zu überprüfen, wird zuerst, nachdem keine SOCS1-Mutationen im C10-Klon mittels Sequenzierung gefunden werden konnten, SOCS1 in den ITD-Zellen überexprimiert. Der neu entstandene Klon wird auf seine Sensibilität gegenüber PKC412 getestet.

Dazu wurde zunächst eine PCR durchgeführt, bei der murines SOCS1 aus dem *template* pEF-Flag1 mSOCS vervielfältigt wurde. Im Rahmen dessen wurde über ein entsprechendes Primer-Design vor die SOCS1-Sequenz ein Myc-Tag eingeführt. Das daraus hervorgehende Konstrukt wurde nach dem TOPO[®]-Verfahren in den pCR[™]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor integriert (pCR[™]-Blunt II-TOPO[®] + SOCS1). Von da aus wurde das SOCS1-Myc-Konstrukt in den pBABEpuro-Vektor zwischen die Schnittstellen BamHI und EcoRI subkloniert. Nach Überprüfung des Klonierungserfolges mittels Sequenzierung wurde der so entstandene Vektor pBABEpuro + SOCS1 in die ITD-Zellen retroviral transfiziert, bevor die daraus hervorgehenden Zellen selektioniert wurden.

a)



b)

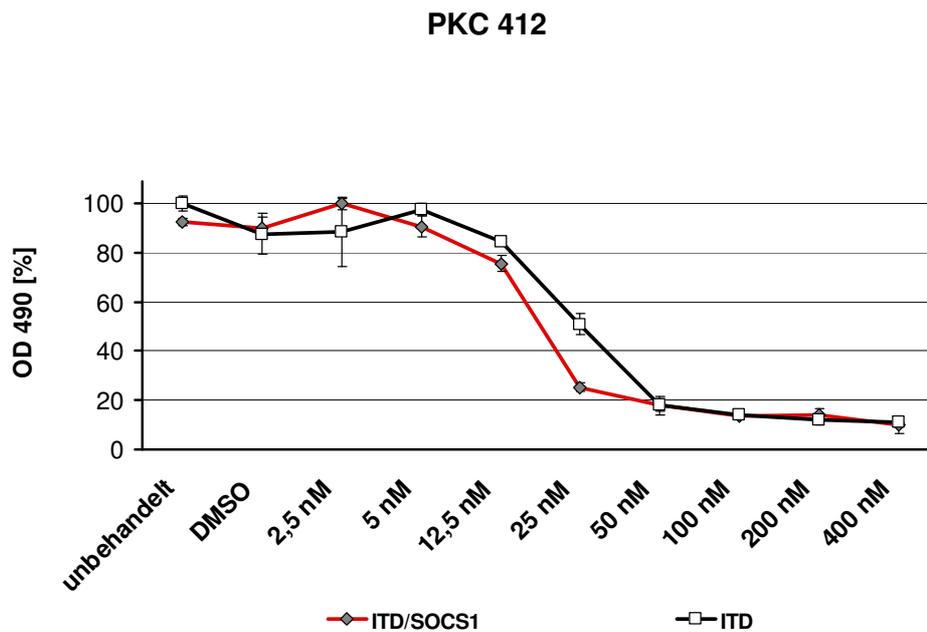


Abbildung 12: Eine SOCS1-Überexpression beeinflusst nicht die proliferative Aktivität von FLT3-ITD-positiven Ba/F3-Zellen gegenüber PKC412

a. Ba/F3-Zellen (ITD), transfiziert mit dem pBABEpuro + SOCS1-Konstrukt oder zur Kontrolle untransfiziert, wurden geerntet und deren Zelllysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit einem anti c-myc-Antikörper, einem anti SOCS1-Antikörper und einem anti α - β -Aktin-Antikörper als Ladungskontrolle.

b. Es wurden, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, Messungen bezüglich der proliferativen Aktivität von Ba/F3-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Ba/F3-Zellen (ITD), transfiziert mit dem pBABEpuro + SOCS1-Konstrukt oder zur Kontrolle untransfiziert, PKC412 in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Abbildung zeigt die gemessenen optischen Dichten bei 490 nm in Prozent nach insgesamt 50 Stunden Inkubation.

Nach Verifizierung des Transfektionserfolgs (Abbildung 12a) konnte mittels Messung der proliferativen Aktivität überprüft werden, ob ITD-Zellen mit SOCS1-Überexpression gegenüber ITD-Zellen, die diese Art der genetischen Manipulation nicht vorweisen, einen Überlebensvorteil bei der Behandlung mit FLT3-Inhibitoren haben (Abbildung 12b).

Wie Abbildung 12a belegt, weisen die transfizierten ITD/SOCS1-Zellen hohe SOCS1-Level aus. Diese genetische Manipulation hat in jenen Zellen keinen Einfluss auf die proliferative Aktivität unter PKC412, da die beiden Kurven in Abbildung 12b annähernd deckungsgleich verlaufen. Mit dieser Intervention konnte also keine PKC-412-Resistenz in ITD-Zellen herbeigeführt werden.

Somit scheidet auch SOCS1 als Kandidatengen für eine FLT3-ITD-Kinase-unabhängige Resistenz in diesem Modell aus.

4.4 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Kapitels 4.3.1 zeigen, dass SOCS1 und pJAK2 in C10 im Vergleich zu ITD und C7 deutlich erhöht sind, während die Level an JAK2, STAT5 und pSTAT5 keine signifikanten Veränderungen aufweisen. Daraus ist ersichtlich, dass in C10 die große Menge an SOCS1 die Quantität von JAK2 bzw. pJAK2 nicht maßgeblich beeinflusst, da in diesem Fall gemäß Kapitel 4.1.2.2 JAK2 vermindert und pJAK2 wie in ITD nicht nachweisbar sein müsste. Vielmehr scheint in umgekehrter Richtung im Rahmen des negativen Feedbackmechanismus innerhalb des FLT3-ITD-Signalwegs (vgl. Kapitel 4.1.2.2) pJAK2 über STAT5 die SOCS1-Expression zu induzieren. Dieser Argumentation folgend kann die SOCS1-Überexpression nicht Grund für die PKC412-Resistenz in C10 sein, da sie nur Folge und nicht Ursache einer pJAK2-Überexpression ist. Dies wird durch die durchgeführte Überexpression von SOCS1 in ITD (vgl. Kapitel 4.3.5) bestätigt, bei der es zu keinem Auftreten einer PKC412-Resistenz in den transfizierten Zellen kam. Zusätzlich zeigt Kapitel 4.3.2, dass ein verzögerter pJAK2-Abbau als Ursache für die pJAK2-Überexpression ausscheidet. Der Grund für die große pJAK2-Proteinmenge in C10 und ob diese Beobachtung eine Rolle für die PKC412-Resistenz spielt, bleibt weiter unklar. Ebenso

müssen weitere Experimente klären, inwieweit ein verzögerter JAK2-Abbau, wie in Kapitel 4.3.2 beobachtet, in diesem Zusammenhang bedeutsam ist.

Somit kann folgendes festgestellt werden:

1. Ein erhöhtes SOCS1-Level ist nicht für die PKC412-Resistenz in C10 ursächlich.
2. Eine erhöhte SOCS1-Expression hat keine sichtbare Auswirkung auf die Interaktionspartner STAT5 und (p)JAK2 innerhalb des FLT3-ITD-Signalwegs.
3. In umgekehrter Weise ist die erhöhte SOCS1-Expression in C10 auf die erhöhte Menge an pJAK2 zurückzuführen
4. Die Frage, warum pJAK2 bei gleichzeitig hohen SOCS1-Levels akkumulieren kann, bleibt weiterhin unbeantwortet, da die pJAK2-Abbaurrate in C10 vergleichbar mit der in C7 ist.

Bezüglich PTPLAD2 zeigt Kapitel 4.3.3, dass eine Reexpression bzw. Überexpression von PTPLAD2 in C10 zu keiner erneuten Sensibilität gegenüber PKC412 führt. Eine geplante Herabregulation von PTPLAD2 in ITD konnte nicht realisiert werden, wobei die gleiche Maßnahme in C7 keine Auswirkung auf die beobachtete PKC412-Resistenz in diesem Klon hatte (vgl. Kapitel 4.3.4). Zudem stellte sich im Rahmen dieser Versuche heraus, dass die Annahme, bei PTPLAD2 könnte es sich um die Phosphatase von pJAK2 handeln, haltlos ist, vorausgesetzt die hohen pJAK2-Level sind Ursache für die PKC412-Resistenz in C10.

Somit lieferten die durchgeführten Experimente keine Hinweise auf eine Beteiligung des PTPLAD2-Gens oder des SOCS1-Gens bei der Entstehung einer PKC412-Resistenz.

5 Die K294S_insFPQ-Mutation in BCR-ABL

5.1 Allgemeines zur chronischen myeloischen Leukämie (CML)

5.1.1 Epidemiologie

Die chronische myeloische Leukämie gehört mit einer jährlichen Inzidenz von ein bis zwei Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner zu den relativ seltenen Erkrankungen. Dabei sind, mit einem Durchschnittsalter von etwa 65 Jahren bei Erstdiagnose, vor allem ältere Menschen von dieser Neoplasie betroffen. Ferner hat sich herausgestellt, dass die CML bevorzugt das männliche Geschlecht betrifft. Frauen, die an der CML erkrankt sind, weisen gegenüber erkrankten Männern eine höhere Überlebensrate auf. Außerdem scheint es hinsichtlich der epidemiologischen Daten keine ethnischen oder geographischen Unterschiede zu geben [Hehlmann, Hochhaus et al. 2007].

5.1.2 Pathophysiologie

Der CML liegt eine neoplastische Transformation von hämatopoetischen Stammzellen zugrunde, die wiederum durch eine spezielle genetische Abnormalität in jenen Zellen hervorgerufen wird. Dabei handelt es sich um das so genannte „Philadelphia-Chromosom“, das aus der Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ hervorgeht. Auf diesem abnormen und kleinen Chromosom befindet sich ein durch die Translokation entstandenes Fusionsgen namens BCR-ABL, das als Onkogen klassifiziert wird. Abhängig von den genauen Bruchpunkten der Translokation kann die Größe dieses Gens variieren, weshalb sich auch die von diesem Gen stammenden Proteine von Patient zu Patient hinsichtlich ihres Molekulargewichts unterscheiden können (p185 BCR-ABL, p210 BCR-ABL und p230 BCR-ABL). Davon abgesehen zeichnet sich der ABL-Anteil dieser Proteine durch eine deutlich erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität aus, die als wesentlicher Bestandteil der CML-Pathogenese angesehen wird [Ren 2005].

Obwohl der genaue Mechanismus, der zur Gentranslokation führt, noch unbekannt ist, scheint in diesem Zusammenhang eine Strahlenexposition eine Rolle zu spielen,

wie die nach den Atombombenabwürfen erhöhte Inzidenz an CML in Japan zeigt [Hehlmann, Hochhaus et al. 2007].

5.1.3 Klinische Symptome

Zu den klassischen Symptomen einer chronischen myeloischen Leukämie zählen Abgeschlagenheit, Schwäche, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Knochenschmerzen oder auch Oberbauchbeschwerden bei Milzvergrößerung [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013].

5.1.4 Diagnose

Im Prinzip kann die Diagnose einer (unbehandelten) chronischen myeloischen Leukämie durch die Analyse peripheren Blutes gestellt werden [Cortes et Kantarijan 2012]. Bei dieser Untersuchung ist vor allem eine Leukozytose auffällig, die das gesamte Spektrum reifer und unreifer myeloischer Zellen zeigt, wobei die Anzahl an Myelozyten und reifen Granulozyten für gewöhnlich besonders hoch ist. Häufig wird zusätzlich eine Basophilie und Eosinophilie beschrieben. Fast immer kann eine Anämie beobachtet werden, die meistens als normochrom und normozytär klassifiziert wird. In seltenen Fällen zeigt sich auch eine Erythrozytose, die zunächst eine Polycythaemia rubra vera vermuten lassen könnte. Bei 30 % aller Patienten wird zudem eine Thrombozytose diagnostiziert [Hughes et Goldman 1995]. Die letztendliche Bestätigung für das Vorliegen einer CML liefert der zytogenetische Nachweis von Philadelphiachromosomen oder auch die Detektion des Fusionsgens BCR-ABL auf DNA-Ebene über PCR oder FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) oder auf mRNA Ebene durch RT-PCR [Wang, Bagg et al. 2001].

Darüber hinaus sind sowohl die zytologische und zytogenetische Untersuchung eines Knochenmarkspirats als auch die Beurteilung einer Knochenmarkbiopsie hinsichtlich Fibrosierung und Blastenzahl essentiell [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013]. Dies dient der Einteilung des Stadiums der Erkrankung und ist darüber hinaus als Ausgangspunkt für weitere Kontrolluntersuchungen (vor allem unter Therapie) wichtig [Cortes et Kantarijan 2012].

5.1.5 Verlauf

In den meisten Fällen verläuft die CML, vor allem unbehandelt, bi- oder triphasisch. Einer initialen chronischen Phase, die üblicherweise über mehrere Jahre unverändert besteht, folgt meist über die Zwischenstufe einer akzelerierten Phase eine akute Phase, die auch Blastenkrise genannt wird. In diesem Endstadium der Erkrankung beträgt die mediane Überlebenszeit ohne Therapie weniger als drei Monate [Hughes et Goldman 1995].

Dabei sind folgende Punkte laut der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie e.V. (DGHO) mit Stand Januar 2013 [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013] Kriterien einer akzelerierten Phase:

- 15-29 % Blasten in Blut oder Knochenmark oder
- Blasten plus Promyelozyten im Blut oder Knochenmark >30 % (mit <30 % Blasten) oder
- ≥ 20 % Basophile in Blut oder Knochenmark oder
- Therapie-unabhängige Thrombozytopenie $< 100.000/\mu\text{l}$ oder
- neu entstandene klonale Evolution oder
- progrediente Fibrose des Knochenmarks oder
- progrediente Splenomegalie und ansteigende Leukozyten, die auf Therapie nicht ansprechen

Eine Blastenkrise erfüllt laut DGHO [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013] folgende Kriterien:

- ≥ 30 % Blasten in Blut oder Knochenmark oder
- Nachweis extramedullärer Blasten

5.1.6 Therapie

5.1.6.1 *Imatinib*

Das niedermolekulare Medikament Imatinib hemmt die BCR-ABL-Tyrosinkinase kompetitiv durch Bindung an deren ATP-Bindungsstelle [Hehlmann, Hochhaus et al. 2007]. Daneben wird diesem Wirkstoff auch ein inhibitorischer Einfluss auf die Tyrosinkinasen PDGFR und KIT zugeschrieben [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013].

Die 2003 veröffentlichte Phase-III-Studie IRIS [O'Brien, Guilhot et al. 2003] bewies die Überlegenheit von Imatinib gegenüber der bis dahin eingesetzten Kombinationstherapie aus Interferon alpha und niedrig-dosiertem Cytarabin bei der Behandlung der chronischen Phase der CML. Dabei zeigte sich, dass die Imatinib-Gruppe gegenüber dem Interferon-Cytarabin-Arm signifikante Vorteile hinsichtlich der hämatologischen, zytogenetischen und molekularen Remissionen hatte [von Bubnoff et Duyster 2010]. Ein 5-Jahres Follow-up der IRIS-Studie bescheinigte Imatinib das Erreichen einer vollständigen zytogenetischen Remissionsrate von 87 % bei einer Überlebensrate von 89 % bei Patienten, die sich zu Therapiebeginn in der chronischen Phase der CML befanden [Druker, Guilhot et al. 2006].

Obwohl Imatinib damit die bis dahin eher mäßig erfolgreiche Therapie der CML (die vollständige zytogenetische Remissionsrate unter Interferon alpha lag bei etwa 10 % [O'Brien, Guilhot et al. 2003]) zweifelsfrei revolutionierte, profitieren nicht alle Patienten von diesem Medikament. In diesem Zusammenhang sind mehrere Resistenzmechanismen bekannt, welche die Wirksamkeit dieses Inhibitors herabsetzen. So sprechen unter anderem die Patienten auf eine Imatinib-Therapie schlechter an, deren krankheitsauslösende Zellen im Zuge einer klonalen Evolution zusätzliche chromosomale Aberrationen aufweisen. Auch eine in diesen Zellen stattfindende Überexpression an BCR-ABL liefert nach aktuellem Erkenntnisstand einen hinreichenden Grund für die Entwicklung einer Resistenz. Zusätzlich sind in diesem Kontext mehrere Dutzend Mutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne beschrieben, die mit einem schlechteren Ansprechen auf Imatinib assoziiert sind [Apperley 2007 (Part I)].

Bei Patienten, die nicht oder nur unzureichend auf Imatinib reagieren, können abhängig von der zugrunde liegenden Ursache eine Erhöhung der Imatinib-Dosierung oder der Wechsel auf einen anderen ABL-Kinaseinhibitor (Nilotinib, Dasatinib) Abhilfe schaffen. Dabei ist zu beachten, dass beim Vorliegen der Mutation T315I keiner der

zugelassenen Kinaseinhibitoren wirksam ist. In diesem Fall muss über eine allogene Stammzelltransplantation oder über die Teilnahme an einer Therapiestudie nachgedacht werden [von Bubnoff et Duyster 2010].

Aktuell wird Imatinib in der Erstlinientherapie der chronischen Phase der CML in einer Dosierung von 400-800 mg/Tag eingesetzt [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013].

5.1.6.2 Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation

Während Ponatinib [Wörmann, Brümmendorf et al. 11/2013] und Bosutinib [Wörmann, Brümmendorf et al. 08/2013] als Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation nur unter bestimmten Voraussetzungen zur Behandlung der CML in Deutschland zugelassen sind, haben die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und im Folgenden beschriebenen Inhibitoren Dasatinib und Nilotinib bereits ihren festen Platz innerhalb der Therapie.

In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass Nilotinib BCR-ABL-spezifischer wirkt und wie Imatinib die Tyrosinkinasen PDGFR und KIT inhibiert. Dagegen wird Dasatinib eher als Multikinase-Inhibitor charakterisiert [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013]. Ein weiterer Unterschied dieser beiden Inhibitoren ist die Tatsache, dass Dasatinib sowohl an die aktive als auch inaktive Konformation der ABL-Kinase bindet, währenddessen sich Nilotinib, ähnlich wie Imatinib, nur an die inaktive Konformation heftet [Apperley 2007(Part II); Weisberg, Manley et al. 2007].

Sowohl Nilotinib als auch Dasatinib werden bereits in der Erstlinientherapie der CML eingesetzt, wobei sie höhere Raten zytogenetischer und molekularer Remissionen im Vergleich zu Imatinib aufweisen. Außerdem finden beide Medikamente Anwendung in der Zweitlinientherapie nach einer vorausgegangenen Resistenz oder Intoleranz gegenüber Imatinib. So ist Nilotinib für die chronische Phase in einer empfohlenen Dosierung von 2x300 mg/Tag zugelassen (Zweitliniendosierung 2x400 mg/Tag), Dasatinib für die chronische und akzelerierte Phase in einer empfohlenen Dosierung von 100 mg/Tag und zusätzlich für das Stadium der Blastenkrise in einer Dosierung von 140 mg/Tag. In die Entscheidung für eines dieser Medikamente wird neben den spezifischen Nebenwirkungen auch ein eventuell bestehender Unterschied hinsichtlich der Wirksamkeit gegenüber etwaiger Mutationen miteinbezogen [Hochhaus, Baerlocher et al. 2013].

5.1.6.3 Allogene Stammzelltransplantation

Obwohl laufende Studien der Frage nachgehen, ob das Absetzen von Imatinib zwangsläufig, wie bisher angenommen, zu einem Rezidiv führt, wird die Stammzelltransplantation gemeinhin als einzige Möglichkeit einer Heilung der CML angesehen. Dabei wird das 5-Jahresüberleben bei einer in der frühen chronischen Phase erfolgten Transplantation mit 25 % bis 70 % angegeben, was im Vergleich zu den Überlebensraten einer Imatinib-Therapie als relativ niedrig erscheint. Die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation wird in der Regel aufgrund einer Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren oder bei Progression in eine Akzelerationsphase oder Blastenkrise gestellt [von Bubnoff et Duyster 2010].

5.2 Fragestellung

Den Anlass zur weiteren Erforschung von Resistenzmechanismen, die bei der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie mit Tyrosinkinaseinhibitoren auftreten können (vgl. Kapitel 5.1.6), lieferte der Fall einer 37-jährigen Patientin, die mit Unwohlsein, Lymphadenopathie und Splenomegalie in einer Klinik vorstellig wurde. Das daraufhin erstellte Blutbild wies einen Hb von 9,6 g/dl, eine Leukozytenzahl von 122,7/nl bei einem Blastenanteil von 47 %, sowie eine Thrombozytenzahl von 74/nl aus. Das ebenfalls untersuchte Knochenmark zeigte sich hyperzellulär, wobei es zu 80 % mit Blasten infiltriert war, die sich unter anderem durch die Expression von CD34, HLA-DR, CD19, CD10, TdT und cyCD22 auszeichneten. Des Weiteren konnte durch Analyse des Knochenmarks der molekulargenetische Nachweis eines BCR-ABL-Fusionstranskripts vom Typ M-BCR (b2a2 entsprechend p210) erbracht werden, während das BCR-ABL/ABL-Verhältnis bei 276,09 % lag. Auf Grundlage dieser Werte wurde deshalb die Diagnose einer chronischen myeloischen Leukämie in der Phase der Blastenkrise gestellt.

Daraufhin wurde die Behandlung der Patientin begonnen, indem ihr Imatinib in einer täglichen Dosierung von 800 mg und eine Chemotherapie (Daunorubicin plus Cytarabin) verabreicht wurden. Später wurde die Dosierung von Imatinib aufgrund des Auftretens einer Panzytopenie über 600 mg auf 400 mg reduziert. Diese Therapie lieferte nicht den gewünschten Erfolg, da das BCR-ABL/ABL-Verhältnis lediglich auf

139,6 % und 48,2 % (Tag 50 bzw. Tag 89 nach Krankenhausaufnahme) zurückging und weiterhin Blasten im Knochenmark (10 %-15 %) sowie im peripheren Blut (17 %) nachweisbar waren. Eine aus diesem Grund am Tag 99 in Auftrag gegebene Mutationsanalyse mittels Sequenzierung, durchgeführt von der MHP Münchner Hämatologie Praxis in Zusammenarbeit mit MLL Münchner Leukämielabor GmbH (München), lieferte den Nachweis einer bis dahin noch nicht beschriebenen K294S_insFPQ-Mutation (g.68009_68010ins GTTTCCTC) im BCR-ABL-Fusionsgen. Daraufhin wurde Imatinib abgesetzt, Dasatinib in einer täglichen Dosierung von 100 mg angesetzt und zusätzlich die dreimalige Gabe von Vincristin und Dexamethason in die Wege geleitet. Darunter kam es zu einem Abfall des BCR-ABL/ABL-Verhältnisses auf 13,8 % und 0,9 % (Tag 131 bzw. Tag 173), was als molekulares Ansprechen gewertet wurde. Außerdem fiel der Blastenanteil im Knochenmark auf Werte unter 5 %, während die Analyse des peripheren Blutes am Tag 173 eine Leukozytenzahl von 3,6/nl bei einem Blastenanteil von 0 %, einen Hb von 8,6 g/dl und eine Thrombozytenzahl von 29/nl ergab. Diese Werte waren Zeichen einer kompletten hämatologischen Remission bei einer inkompletten Erholung der Thrombozyten unter andauernder Dasatinib-Therapie.

Schließlich unterzog sich die Patientin am Tag 205 nach ihrer erstmaligen Krankenhausaufnahme einer allogenen Stammzelltransplantation, nachdem eine Konditionierung mittels Ganzkörperbestrahlung (12 Gy), Cyclophosphamid und Antithymozytenglobulin stattgefunden hatte. Am Tag 100 nach erfolgter Transplantation wurde ein Spenderchimärismus von 100 % erreicht, während das Blutbild einen Hb von 7,9 g/dl, einen Leukozytenwert von 1,7/nl und einen Thrombozytenwert von 24/nl zeigte. Ziemlich genau ein Jahr nach Erhalt der allogenen Stammzellen trat eine vor allem die Leber betreffende Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) auf, die eine Steroidbehandlung erforderlich machte. Daraufhin kam es bei der Patientin zu einer Reaktivierung des Cytomegalievirus (CMV), die mit Ganciclovir therapiert wurde. Obwohl im weiteren Verlauf mehrmals eine komplette zytogenetische und molekulare Remission nachgewiesen wurde, erholte sich das Knochenmark nicht. So litt die Patientin fortwährend unter einer transfusionspflichtigen Thrombozytopenie und Anämie. Am Tag 757 nach der durchgeführten Stammzelltransplantation zeigte sich das Knochenmark weiterhin hypozellulär mit einem Spenderchimärismus von 97 %. Die Patientin verstarb am Tag 916 nach der Stammzelltransplantation an einer Sepsis.

Alle klinischen Daten zu diesem Fall, der bereits veröffentlicht wurde [Sigl, Spoerl et al. 2013], wurden dankenswerterweise von Julia Meissner, Universitätsklinikum Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Aus der dargelegten Patientengeschichte ergab sich die wissenschaftlich interessante Fragestellung, ob die nachgewiesene und bislang nicht beschriebene K294S_insFPQ-Mutation ursächlich für die beobachtete Imatinib-Resistenz war oder ob beide Gegebenheiten unabhängig voneinander auftraten.

5.3 Vorgehensweise

5.3.1 Genaue Lokalisation und Charakterisierung der Mutation

Wie bereits in Kapitel 5.2 erwähnt, wurde bei der Patientin eine K294S_insFPQ-Mutation (g.68009_68010ins GTTTCCCTC) im BCR-ABL-Fusionstranskript vom Typ M-BCR (b2a2 entsprechend p210) entdeckt.

Dies bedeutet zum einen, dass bei der Entstehung des zugrunde liegenden BCR-ABL-Fusionsgens der Bruchpunkt im ABL-Gen stromaufwärts des Exons a2 lag und der Bruchpunkt im BCR-Gen in der M-BCR-Region (*Major Breakpoint Cluster Region*) zwischen den Exons b2 und b3 zu verorten war. Zum anderen hat dies zur Folge, dass das daraus hervorgehende Onkoprotein ein Molekulargewicht von etwa 210 kDa aufweist [Melo 1996].

Bezüglich der in dem BCR-ABL-Fusionsgen lokalisierten Mutation ist anzumerken, dass es sich hierbei um eine Insertion handelt, bei der sich auf DNA-Ebene neun zusätzliche Nukleotide (GTTTCCCTC) zwischen den Nukleotiden mit den Positionen 68009 und 68010 eingefunden haben. Dadurch vergrößert sich das translatierte Protein um drei Aminosäuren. Wie aus einer von Wongboonma [Wongboonma, Thongnoppakhun et al. 2012] angefertigten Graphik (Abbildung 13), die bisher bekannte Mutationen innerhalb der ABL-Kinasedomäne auflistet, entnommen werden kann, ist die K294S_insFPQ-Mutation im Bereich des Übergangs zwischen C-Helix und dem SH3-Kontakt zu verorten.

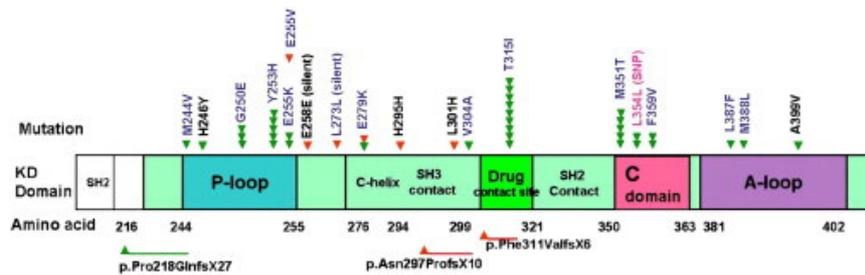


Abbildung 13: Die ABL-Kinasedomäne mit bisher bekannten Mutationen

[Wongboonma, Thongnoppakhun et al. 2012]

5.3.2 Experimentelles Vorgehen

Ziel war es, in Ba/F3-Zellen ein BCR-ABL-Konstrukt zu exprimieren, das die K294S_insFPQ-Mutation beinhaltet.

Deshalb wurden in den pBluescript SK + p185^{BCR-ABL}-Vektor die neun Nukleotide an der besagten Stelle unter Anwendung der „Megaprimer“-Methode (vgl. Kapitel 3.1.2) eingefügt (pBluescript SK + p185^{BCR-ABL + 9N}). Anschließend wurde das so abgeänderte BCR-ABL-Konstrukt in den pcDNA 3.1/Zeo(-)-Vektor zwischen die Schnittstellen NotI und EcoRI subkloniert. Nach Überprüfung des Klonierungserfolges mittels Sequenzierung wurde der so entstandene Vektor pcDNA 3.1/Zeo(-) + p185^{BCR-ABL + 9N} in parentale Ba/F3-Zellen unter Anwendung der Technik der Nukleofektion (vgl. Kapitel 3.3.5.1) transfiziert, bevor die daraus hervorgehenden Zellen selektioniert wurden (vgl. Kapitel 3.3.6.1).

Nun konnten diese Ba/F3-Zellen mit Ba/F3-Zellen, welche mit dem unmutierten Konstrukt pcDNA 3.1/Zeo(-) + p185^{BCR-ABL} transfiziert waren (von Jana Sänger zur Verfügung gestellt), verglichen werden. Dabei stand vor allem deren Verhalten bezüglich Proliferation und BCR-ABL-Phosphorylierung unter Tyrosinkinaseinhibitoreinfluss im Fokus.

Bei besagten Zellen wurde die Inhibierung der Autophosphorylierung von BCR-ABL unter dem Einfluss der Inhibitoren Imatinib, Dasatinib und Nilotinib mittels Western-Blot überprüft (Abbildung 14). Dieses Vorgehen erscheint als sinnvoll, da alle drei Medikamente als ATP-Kompetitoren die Autophosphorylierung von BCR-ABL hemmen und damit die diesem Fusionsprotein nachgeschalteten und krankheitsauslo-

senden Signalwege unterdrücken [Patel, Suthar et al. 2010; Reddy et Aggarwal 2012].

Außerdem wurde die Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren auf die proliferative Aktivität der genannten Zelllinien getestet (Abbildung 15).

Die genannten Methoden sind zur Beurteilung des Ansprechens von Zelllinien mit BCR-ABL-Mutationen auf die Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren gut etabliert [von Bubnoff, Manley et al. 2006].

5.4 Ergebnisse

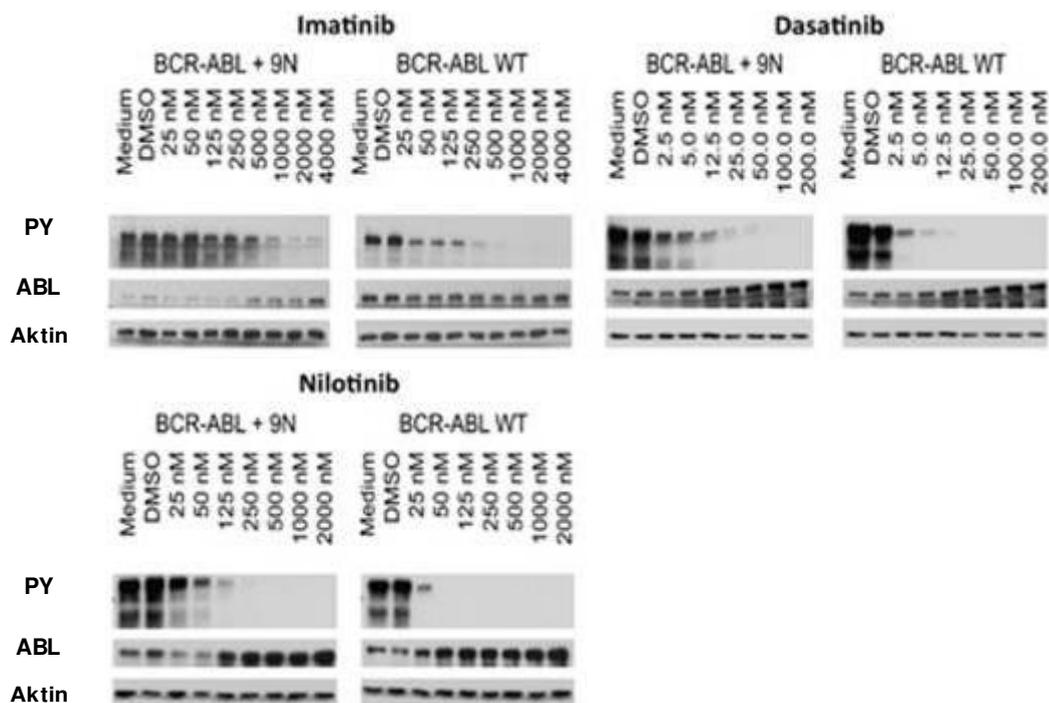


Abbildung 14: Die K294S_{ins}FPQ-Mutation vermindert die Inhibierung der Autophosphorylierung von BCR-ABL bei der Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren

Ba/F3-Zellen, transfiziert mit dem pcDNA 3.1/Zeo(-) + p185^{BCR-ABL + 9N}-Konstrukt oder zur Kontrolle mit dem pcDNA 3.1/Zeo(-) + p185^{BCR-ABL}-Konstrukt, wurden in Anwesenheit der drei genannten Tyrosinkinaseinhibitoren in den jeweils angegebenen Konzentrationen für 2,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die verwendeten Zellen geerntet und deren Zelllysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western-Blot mit zwei anti- α -Phospho-Tyrosin-Antikörpern (pY20/4G10), einem anti-ABL-Antikörper und als Ladungskontrolle einem anti- α - β -Aktin-Antikörper. Die Beschriftung „Medium“ bedeutet dabei, dass die zugehörigen Zellen nicht mit einem Inhibitor behandelt wurden.

Wie Abbildung 14 zeigt, ist die Inhibierung der Autophosphorylierung von BCR-ABL bei Zellen mit der K294S_insFPQ-Mutation (BCR-ABL + 9N) im Vergleich zu Zellen, die diese Mutation nicht aufweisen (BCR-ABL WT), unter Einfluss der drei genannten Medikamente vermindert. So sind Phospho-Tyrosin-Banden bei den BCR-ABL + 9N-Zellen sichtbar bis 4000 nM Imatinib, bis 50 nM Dasatinib und bis 250 nM Nilotinib. Dagegen enden derartige Banden bei den BCR-ABL-Wildtyp-Zellen bei etwa 500 nM Imatinib, bei 12,5 nM Dasatinib und bei 25 nM Nilotinib.

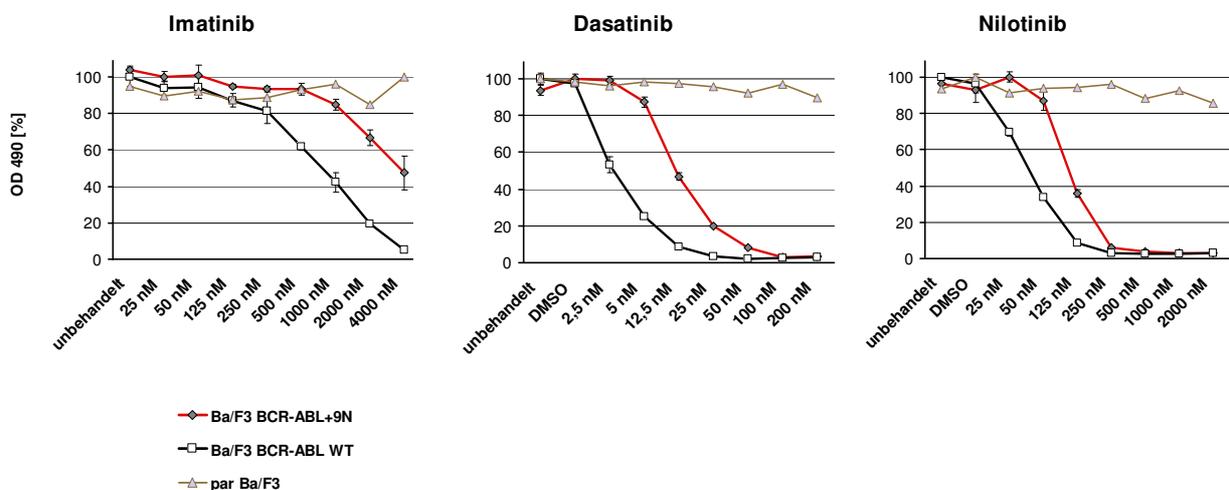


Abbildung 15: Die K294S_insFPQ-Mutation führt zu einer relativen Steigerung der proliferativen Aktivität von BCR-ABL-positiven Zellen bei der Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren

Es wurden, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, Messungen bezüglich der proliferativen Aktivität von Ba/F3-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Ba/F3-Zellen, transfiziert mit dem pcDNA 3.1/Zeo(-) + p185^{BCR-ABL + 9N}-Konstrukt oder zur Kontrolle mit dem pcDNA 3.1/Zeo(-) + p185^{BCR-ABL}-Konstrukt, die 3 genannten Tyrosinkinaseinhibitoren in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Außerdem wurden parentale Ba/F3-Zellen als zusätzliche Kontrolle behandelt. Die Abbildung zeigt die gemessenen optischen Dichten bei 490 nm in Prozent nach insgesamt 50 Stunden Inkubation.

Abbildung 15 zeigt, dass unter dem Einfluss von Imatinib die Zellen mit K294S_insFPQ-Mutation (Ba/F3 BCR-ABL + 9N) in ihrer proliferatorischen Aktivität deutlich weniger eingeschränkt sind als diejenigen Zellen, die das unmutierte BCR-ABL-Konstrukt beinhalten (Ba/F3 BCR-ABL WT). Ähnliches gilt, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß, für die Inhibitoren Dasatinib und Nilotinib. Die Ergebnisse aus Abbildung 15 korrelieren mit den Messungen aus Abbildung 14.

5.5 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus Kapitel 5.4 lassen den Schluss zu, dass BCR-ABL-positive Ba/F3-Zellen, die in ihrem Fusionsgen eine K294S_insFPQ-Mutation aufweisen, resistenter sind gegenüber einer Behandlung mit einem der drei getesteten Tyrosinkinaseinhibitoren als diejenigen Zellen, die diese genetische Veränderung nicht aufweisen. Werden dabei zusätzlich die bei der Therapie von Patienten erreichbaren Plasmakonzentrationen der Medikamente beachtet (Imatinib 4000 nM, Dasatinib 100 nM und Nilotinib 2000 nM [Bradeen, Eide et al. 2006]), so ist ersichtlich, dass die Zellen mit Mutation bei klinisch erreichbaren Konzentrationen eine residuelle Empfindlichkeit gegenüber Dasatinib und Nilotinib zeigen, während gegenüber Imatinib eine vollständige Resistenz besteht.

Diese Resultate decken sich weitestgehend mit den Beobachtungen, die bei dem in Kapitel 5.2 geschilderten klinischen Fall gemacht wurden. Während Imatinib bei der 37-jährigen Patientin, die an einer CML mit nachgewiesener K294S_insFPQ-Mutation erkrankt war, keinen nennenswerten Behandlungserfolg brachte, wurde unter Dasatinib neben einem molekularen Ansprechen eine komplette hämatologische Remission erreicht. Nilotinib kam bei der Patientin nicht zur Anwendung.

Diese Erkenntnisse sind, bezüglich der vorliegenden Insertions-Mutation K294S_insFPQ, vor dem Hintergrund bereits veröffentlichter Fälle zu sehen, bei denen Mutationen im BCR-ABL-Gen die Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren negativ beeinflussen. In diesem Zusammenhang werden in der Literatur eine Vielzahl von Punktmutationen, vornehmlich in der ABL-Kinasedomäne, genannt, die zum Austausch einer Aminosäure im fertigen Protein führen [Apperley 2007 (Part I)], während Insertionen und Deletionen kaum bekannt sind [Hayette, Chabane et al. 2009]. Umso erstaunlicher erscheint es, dass mindestens drei klinische Fälle bekannt sind, bei denen eine Insertions-Mutation an der Stelle K294 des BCR-ABL-Fusionstranskripts eine Imatinib-Resistenz hervorgerufen hat. So wird von einem 47-jährigen Mann berichtet, bei dem in der Blastenkrise einer CML ein Klon mit einer K294R_insGG-Mutation nachzuweisen war [Sakai, Ishikawa et al. 2011]. Ferner wurde der Fall einer 57-jährigen Frau veröffentlicht, die im Rahmen einer BCR-ABL-positiven akuten Leukämie eine vier Aminosäuren umfassende Insertion zwischen den Positionen I293 und K294 aufwies [Hayette, Chabane et al. 2009]. In beiden Fällen sprach eine The-

rapie mit Dasatinib an. Zusätzlich ist der Fall eines 18-jährigen Mannes bekannt, dessen chronisch myeloische Leukämie sich durch eine K294H_insH-Mutation auszeichnete [Nadarajan, Ang et al. 2012]. Da sich bei diesem Patient neben Imatinib auch Nilotinib als ineffektiv erwies, wurde eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt. Dasatinib wurde anscheinend nicht angewendet [Nadarajan, Ang et al. 2012].

Es deuten folglich alle Fakten darauf hin, dass eine Insertionsmutation an der Stelle K294 im BCR-ABL-Gen eine Resistenz gegenüber Imatinib hervorruft. Eine Theorie, wodurch diese verursacht wird, liefert Veera Sekaran Nadarajan [Nadarajan, Ang et al. 2012]. Demnach könnte es sein, dass durch zusätzliche Aminosäuren am besagten Ort der inhibitorische Einfluss des SH3-Kontakts (vgl. Kapitel 5.3.1) auf die ABL-Tyrosinkinase negativ beeinflusst wird. Dadurch käme es zu einer weiteren Steigerung der damit verbundenen Enzymaktivität, was die Wirkung von Imatinib beeinträchtigen würde.

Zusammenfassend liegen ausreichende Hinweise dafür vor, dass eine Insertionsmutation an der Stelle K294, insbesondere die K294S_insFPQ-Mutation, durch Dasatinib wirkungsvoll behandelt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Albers C, Illert AL, Miething C, Leischner H, Thiede M, Peschel C und Duyster J. An RNAi-based system for loss-of-function analysis identifies Raf1 as a crucial mediator of BCR-ABL-driven leukemogenesis. *Blood* **118**(8): 2200-2210 (2011)
- 2) Ali S, Nouhi Z, Chughtai N und Ali S. SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J Biol Chem* **278**(52): 52021-52031 (2003)
- 3) Alvarez-Castelao B, Ruiz-Rivas C und Castano JG. A critical appraisal of quantitative studies of protein degradation in the framework of cellular proteostasis. *Biochem Res Int* 2012: 11 Seiten (2012)
- 4) Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* **8**(11): 1018-1029 (2007)
- 5) Apperley JF. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* **8**(12): 1116-1128 (2007)
- 6) Baker CS und Dunn MJ. Preparation of proteins from gels for protein microsequencing. In: Walker JM. *Basic protein and peptide protocols*. Totowa, Humana Press Inc.: 177-184 (1994)
- 7) Borthakur G, Kantarjian H, Ravandi F, Zhang W, Konopleva M, Wright JJ, Faderl S, Verstovsek S, Mathews S, Andreeff M und Cortes JE. Phase I study of sorafenib in patients with refractory or relapsed acute leukemias. *Haematologica* **96** (1): 62-68 (2011)
- 8) Bradeen HA, Eide CA, O'Hare T, Johnson KJ, Willis SG, Lee FY, Druker BJ und Deininger MW. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood* **108**(7): 2332-2338 (2006)

- 9) Breitenbuecher F, Markova B, Kasper S, Carius B, Stauder T, Böhmer FD, Masson K, Rönstrand L, Huber C, Kindler T und Fischer T. A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML. *Blood* **113**(17): 4063-4073 (2009)
- 10) Brizzard B. Epitope tagging. *Biotechniques* **44**(5): 693-695 (2008)
- 11) Bromberg J und Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**(21): 2468-2473 (2000)
- 12) Büchner T, Niederwieser D, Schaich M und Schlenk RF. Akute Myeloische Leukämie (AML), Leitlinie, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Berlin (2010), erhältlich online unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@view/html/index.html> (abgerufen zuletzt am 26.10.2015)
- 13) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren, Braunschweig (2011), erhältlich online unter: http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahmen_deutsch/09_Viren/retrovirale_Vektoren.pdf?__blob=publicationFile&v=4 (abgerufen zuletzt am 27.02.2013)
- 14) Burkhart J, Leimbach R, Nagl D und Weinauer F. Blutpräparate und therapeutische Anwendung (Hämotherapie). In: Wintermantel E und Ha SW. *Medizintechnik, Life Science Engineering*. 5. Auflage. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag (2009)
- 15) Cepko CL, Fields-Berry S, Ryder E, Austin C und Golden J. Lineage analysis using retroviral vectors. In: de Pablo F, Ferrus A und Stern CD. *Cellular and molecular procedures in developmental biology*. San Diego, Academic Press (1998)
- 16) Chomczynski P und Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-159 (1987)

- 17) Choudhary C, Brandts C, Schwable J, Tickenbrock L, Sargin B, Ueker A, Böhmer FD, Berdel WE, Müller-Tidow C und Serve H. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* **110**(1): 370-374 (2007)
- 18) Cortes J und Kantarjian H. How I treat newly diagnosed chronic phase CML. *Blood* **120**(7): 1390-1397 (2012)
- 19) Cortes JE, Kantarjian H, Foran JM, Ghirdaladze D, Zodelava M, Borthakur G, Gammon G, Trone D, Armstrong RC, James J und Levis M. 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* **31**(29): 3681-3687 (2013)
- 20) Daley GQ und Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210^{bcr-abl} protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 9312-9316 (1988)
- 21) Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L und Larson RA; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**(23): 2408-2417 (2006)
- 22) Eckert WA und Kartenbeck J. Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immunodetektion. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 67-142 (1997)
- 23) Fathi AT und Chen YB. Treatment of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Am J Blood Res* **1**(2): 175-189 (2011)
- 24) Fischer T, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I, Estey E, Lanza C, Fox E, Ehninger G, Feldman EJ, Schiller GJ, Klimek VM, Nimer SD, Gilliland DG, Dutreix C, Huntsman-Labed A, Virkus J und Giles FJ. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and

- high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J Clin Oncol* **28**(28): 4339-4345 (2010)
- 25)Fröhling S, Schlenk RF, Breittruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H und Döhner K. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* **100**(13): 4372-4380 (2002)
- 26)Gassmann M, Grenacher B, Rohde B und Vogel J. Quantifying western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* **30**(11): 1845-1855 (2009)
- 27)Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician* **77**(3): 311-319 (2008)
- 28)Gilliland DG und Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol* **9**(4): 274-281 (2002)
- 29)Grafone T, Palmisano M, Nicci C und Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev* **6**(1): e8 (2012)
- 30)Gründemann D und Schömig E. Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques* **21**(5): 898-903 (1996)
- 31)Guo B und Bi Y. Cloning PCR products. In: Chen BY und Janes HW. *PCR cloning protocols*. 2. Ausgabe. Totowa, Humana Press Inc.: 111-119 (2002)
- 32)Hayette S, Chabane K, Tchirkov A, Berger MG, Nicolini FE und Tournilhac O. Detection of twelve nucleotides insertion in the BCR-ABL kinase domain in an imatinib-resistant but dasatinib-sensitive patient with bi-phenotypic acute leukemia. *Haematologica* **94**(9): 1324-1326 (2009)
- 33)Hehlmann R, Hochhaus A und Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **370**(9584): 342-350 (2007)
- 34)Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, Brandts C, Serve H, Roesel J, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller GJ, Nimer S, Stone RM, Wang Y, Kindler T, Cohen PS, Huber C und Fischer T.

- Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* **107**(1): 293-300 (2006)
- 35) Hochhaus A, Baerlocher GM, Brümmendorf TH, Chalandon Y, Dölken G, Thiede C, Wolf D und le Coutre P. Chronische Myeloische Leukämie (CML), Leitlinie, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Berlin (2013), erhältlich online unter: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/cml> (abgerufen zuletzt am 14.03.2013)
- 36) Hughes TP und Goldman JM. Chronic myeloid leukemia. In: Hoffmann R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ und Silberstein LE. Hematology, basic principles and practice. 2. Ausgabe. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, Milan, Tokyo, Churchill Livingstone Inc.: 1142-1159 (1995)
- 37) Ikeda M, Kanao Y, Yamanaka M, Sakuraba H, Mizutani Y, Igarashi Y und Kihara A. Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett* **582**(16): 2435-2440 (2008)
- 38) Kim TK und Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* **397**(8): 3173-3178 (2010)
- 39) Knippers R. Molekulare Genetik. 9. Auflage. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag: 302 (2006)
- 40) Levis M. FLT3/ITD AML and the law of unintended consequences. *Blood* **117**(26): 6987-6990 (2011)
- 41) Levis MJ, Perl AE, Dombret H, Döhner H, Steffen B, Rousselot P, Martinelli G, Estey EH, Burnett AK, Gammon G, Trone D, Leo E und Cortes JE. Final results of a phase 2 open-label, monotherapy efficacy and safety study of quizartinib (AC220) in patients with FLT3-ITD positive or negative relapsed/refractory acute myeloid leukemia after second-line chemotherapy or hematopoietic stem cell transplantation. American Society of Hematology, Washington (2012), erhältlich online unter: <https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper54037.html> (abgerufen zuletzt am 03.01.2016)

- 42) Lion T und Kovar H. Tumorgenetik. In: Gutjahr P. Krebs bei Kindern und Jugendlichen. 5. Auflage. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag: 10-63 (2004)
- 43) Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA und Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**(1): 1-6 (1991)
- 44) Mahon FX. JAK the trigger. *Oncogene* **24**(48): 7125-7126 (2005)
- 45) Mao X, Huang TJ und Ho CM. The lab-on-a-chip approach for molecular diagnostics. In: Grody WW, Nakamura RM, Kiechle FL und Strom C. Molecular diagnostics: techniques and applications for the clinical laboratory. London, Academic Press: 24 (2010)
- 46) Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* **88**(7): 2375-2384 (1996)
- 47) Meshinchi S und Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **15**(13): 4263-4269 (2009)
- 48) Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, Scholl S, Fey M, Götze K, Linn YC, Kröger M, Reiter A, Salih HR, Heinicke T, Stuhlmann R, Müller L, Giagounidis A, Meyer RG, Brugger W, Vöhringer M, Dreger P, Mori M, Basara N, Schäfer-Eckart K, Schultheis B, Baldus C, Neubauer A und Burchert A. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses. *Leukemia* **26**(11): 2353-2359 (2012)
- 49) Miller KB. Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. In: Hoffmann R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ und Silberstein LE. Hematology, basic principles and practice. 2. Ausgabe. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, Milan, Tokyo, Churchill Livingstone Inc.: 993-1014 (1995)
- 50) Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE und Serve H. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**(12): 3907-3914 (2000)

- 51) Moore AS, Faisal A, Gonzales de Castro D, Bavetsias V, Sun C, Atrash B, Valenti M, de Haven Brandon A, Avery S, Mair D, Mirabella F, Swansbury J, Pearson ADJ, Workman P, Blagg J, Raynaud FI, Eccles SA und Linardopoulos S. Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD⁺ acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a model for emerging clinical resistance patterns. *Leukemia* **26**(7): 1462-1470 (2012)
- 52) Morrison TB, Weis JJ und Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**(6): 954-962 (1998)
- 53) Müller-Tidow C, Krug U, Brunnberg U, Berdel WE und Serve H. Tyrosinkinasen als Ziele neuer onkologischer Therapien. *Dtsch Arztebl* **104**(19): 1312-1319 (2007)
- 54) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** Pt 1: 263-273 (1986)
- 55) Nadarajan VS, Ang CH, Seyed-Sultan MK und Bee PC. Imatinib resistance and blast transformation of chronic myeloid leukemia associated with a novel tri-nucleotide insertion mutation of BCR-ABL kinase domain at position K294. *Ann Hematol* **91**(1): 125-127 (2012)
- 56) Nakagawa H und Opitz OG. Inducing cellular senescence using defined genetic elements. In: Tollefsbol TO. *Biological aging, methods and protocols*. Totowa, Humana Press Inc. (2007)
- 57) Natsume A, Niwa R und Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther* **3**: 7-16 (2009)
- 58) Naylor LH. Transfection. In: Kendrew J. *Encyclopaedia of molecular biology*. Oxford, Blackwell Science Ltd (1994)
- 59) Netzker R. Gentechnik und Nachweis bzw. Analyse von Nukleinsäuren. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R und Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG (2006)

- 60) O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R und Druker BJ; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **348**(11): 994-1004 (2003)
- 61) Pashley C und Kendall S. Cloning in plasmid vectors. In: Casali N und Preston A. *E. coli plasmid vectors*. Totowa, Humana Press Inc.: 123 (2003)
- 62) Patel D, Suthar MP, Patel V und Singh R. BCR ABL kinase inhibitors for cancer therapy. *IJPSDR* **2**(2): 80-90 (2010)
- 63) Pear WS, Scott ML und Nolan GP. Rapid production of high titer, helper-free retroviruses using transient transfection, erhältlich online unter: http://www.stanford.edu/group/nolan/protocols/pro_helper_free.html (abgerufen zuletzt am 21.02.2013)
- 64) Pingoud A und Urbanke C. *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Berlin New York, de Gruyter (1997)
- 65) Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD und Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* **3**:18 (2003)
- 66) Pratz KW, Cho E, Levis MJ, Karp JE, Gore SD, McDevitt M, Stine A, Zhao M, Baker SD, Carducci MA, Wright JJ, Rudek MA und Smith BD. A pharmacodynamic study of sorafenib in patients with relapsed and refractory acute leukemias. *Leukemia* **24** (8): 1437-1444 (2010)
- 67) Rao DD, Vorhies JS, Senzer N und Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* **61**(9): 746-759 (2009)
- 68) Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, Rudek MA, Rajkhowa T, Richie MA, Pierce S, Daver N, Garcia-Manero G, Faderl S, Nazha A, Konopleva M,

- Borthakur G, Burger J, Kadia T, Deltasala S, Andreeff M, Cortes J, Kantarjian H und Levis M. Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. *Blood* **121**(23): 4655-4662 (2013)
- 69) Reddy EP und Aggarwal AK. The ins and outs of Bcr-Abl inhibition. *Genes Cancer* **3**(5-6): 447-454 (2012)
- 70) Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P und Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* **19**(21): 2532-2547 (2000)
- 71) Reece RJ. Analysis of genes and genomes. Chichester, John Wiley & Sons Ltd (2004)
- 72) Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* **5**(3): 172-183 (2005)
- 73) Rosenberg N und Krontiris TG. Molecular basis of neoplasia. In: Hoffmann R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ und Silberstein LE. Hematology, basic principles and practice. 2. Ausgabe. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, Milan, Tokyo, Churchill Livingstone Inc.: 899-915 (1995)
- 74) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491 (1988)
- 75) Sakai K, Ishikawa Y, Mori Y, Kobayashi M, Iriyama C, Ozawa Y, Suzuki T, Minami Y, Ishikawa K, Kaneda N, Naoe N und Kiyoi H. A novel insertion mutation of K294RGG within BCR-ABL kinase domain confers imatinib resistance: sequential analysis of the clonal evolution in a patient with chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Int J Hematol* **93**(2): 237-242 (2011)
- 76) Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Ausgabe. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- 77) Sarkar G und Sommer SS. The „megaprimer“ method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8** (4): 404-407 (1990)

- 78) Schochetman G, Ou CY und Jones WK. Polymerase chain reaction. J Infect Dis **158**(6): 1154-1157 (1988)
- 79) Schrödel A. Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer. Biol. Unserer Zeit **40**(5): 298 (2010)
- 80) Sigl M, Spoerl S, Schnittger S, Meissner J, Rummelt C, Peschel C, Duyster J, Ho AD und von Bubnoff N. Imatinib failure and response to dasatinib in a patient with chronic myeloid leukemia in blast crisis and a novel, nine-nucleotide BCR-ABL insertion mutation. Blood Cancer J **3**(3): e104 (2013)
- 81) Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. Bioinformatics **19**(11): 1439-1440 (2003)
- 82) Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2006**(1): 178-184 (2006)
- 83) Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K und Hiddemann W. Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. Clin Cancer Res **9**(6): 2140-2150 (2003)
- 84) Statistisches Bundesamt. Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, Nationalität, ICD-10, Art der Standardisierung (Primärquelle: Statistisches Bundesamt, Todesursachenstatistik). In: www.gbe-bund.de (Thematische Recherche: Gesundheitliche Lage→Sterblichkeit→Mortalität und Todesursachen→Tabelle (gestaltbar), bezieht sich auf Deutschland, alle Altersgruppen, beide Geschlechter, alle Nationalitäten, keine Standardisierung, Jahre 1998-2013. Abrufdatum 18.05.2015
- 85) Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebowitz D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG und Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. Blood **105**(1): 54-60 (2005)
- 86) Stone RM, Fischer T, Paquette R, Schiller G, Schiffer CA, Ehninger G, Cortes J, Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Huntsman-Labed A, Dutreix C, del Corral A

- und Giles F. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* **26**(9): 2061-2068 (2012)
- 87) Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G und Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* **99**(12): 4326-4335 (2002)
- 88) Thieman WJ und Palladino MA. *Biotechnologie*. München, Pearson Education Deutschland GmbH (2007)
- 89) Untch M, Jackisch C, Thomssen C, Nitz U, von Minckwitz G und Kaufmann M. Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Dtsch Arztebl* **103**(50): 3406-3410 (2006)
- 90) Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F und Capella G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des* **16**(1): 3-10 (2010)
- 91) von Bubnoff N und Duyster J. Chronische myeloische Leukämie, Therapie und Monitoring. *Dtsch Arztebl Int* **107**(7): 114-121 (2010)
- 92) von Bubnoff N, Engh RA, Aberg E, Sängler J, Peschel C und Duyster J. FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication tyrosine kinase inhibitors display a nonoverlapping profile of resistance mutations in vitro. *Cancer Res* **69**(7): 3032-3041 (2009)
- 93) von Bubnoff N, Manley PW, Mestan J, Sängler J, Peschel C und Duyster J. Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood* **108**(4): 1328-1333 (2006)
- 94) von Bubnoff N, Rummelt C, Menzel H, Sigl M, Peschel C und Duyster J. Identification of a secondary FLT3/A848P mutation in a patient with FLT3-ITD-positive blast phase CMML and response to sunitinib and sorafenib. *Leukemia* **24**(8): 1523-1525 (2010)

- 95) von Bubnoff N, Veach DR, van der Kuip H, Aulitzky WE, Sanger J, Seipel P, Bornmann WG, Peschel C, Clarkson B und Duyster J. A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl-positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor. *Blood* **105**(4): 1652-1659 (2005)
- 96) Voytas D. Agarose gel electrophoresis. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA und Struhl K. *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons Inc. (2003)
- 97) Wagener C und Müller O. *Molekulare Onkologie*. 3. Auflage. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: 77-133 (2010)
- 98) Wander SA, Levis MJ und Fathi AT. The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther Adv Hematol* **5**(3): 65-77 (2014)
- 99) Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC und Hess JL. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes Cancer* **32**(2): 97-111 (2001)
- 100) Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A und Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* **7**(5): 345-356 (2007)
- 101) Williams AB, Nguyen B, Li L, Brown P, Levis M, Leahy D und Small D. Mutations of FLT3/ITD confer resistance to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* **27**(1): 48-55 (2013)
- 102) Wobus AM. Zellkulturtechniken, Zellmodelle und Tissue Engineering. In: Ganten D und Ruckpaul K. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 2. Auflage. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag (2003)
- 103) Wong S, McLaughlin J, Cheng D, Shannon K, Robb L und Witte ON. IL-3 receptor signaling is dispensable for BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11630-11635 (2003)
- 104) Wongboonma W, Thongnoppakhun W und Auewarakul CU. BCR-ABL kinase domain mutations in tyrosine kinase inhibitors-naive and -exposed

southeast asian chronic myeloid leukemia patients. *Exp Mol Pathol* **92**(2): 259-265 (2012)

- 105) Wörmann B, Brümmendorf TH, Gökbuget N, Hochhaus A, le Coutre P, Thiede C und Wolf D. Ponatinib, Stellungnahme zur Nutzenbewertung des G-BA von Arzneimitteln für seltene Leiden gemäß § 35a SGB V und der Bewertung im IQWiG Bericht Nr. 192, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Berlin 11/2013, erhältlich online unter:
<http://www.dgho.de/informationen/nachrichten/Ponatinib%20DGHO%20Stellungnahme%2020131122.pdf> (abgerufen zuletzt am 08.03.2015)
- 106) Wörmann B, Brümmendorf TH, Hochhaus A, le Coutre P, Thiede C und Wolf D. Bosutinib, Stellungnahme zur Nutzenbewertung des G-BA von Arzneimitteln für seltene Leiden gemäß § 35a SGB V und der Bewertung im IQWiG Bericht Nr. 181, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Berlin 08/2013, erhältlich online unter:
<http://www.dgho.de/informationen/stellungnahmen/fruehenutzenbewertung/Bosutinib%20DGHO%20Stellungnahme%2020130822.pdf> (abgerufen zuletzt am 08.03.2015)
- 107) Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y, Tübing F, Thomas S, Kiebler M und Dahm R. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc* **2**(7): 1692-1704 (2007)
- 108) Zhang W, Konopleva M, Shi YX, McQueen T, Harris D, Ling X, Estrov Z, Quintas-Cardama A, Small D, Cortes J und Andreeff M. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst* **100**(3): 184-198 (2008)

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von FLT3	38
Abbildung 2: FLT3-Signalweg	39
Abbildung 3: FLT3-ITD aktiviert STAT5 direkt und unterliegt dabei keiner negativen Rückkopplung durch SOCS1	41
Abbildung 4: Abbau von pJAK2 durch SOCS1	42
Abbildung 5: C10: Überexpression von SOCS1 und deutlich reduzierte Expression von PTPLAD2	47
Abbildung 6: C10 exprimiert gegenüber ITD und C7 erhöhte Proteinmengen an SOCS1 und pJAK2	48
Abbildung 7: Western-Blot des Cycloheximid-Versuchs	50
Abbildung 8: Identischer Abbau von pJAK2 in C7 und C10, verzögerter Abbau von JAK2 in C10	51
Abbildung 9: C10 exprimiert extrem wenig bzw. kein PTPLAD2	52
Abbildung 10: Die PTPLAD2-Überexpression in C10 führt zu keiner Wiederherstellung der Sensibilität gegenüber PKC412	54
Abbildung 11: Eine erniedrigte Expression von PTPLAD2 beeinflusst nicht die proliferative Aktivität von C7 bei der Anwendung von PKC412	57
Abbildung 12: Eine SOCS1-Überexpression beeinflusst nicht die proliferative Aktivität von FLT3-ITD-positiven Ba/F3-Zellen gegenüber PKC412	59
Abbildung 13: Die ABL-Kinasedomäne mit bisher bekannten Mutationen	70
Abbildung 14: Die K294S_insFPQ-Mutation vermindert die Inhibierung der Autophosphorylierung von BCR-ABL bei der Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren	71
Abbildung 15: Die K294S_insFPQ-Mutation führt zu einer relativen Steigerung der proliferativen Aktivität von BCR-ABL-positiven Zellen bei der Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren	72

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bedanken bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian Peschel für die Überlassung der räumlichen und materiellen Ressourcen im hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der TU München.

Außerdem danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Justus Duyster für die wissenschaftliche Betreuung und die fachlichen Diskussionen besonders im Rahmen der *lab meetings* und *journal clubs*.

Ich danke allen Mitarbeitern des hämatologischen Forschungslabors am Klinikum rechts der Isar der TU München für die gute Zusammenarbeit, insbesondere gilt dieser Dank Frau Jana Sängler für die praktische Einarbeitung in die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Methoden.

Besonders herzlich möchte ich mich bedanken bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Nikolas von Bubnoff für die intensive wissenschaftlich-theoretische Betreuung, für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung von Experimenten, für die Unterstützung bei der Realisierung der Publikationen und für die Durchsicht des Manuskripts.