

**Neue therapeutische Strategien für die FLT3-ITD<sup>+</sup> akute  
myeloische Leukämie in Zusammenhang mit der  
nischenabhängigen Regulation**

**Nina Ilse Gauthier**

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

**Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender:** Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

**Prüfer der Dissertation:**

1. apl. Prof. Dr. Robert Oostendorp
2. Prof. Dr. Florian Bassermann

Die Dissertation wurde am 28.10.2020 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.03.2021 angenommen.

## **Meinen Eltern**

*Christina Gewalt und Jean-Jacques Gauthier*

# INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG .....	6
1.1	Die akute myeloische Leukämie .....	6
1.2	Die Therapie der AML .....	7
1.3	Die FLT3-ITD <sup>+</sup> AML .....	8
1.4	FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren .....	9
1.5	Sorafenib.....	10
1.6	Proteasom-Inhibitoren .....	11
1.7	Eukaryotic Initiation Translation Factor 4 B (eIF4B).....	11
1.8	Small, Glutamine-Rich, Tetratricopeptide Repeat Protein Alpha (SGTA).....	13
1.9	Die protektive Rolle der Nische .....	14
1.10	Zielsetzung des Projekts .....	16
2.	MATERIALIEN UND METHODEN .....	17
2.1	Materialien .....	17
2.1.1	Apparaturen .....	17
2.1.2	Materialien.....	18
2.1.3	Puffer, Medien und Lösungen .....	23
2.1.4	Antikörper .....	25
2.1.5	Zelllinien .....	26
2.2	Methoden .....	27
2.2.1	Zellkultur.....	27
2.2.2	Phosphoproteomics .....	28
2.2.3	Versuchsaufbau für die weiteren Experimente .....	29
2.2.4	Proteinisolierung aus den kultivierten Zellen.....	30
2.2.5	Western Blot.....	31
2.2.6	Quantifizierung von Proteinmengen auf Filmen .....	32
2.2.7	FACS-Analyse.....	32
2.2.8	Immunzytofluoreszenz-Färbung.....	33
2.2.9	Genotypisierung mittels PCR .....	34

3.	ERGEBNISSE .....	36
3.1	<b>Die Identifizierung neuer Target Proteine in kokultivierten AML-Zellen.....</b>	<b>36</b>
3.2	<b>Bestätigung der durch Sorafenib-Behandlung in Mono- und Kokultur an spezifischen Stellen phosphorylierten Proteine .....</b>	<b>37</b>
3.2.1	Die Phosphorylierung von SGTA und eIF4B wird nach Sorafenib-Behandlung von monokultivierten oder mit EL08-1D2 Stromazellen kokultivierten MV4-11 Zellen unterschiedlich reguliert .....	38
3.2.2	Die Modulation des FLT3-ITD-Signalweges durch Sorafenib-Behandlung variiert je nach Kultivierungsbedingungen .....	39
3.2.3	Auswirkung des modifizierten FLT3-ITD-Signalweges auf den Zellzyklus und das Zellüberleben .....	41
3.2.4	Die Phosphorylierung von SGTA wird nach Sorafenib-Behandlung von monokultivierten oder mit EL08-1D2 Stromazellen kokultivierten humanen primären AML-Zellen unterschiedlich reguliert .....	49
3.2.5	Die Modulation des FLT3-ITD-Signalweges durch Sorafenib-Behandlung variiert je nach Kultivierungsbedingungen in humanen primären AML-Zellen .....	50
3.2.6	Auswirkung des modifizierten FLT3-ITD-Signalweges auf den Zellzyklus und das Zellüberleben in humanen primären AML-Zellen .....	52
3.2.7	Auswirkung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib auf kokultivierte humane primäre AML-Zellen.....	56
4.	DISKUSSION .....	69
4.1	<b>SGTA, mögliches neues Target zur Eradikation der FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs .....</b>	<b>69</b>
4.1.1	SGTA, das bisher unbekannte Signalmolekül der FLT3-ITD-Signalkaskade .....	69
4.1.2	SGTA, ein möglicher Mitspieler im Schutzmechanismus der leukämischen Zellen durch deren Kokultur mit Nischenzellen.....	69
4.1.3	SGTA, ein Downstream Signalmolekül der FLT3-ITD-Signalkaskade .....	70
4.1.4	Stabilisiert SGTA als Cochaperon in seiner phosphorylierten Form den FLT3-ITD-Rezeptor, sodass die Sorafenib-Wirkung bei Kokultur auf Stromazellen umgangen werden kann?.....	71
4.1.5	SGTA beeinflusst womöglich durch seinen Phosphorylierungsstatus die Reifung des FLT3-ITD-Rezeptors und folglich den Phosphorylierungsstatus dessen Downstream Moleküls eIF4B .....	72
4.1.6	Die kombinierte Sorafenib- und Bortezomib-Therapie kann den schützenden Effekt der Stromazellen umgehen .....	76



<b>4.2</b>	<b>Einschränkungen</b> .....	<b>77</b>
4.2.1	Weitere Targets der Phosphoproteomics.....	77
4.2.2	Fehlende Heterogenität der untersuchten Zelllinien und Patientenproben .....	77
4.2.3	Sorafenib, ein Multikinase-Inhibitor .....	78
4.2.4	Viabilität und funktionelle Aktivität der behandelten Zellen .....	79
4.2.5	Ausblick.....	80
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	81
6.	SUMMARY .....	83
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	85
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	88
9.	TABELLENVERZEICHNIS.....	91
10.	LITERATURVERZEICHNIS .....	92
11.	DANKSAGUNG .....	104

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine aggressive, hämatologische, noch heute in den meisten Fällen tödliche Erkrankung. Sie ist nach wie vor, mit einem mittleren Erkrankungsalter von 67 Jahren, die häufigste die Erwachsenen betreffende akute Leukämie. Sie befällt aber, wenn auch weitaus seltener, ebenfalls Kinder (Siegel et al. 2017). Pro Jahr gibt es in Europa 5-8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter deutlich ansteigt (Fey and Buske 2013). Die AML findet ihren Ursprung in einem sehr frühen Stadium der Hämatopoese, nämlich auf Ebene der hämatopoetischen Stammzelle, welche primär im Knochenmark lokalisiert ist. Im gesunden Organismus des Säugetiers ist die hämatopoetische Stammzelle (HSC) der Grundbaustein einer jeden Zellbildung, aus ihr entwickelt sich sowohl die myeloische Stammzelle, als auch die lymphoide Stammzelle, aus welchen wiederum Schritt für Schritt die funktionstüchtigen Zellen der myeloischen, respektive der lymphatischen Zellreihe, heranreifen. Durch das Selbsterneuerungspotential der HSC ist eine lebenslange, stetige Neubildung der zellulären Bestandteile des Bluts gesichert (Laurenti and Göttgens 2018). Leukämische Stammzellen (LSCs), eine Subpopulation an Zellen, welche ein sehr ähnliches genetisches Profil wie das der HSCs und somit zahlreiche Fähigkeiten dieser, wie zum Beispiel das Selbsterneuerungspotential und das Potential zur Bildung differenzierterer Nachkommen aufweisen, erwiesen sich als ursächlich für die Entstehung der AML (Eppert et al. 2011). Durch die zusätzliche Anhäufung verschiedenster genetischer Mutationen kommt es bei der AML schließlich zur unkontrollierten Proliferation unreifer myeloischer Vorläuferzellen im Knochenmark, wodurch die normale Hämatopoese verdrängt wird. Viele weitere Organe, insbesondere die Milz und die Leber, aber auch das zentrale Nervensystem, die Lymphknoten, sowie die Hoden, können durch die leukämischen Zellen infiltriert werden (Fröhling et al. 2005; Döhner 2007).

## 1.2 Die Therapie der AML

Die allgemeine Vorgehensweise für die AML-Therapie hat sich in den letzten Jahren nicht grundlegend verändert. Klassischerweise beginnt die Therapie nach initialer Einschätzung der Eignung des Patienten mit einer intensiven Induktionstherapie nach dem „7+3“ Schema (kontinuierliche Cytarabin-Infusion von Tag 1 bis 7, zusätzliche Anthrazyklin-Gabe an Tagen 1 bis 3). Mit diesem Behandlungsregime werden bei jungen Erwachsenen (18. bis 60. Lebensjahr) vollständige Remissionsraten zwischen 60 und 80% erreicht, bei älteren Patienten betragen diese 40-60%. Die Strategie für die darauffolgende unverzichtbare Postremissions-Therapie schließt eine zusätzliche Chemotherapie und/oder eine allogene, beziehungsweise autologe Stammzelltransplantation ein. (Döhner et al. 2010; Döhner et al. 2015; Dombret and Gardin 2016). Insgesamt werden heute durch dieses Therapieregime 5-Jahres-Überlebensraten von weniger als 5-20% bei Patienten älter als 60 Jahren und von mehr als 40% bei Patienten jünger als 60 Jahren erreicht (Hackl et al. 2017). Die deutliche Abweichung zwischen den Daten bezüglich des Langzeitüberlebens und denen bezüglich des initial günstigen Ansprechens auf die Ersttherapie lassen sich durch den hohen Anteil an Patienten, die trotz möglicherweise auch mehrfach erreichten Remissionen letztendlich immer wieder Rezidive erleiden, erklären (Tallman et al. 2005; Szer 2012). Die größte Herausforderung bei der Behandlung der AML stellt somit die weiterhin gegenüber heutzutage verfügbare Therapien bestehende Resistenz dieser Erkrankung dar, welche nur selten eine erfolgreiche dauerhafte Heilung zulässt (Forman and Rowe 2013; Saraceni et al. 2016). Genetische, beziehungsweise zytogenetische Anomalien sind der wichtigste prognostische Faktor bezüglich des Ansprechens auf die Therapie und bezüglich des Überlebens der Patienten und können bereits bei Erstvorstellung eines Großteils der erwachsenen AML-Patienten detektiert werden (Mrózek et al. 2004; Estey and Döhner 2006). Zu den häufigsten, bei der AML prognostisch relevanten und auf molekularer Ebene nachweisbaren Mutationen, zählen in erster Linie diejenigen des FLT3-Genes, aber auch die des NPM1-, des DNMT3a- und des TET2-Genes (Bullinger et al. 2017).

### 1.3 Die FLT3-ITD<sup>+</sup> AML

Im gesunden menschlichen Organismus spielt die auf frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimierte Rezeptortyrosinkinase Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) eine außerordentlich wichtige Rolle für die geordnete Entwicklung reifer myeloischer Zellen (Rosnet et al. 1993; Broxmeyer et al. 1995). Im Normalfall führt erst die Bindung des Liganden FL zur Aktivierung, Dimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase, sodass zahlreiche nachgeschaltete Signalwege, einschließlich der Ras/Raf/MAPK-, der PI3K- und der STAT5-Kaskade aktiviert werden (Lavagna-Sevenier et al. 1998; Zhang et al. 2000; Rosen et al. 2010; Köthe et al. 2013).

In bis zu einem Drittel der AML-Patienten weist jedoch das FLT3-Gen Mutationen auf (Kottaridis et al. 2001), sodass die Kontrolle der Proliferation, des Überlebens und der Differenzierung der hämatopoetischen Zellen über die Bindung des Liganden FL an den FLT3-Rezeptor verloren geht.

Mit 24% ist die interne Tandemduplikation (ITD) in der juxtamembranen Domäne des FLT3-Gens die am häufigsten auftretende Mutation (Gilliland and Griffin 2002). Sie führt zur konstitutiven, vom Liganden FL unabhängigen Aktivierung der FLT3-Kinase (Kiyoi et al. 1998). Trotz ähnlicher Remissionsraten wie bei anderen AML-Formen ohne FLT3-ITD-Insertion, sind diese von kürzerer Dauer, sodass die FLT3-ITD<sup>+</sup> AML mit einer hohen Rückfallrate und einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist (Fröhling et al. 2002; Ravandi et al. 2010; Kim et al. 2015). Unter den FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Patienten haben diejenigen Patienten die schlechtesten Überlebenschancen, die eine hohe Last an mutierten Allelen oder besonders lange ITD-Insertionen aufweisen (Kim, Lee et al. 2015).

Die ITD-Mutation ist bereits in ruhenden CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Progenitorzellen nachweisbar (Levis et al. 2005), dabei scheint sie jedoch nur in CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>/CD123<sup>+</sup> Zellen vorzukommen (Al-Mawali et al. 2016). Weiterhin war die bei Kindern in CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>-</sup> Progenitorzellen detektierbare FLT3-ITD-Mutation mit dem vermehrten Tod der Patienten unter der Therapie und mit dem verfrühten Eintritt von Rezidiven assoziiert (Pollard et al. 2006). FLT3-ITD scheint somit das optimale molekulare Target für eine gezielte selektive Therapie zu sein.

## 1.4 FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren

Da Rezeptortyrosinkinasen offensichtlich zur Entstehung der AML über die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege beitragen, ist demnach deren Hemmung mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) eine vielversprechende therapeutische Option. Diese kleinen Moleküle unterdrücken über die Konkurrenz mit ATP um die aktive Bindungsstelle der Rezeptortyrosinkinase dessen Signaltransduktion, indem sowohl die Phosphorylierung von Substraten, als auch die Autophosphorylierung der Kinase selbst verhindert wird (Medves and Demoulin 2012). Bereits mehrere Studien untersuchten die alleinige oder die mit Hochdosis-Chemotherapie kombinierte Behandlung von AML-Patienten mit niedermolekularen, gegen FLT3 zielende Inhibitoren (Chen et al. 2017). Tatsächlich sind FLT3-spezifische TKI für die humane FLT3-ITD<sup>+</sup> Zelllinie MV4-11 und für FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Patientenproben zytotoxisch (Levis et al. 2002; Spiekermann et al. 2003). Allerdings ergaben klinische Studien mit FLT3-Inhibitoren unschlüssige Ergebnisse. Eine gemeinsame Erkenntnis verschiedenster Studien, welche FLT3-TKIs als Monotherapie einsetzten, ist die effektive Suppression der im peripheren Blut zirkulierenden leukämischen Blasten, bei deutlich geringer ausgeprägten Effekten auf das Knochenmark, sodass folglich nur kurzlebige Remissionsphasen beobachtet werden konnten (Smith et al. 2004; Stone et al. 2004). In einer randomisierten Phase-III-Studie, bei der die Patienten parallel mit Chemotherapie und dem FLT3-TKI Lestaurtinib behandelt wurden, konnten jedoch weder eine Besserung der vollständigen Remissionsraten, noch eine Besserung des Gesamtüberlebens festgestellt werden (Levis et al. 2011). Hingegen kam es bei Kombination des FLT3-TKI Sorafenib mit Chemotherapie in der Erstbehandlung von FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Patienten zur signifikanten Steigerung sowohl der vollständigen Remissionsraten, als auch des progressfreien 1-Jahres-Überlebens (Zhang et al. 2017). Ebenfalls konnten vielversprechende Ergebnisse beim Einsatz von Sorafenib bei FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Patienten nach Stammzelltransplantation beobachtet werden (Brunner et al. 2016). Weitere Studien untersuchten den Effekt einer kombinierten Therapie mit Sorafenib und der Standard-Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie in Abhängigkeit des Alters. Hierbei konnte bei mehr als 60 Jahre alten Patienten insbesondere aufgrund der Toxizität durch die Hinzunahme von Sorafenib weder eine signifikante Besserung des Gesamtüberlebens, noch des ereignisfreien Überlebens erzielt werden (Serve et al. 2013). Bei jüngeren, 60 Jahre oder weniger

als 60 Jahre alten Patienten konnte hierdurch hingegen bei gleichem Gesamtüberleben eine signifikante Verlängerung sowohl des ereignisfreien, als auch des rezidivfreien Überlebens erzielt werden (Röllig et al. 2015).

## 1.5 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar) ist ein oraler, zu den Biaryl-Harnstoffen gehörender, niedermolekularer Multikinase-Inhibitor, welcher ursprünglich als RAF-Kinase-Inhibitor identifiziert wurde (Lyons et al. 2001). Er ist für die Behandlung des fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinoms und des metastatischen Nierenzellkarzinoms zugelassen (Escudier et al. 2007; Llovet et al. 2008).

Weitere bekannte Targets von Sorafenib sind die bei der Tumorentwicklung und -angiogenese beteiligten Tyrosinkinase VEGFR-2/3, PDGFR- $\beta$ , c-kit und FLT3 (Wilhelm et al. 2004). Dieser TKI ist ebenfalls ein potenter Inhibitor der FLT3-ITD-abhängigen Signalwege, der jedoch bei Erwerbung von FLT3-TKD-Mutationen (FLT3 tyrosine kinase domain Mutationen) in seiner Wirksamkeit deutlich reduziert ist (Man et al. 2012). In der FLT3-ITD<sup>+</sup> leukämischen Zelllinie MV4-11 führt Sorafenib zu Zellzyklusarrest und Apoptose und hemmt die Phosphorylierung der Downstream Effektoren C-Raf und Erk1/2, hingegen können sowohl bei FLT3-ITD<sup>-</sup> Zelllinien, als auch bei FLT3-ITD<sup>-</sup> primären AML-Zellen gegenteilige Effekte beobachtet werden (Auclair et al. 2007; Fouladi et al. 2015).

Zahlreiche klinische Studien, die verschiedenste FLT3-TKIs in der Behandlung der FLT3-ITD<sup>+</sup> AML einsetzten, zeigten in der Monotherapie keinen großen Erfolg. Trotz neuester Studien welche kombinierte Therapien mit TKIs, sowie deren Einsatz nach Stammzelltransplantation prüfen, kann bisher keine ausschlaggebende Verbesserung des Langzeitüberlebens der Patienten durch TKIs erzielt werden (Fathi and Chen 2017). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die leukämischen Stammzellen ruhend in der Nische des Knochenmarks zurückbleiben und somit von den bisherigen Therapien nicht genügend erreicht werden, da sie geschützt werden.

## 1.6 Proteasom-Inhibitoren

Seit längerer Zeit wird in der AML-Therapie auch die Wirksamkeit von Proteasom-Inhibitoren untersucht (Csizmar et al. 2016). Es scheint, als könne die durch die Entstehung von Mutationen in der FLT3-Domäne bedingte Resistenzentwicklung bei alleiniger TKI-Therapie mittels über Proteasom-Inhibitoren geförderte zytotoxische Autophagozytose umgangen werden (Larrue et al. 2016). Die Dipeptidyl-Boronsäure Bortezomib (Velcade) ist der erste Vertreter der Wirkstoffklasse der Proteasom-Inhibitoren, der entwickelt wurde. Bortezomib wirkt über eine selektive und reversible Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität der 26S-Proteasomuntereinheit (Schwartz and Davidson 2004). Das Proteasom ist ein großer, multimerer Protease-Komplex, welcher die selektive Degradation von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System steuert und somit eine zentrale Rolle in der zellulären Proteinhomeostase spielt (Ciechanover 1994; Hilt and Wolf 1996). Es ist für die Proteolyse zahlreicher regulatorischer Proteine sowohl des Zellzyklus, als auch des Zelltodes verantwortlich. Durch die Inhibition des Proteasoms wird die Degradation dieser Proteine verhindert, es folgen Zellzyklusarrest und Apoptose (Elliott and Ross 2001).

## 1.7 Eukaryotic Initiation Translation Factor 4 B (eIF4B)

eIF4B spielt eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese. Zu Beginn der Translation rekrutiert eIF3 die 40S ribosomale Untereinheit und dessen assoziierten ternären Komplex eIF2/Met-tRNA/GTP. Daraus folgt der 43S-Präinitiationskomplex, welcher mithilfe des eIF4F-Komplexes an das 5'-Ende der mRNA bindet. Dieser Komplex setzt sich aus den drei Komponenten eIF4E, eIF4G und eIF4A zusammen. Dabei bindet eIF4E die m<sup>7</sup>G-cap Struktur, eIF4A löst als ATP-abhängige RNA-Helikase die sekundäre mRNA-Struktur auf für das nachfolgende Ablesen, eIF4G bindet gleichzeitig eIF4E, eIF4A und eIF3. Die eukaryotischen Initiationsfaktoren 4 (eIF4) sind demnach entscheidend für das Zusammenfügen des Ribosom-Initiationskomplexes am 5'-Ende der mRNA und somit für die Translation bei Säugetieren. Die den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF4E-bindenden Proteine (4E-BPS) können die Interaktion von eIF4E und eIF4G unterdrücken, die Bindung des

Ribosoms verhindern und somit die Translation hemmen (Hay and Sonenberg 2004; Hinnebusch and Lorsch 2012).

eIF4B ist ein 80-kDa Protein (Milburn et al. 1988). Es enthält eine N-terminale RRM-Domäne (RNA Recognition Motif), eine mittlere DRYG-Domäne (reich an Asparaginsäure, Arginin, Tyrosin und Glycin) und eine C-terminale ARM-Domäne (Arginine Rich Motif) (Shahbazian et al. 2010). Die RRM- und ARM-Domäne wirken bei der mRNA-Bindung mit, die DRYG-Domäne ist entscheidend für die Interaktion mit eIF3 und für die Selbstassemblierung von eIF4B (Méthot et al. 1994; Méthot et al. 1996). eIF4B steigert die Affinität von eIF4A für mRNA und ATP. Durch die Bindung von eIF4B an eIF4A wird dessen Helikaseaktivität gefördert und der eIF4F-Komplex stimuliert. Die Phosphorylierung von eIF4B am Serinrest 422 steigert die Aktivität des Faktors und fördert somit die Translation (Rogers et al. 1999; Andreou et al. 2017; Beglinger et al. 2017). Bei eIF4B-Hyperphosphorylierung kommt es insbesondere zu gesteigerten Translationsraten von mRNAs, die lange strukturierte 5' untranslatierte Regionen (5'UTRs) enthalten (Manzella et al. 1991).

pS422-eIF4B ist ein gemeinsames Substrat des JAK/STAT/PIM- und des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges (Yang et al. 2013; Chen et al. 2016). Diese zwei Signalwege scheinen die Phosphorylierung dieses Serinrests gegenseitig zu sichern, denn in K562-Zellen (bcr-abl-Zellen) führte erst eine Blockade der beiden Signalwege zu einer starken Inhibition der Phosphorylierung des Serinrests 422 von eIF4B, zu deutlich gesteigerter Apoptose und zu deutlich gesteigerter Hemmung des Tumorwachstums (Chen, Yang et al. 2016). Der mTOR-Signalweg reguliert über die S6K1-abhängige Phosphorylierung von S422-eIF4B den Glutaminstoffwechsel. Durch die Phosphorylierung wird die Translation stimuliert, die Glutaminaselevel steigen an und dies führt zu gesteigerter Glutaminverstoffwechslung zu Glutamat (Holz et al. 2005; Csibi et al. 2014). Auch der MAPK- und der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg überschneiden sich bei der Kontrolle der Phosphorylierung von S422-eIF4B. In HeLa-Zellen konnte durch Insulinstimulation die Phosphorylierung von S422-eIF4B über den mTOR-Signalweg gefördert werden, eine Serumstimulation förderte diese zusätzlich über den MAPK-Signalweg. RSK scheint dabei der Effektor des MAPK-Signalweges bei der Phosphorylierung von S422-eIF4B zu sein (Shahbazian et al. 2006).

Schon seit vielen Jahren wird eIF4B als potentielles Target für die Entwicklung von Therapien gegen verschiedene Tumorarten untersucht. Zuletzt wurde diesem Faktor



2014 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms zugeschrieben (Horvilleur et al. 2014).

### **1.8 Small, Glutamine-Rich, Tetratricopeptide Repeat Protein Alpha (SGTA)**

Wie das Protein eIF4B ist auch das Protein SGTA in der Proteinhomöostase, sowie in zahlreichen weiteren biologischen Prozessen involviert. Es schützt fehllokalisierte Proteine vor der Degradation, indem über dessen C-terminale Domäne die Qualitätskontrolle hydrophober Substrate erfolgt, aber auch in dem über den SGTA/BAG6-Zyklus die Dekonjugation des Ubiquitins gefördert wird (Rodrigo-Brenni et al. 2014; Wunderley et al. 2014). Ebenfalls unterstützt SGTA die Biogenese von tail-anchored Membranproteinen, indem es bei deren posttranslationaler Integration mitwirkt (Chartron et al. 2012). Weiterhin interagiert das Cochaperon SGTA mit den Chaperonen HSP90, HSP70 und HSC70 (Liu et al. 1999; Liou and Wang 2005). Es fungiert auch als Cochaperon des Androgenrezeptors und könnte durch die Interaktion mit letzterem dessen Lokalisation regulieren (Buchanan et al. 2007; Philp et al. 2013). SGTA beeinflusst die Aktivität des Androgen-, des Progesteron- und des Glukokortikoidrezeptors, sowie den Zyklus des Wachstumshormonrezeptors (Schantl et al. 2003; Philp, Butler et al. 2013; Paul et al. 2014). Bei Phosphorylierung des Serinrests 305 von SGTA wird dessen Interaktion mit dem platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ) gefördert, sodass PDGFR $\alpha$  stabilisiert wird. Diese Phosphorylierung erfolgt möglicherweise durch Akt und mehrere Studien legen nahe, dass SGTA ein Mitspieler des PI3K/Akt-Signalweges sein könnte (Moritz et al. 2010; Trotta et al. 2013; Zhu et al. 2014).

SGTA ist ein 34-kDa Protein, welches eine N-terminale Dimerisierungsdomäne, eine tetratricopeptide repeat-Domäne (TPR), sowie eine C-terminale Domäne mit glutaminreicher Region enthält (Cziepluch et al. 1998; Tobaben et al. 2003; Liou and Wang 2005; Dutta and Tan 2008). Es wurde erstmalig als neuer Interaktionspartner des Nichtstrukturproteins 1 (NS1) des Parvovirus H-1 entdeckt und interagiert über die TPR-Domäne mit weiteren viralen Proteinen des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), des Simian Virus 40 (SV40) und des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K) (Cziepluch, Kordes et al. 1998; Handley et al. 2001; Hanke et al. 2013; Walczak et al. 2014).

SGTA ist in zahlreichen Geweben exprimiert, zum Beispiel im Herzen, im Pankreas, in der Plazenta und in der glatten Muskulatur. Das humane SGTA konnte vorwiegend im Zytoplasma, jedoch auch im Nukleus nachgewiesen werden (Philp, Butler et al. 2013). Eine hohe SGTA-Expression konnte in maligne entartetem Gewebe detektiert werden, nämlich im squamösen Ösophaguskarzinom, im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), im hepatozellulären Karzinom, im Mammakarzinom, sowie im diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom. Sie korreliert positiv mit Tumorzellproliferation, histologischem Grad und schlechter Prognose (Xue et al. 2013; Lu et al. 2014; Wang et al. 2014; Yang et al. 2014; Zhu, Ji et al. 2014). SGTA könnte auch eine Rolle im Zellzyklus spielen, denn dessen Expression korrelierte in Non-Hodgkin-Lymphomzellen invers mit derjenigen des Cyklin-abhängigen Kinaseinhibitors 1B (CDKN1B), dem Inhibitor des G1/S-Phasenübergangs (Wang, Huang et al. 2014). In der gleichen Studie führte der SGTA-Knockdown zu erhöhter Zelladhäsionsrate an Fibronectin, bzw. an HS-5 Stromazellen und folglich zu verstärkter Medikamentenresistenz, ähnliche Ergebnisse konnten bei Überexpression von CDKN1B beobachtet werden (Lwin et al. 2007). Demnach könnte SGTA ein wichtiges zukünftiges Target sein, um den Schutz der leukämischen Zellen durch die Nische aufzuheben.

## **1.9 Die protektive Rolle der Nische**

Die Theorie der Nische, eine die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) regulierende und unterstützende Mikroumgebung, wurde erstmalig 1978 beschrieben (Schofield 1978). Sie setzt sich aus verschiedenen Stromazellentypen zusammen, die durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Signalmolekülen und Zytokinen das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der HSCs beeinflussen (Yin and Li 2006). Im Knochenmark können zwei unterschiedliche Nischentypen, in denen sich die HSCs aufhalten unterschieden werden, nämlich die osteoblastische (oder auch endostale) und die vaskuläre Nische. Die vaskuläre Nische scheint die kurzlebigen aktiven HSCs zu enthalten, welche durch weitere Differenzierung den Pool an zirkulierenden hämatopoetischen Zellen schnell wiederauffüllen können (Winkler et al. 2010). Die langlebigen, ruhenden, oder langsam proliferierenden HSCs befinden sich hingegen vorzugsweise in den osteoblastischen Nischen des Knochenmarks (Wilson and Trumpp 2006). Interessanterweise weisen

leukämische Stammzellen (LSCs) und normale HSCs zahlreiche gemeinsame Charakteristika auf, wie zum Beispiel ihr Selbsterneuerungspotential und die Fähigkeit zur Erzeugung einer enormen Anzahl differenzierter Nachkommen (Dick 2008). Dementsprechend wäre es möglich, dass die Knochenmarks-Nische auch den LSCs Schutz bietet. Neueste Studien sind zu der Erkenntnis gekommen, dass LSCs durch die Rekrutierung maligner Nischen eine Arzneimittelresistenz bedingen könnten, indem sie die stromale Mikroumgebung zu ihrem Vorteil reorganisieren (Colmone et al. 2008; Civini et al. 2013; Bakker et al. 2016). Weiterhin scheinen die LSCs sich analog zu den HSCs größtenteils in einem ruhenden Status zu befinden, sodass dies ebenfalls die fehlende Wirksamkeit der Chemotherapeutika, welche vornehmlich sich teilende, aktive Zellen angreifen, erklären könnte (Konopleva and Jordan 2011). Zur Heilung der Leukämie ist demnach nicht nur die Eliminierung der sich im peripheren Blut befindlichen leukämischen Zellen, sondern vor allem auch die Beseitigung der LSCs im Knochenmark, welche die Erkrankung aufrechterhalten können, notwendig.

## 1.10 Zielsetzung des Projekts

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Kokultur von primären CD34<sup>+</sup> AML-Patientenzellen mit der Stromazelllinie EL08-1D2 zur Resistenz gegenüber der TKI-Behandlung mit Sorafenib führt (Parmar et al. 2011). Der Mechanismus, der das Scheitern der TKI-Therapie bei der FLT3-ITD<sup>+</sup> AML bedingt, ist nach wie vor unklar. Die meisten Inhibitoren wurden durch in vitro Versuche mit etablierten Zelllinien wie die MV4-11 Zelllinie entwickelt, folglich wäre denkbar, dass die relevanten Targets der FLT3-Inhibitoren in primären Patientenzellen nicht alle gleichermaßen wie in der Zelllinie angegriffen werden. Damit auch die bisher gegenüber der Therapie resistenten FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs erreicht werden, müssen gezielt die Moleküle anvisiert werden, die zwar in MV4-11 Zellen erfolgreich durch die TKIs angegriffen werden, jedoch nicht in primären FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs. Ziel des Projekts ist zunächst die Erfassung der Unterschiede des Phosphoproteoms der FLT3-ITD<sup>+</sup> MV4-11- und der primären FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Zellen mit oder ohne Kontakt zur Mikroumgebung. Hierfür sollen die in der Folge der FLT3-ITD-Fehlexpression phosphorylierten Targets identifiziert werden, sowie deren spezifische Modulationen durch die TKI-Therapie untersucht werden. Dies sollte die Entdeckung TKI-resistenter Phosphoproteine und somit die Entdeckung zusätzlicher Targets in primären AML-Zellen ermöglichen, welche zu einer effizienteren Elimination der FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs führen könnten.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Apparaturen

Typ des Geräts	Name	Hersteller
Filmentwickler	OPTIMAX X-Ray Film Processor	PROTEC GmbH & Co, Oberstenfeld Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM RBE	Leica, Wetzlar, Deutschland
Flusszytometer	CyAn ADP Lx P8	Beckman Coulter, USA
Homogenisator	SONOPULS HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co., Berlin, Deutschland
Imaging System	Gel Doc XR+	Bio-Rad, München, Deutschland
Invertiertes Mikroskop	CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Elektrophoresesystem	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Scanner	EPSON Perfection 4990 PHOTO	EPSON, Meerbusch, Deutschland
Thermal Cycler	PTC 100 Peltier	Bio-Rad, München, Deutschland
Universal Microplate Reader	EL <sub>x</sub> 800 Absorbance Reader	BIO-TEK, Berlin, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 16R Multifuge 3S	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

## 2.1.2 Materialien

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -MEM, GlutaMAX-Zusatz	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Annexin-V-FITC	BD Biosciences, Allschwill, Schweiz
Benzamidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Biosciences, Allschwil, Schweiz
Biocoll-Lösung (1,077 g/ml isotonisch)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Bortezomib	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
BSA	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
CELLSTAR Centrifuge Tubes 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR Zellkulturflaschen 50 ml/250 ml/550 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR Zellkulturplatten 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
DAPI	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
Di-Natriumtetraborat	Merck Serono GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNase-I	Sigma-Aldrich, Chemie-GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, Chemie-GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DPBS	PAA, Cölbe/Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entwicklungskassetten Amersham™ Hypercassette™ Autoradiographie Cassette	Thermo Fisher Scientific, München, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) 0.5 ml/1.5 ml/ 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Essigsäure 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol, 70%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Falcon™ Round-Bottom Polypropylene Tubes	Thermo Fisher Scientific, München, Deutschland
FCS	PAA, Cölbe/Biochrom, Berlin, Deutschland
Gelatine Puder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glyzerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glyzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
HBSS	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O, destilliert, Kanister 10 l	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
HS	PAA, Cölbe/Biochrom, Berlin, Deutschland
Laemmli Sample Buffer (2x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol J.T.Baker	VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl >99.5% p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaF	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Orthovanadate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
peqGOLD PCR Master Mix	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland



<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
Phosphat-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
1x Protease-Inhibitor-Tabletten (Complete Mini, Roche)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Protein Assay Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
PVDF-Membranen, 0,45 µm	Millipore Co., Billerica, USA
RNase-A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
RPMI 1640	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sorafenib	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, München, Deutschland
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, München, Deutschland
TBS	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris/HCL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trpytan blau	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
0.5% Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
TRITON X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vakuumbetriebener Steritop Flaschenaufsatzfilter	Millipore Co., Billerica, USA
X-ray Filme	Thermo Fisher Scientific, München, Deutschland
Zellkulturschale, 100 mm, wachstumsfördernd behandelt	TPP Techno Plastic Products, AG, Trasadlingen, Schweiz

### 2.1.3 Puffer, Medien und Lösungen

Name	Bestandteile
Amido Black Destain	100 ml Methanol (100%) 100 ml Essigsäure (100%) 800 ml H <sub>2</sub> O (destilliert)
Annexin Puffer (1x)	10 mM HEPES, pH 7.4 140 mM NaCl 2.5 mM CaCl <sub>2</sub>
Freezing Medium	90% FCS 10% DMSO
HF2 Puffer	100 ml HBSS (10x) 20 ml FCS 10 ml HEPES 10 ml PenStrep 860 ml H <sub>2</sub> O (destilliert)
Lyse-Puffer (5x)	50 mM Tris/HCl, pH 7.5 650 mM NaCl 25 mM EDTA, pH 8.0 5% TRITON X-100
Lyse-Puffer „zur Anwendung“	1 Protease-Inhibitor-Tablette 2.0 ml Lyse-Puffer (5x) 0.4 ml Phosphat-Puffer (0,5 M), pH 7.0 2.0 ml Na-Pyrophosphat (50 mM), pH 7.0-7.5 1 ml NaF (0.5 M) 0.1 ml Benzamidin (5 mM) 0.1 ml PMSF (0.1 M) 0.1 ml Orthovanadate (100 mM)
MV4-11 Medium	RPMI 1640 10% FCS 5 ml PenStrep (10.000U/ml Penicillin, 10.000µg/ml Streptomycin)

Name	Bestandteile
PI-Stocklösung (5 mg/ml)	25 mg PI 5 ml DMSO
PI-Working solution (50 µg/ml)	1 ml PI-Stocklösung 100 ml PBS
Stromamedium	80% AlphaMeM mit GlutaMAX 15% FCS, Hitze inaktiviert (56°C) 5% HS, Hitze inaktiviert (56°C) 5 ml PenStrep (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin) 10 µM β-Mercaptoethanol, 100 µl
TGS-Running-Buffer (10x)	2 l H <sub>2</sub> O (destilliert) 288 g Glycin 60 g Tris 20 g SDS
Transferpuffer	3,5 l H <sub>2</sub> O (destilliert) 1 l Methanol 0,5 l TGS-Running-Buffer (10x)
Trypsin-Lösung (1x, 50 ml)	5 ml 10x Trypsin 45 ml DPBS

## 2.1.4 Antikörper

Antikörper	Klon / Konjugation	Wirt	Firma	Verdünnung	Anwendung
$\alpha$ -SGTA	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	1:800	WB
$\alpha$ -P-SGTA (S305)	D23E10	Kaninchen	Cell Signaling	1:800	WB
$\alpha$ -CDKN1B	monoklonal	Maus	BD Biosciences	1:5000, 1:500	WB, IF
$\alpha$ -eIF4-B	D2C9	Kaninchen	Cell Signaling	1:800	WB
$\alpha$ -P-eIF4-B (S422)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	1:500	WB
$\alpha$ -TBB3	9F3	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000	WB
$\alpha$ -Akt	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000	WB
$\alpha$ -P-Akt (S473)	D9E	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000	WB
$\alpha$ -FIt3	8F2	Kaninchen	Cell Signaling	1:800	WB
$\alpha$ -P-FIt3 (T591)	polyklonal IgG	Kaninchen	Cell Signaling	1:300	WB
$\alpha$ -PDGFR $\alpha$	polyklonal IgG	Kaninchen	OriGene	1:1000	WB
$\alpha$ -ZyklinD1	92G2	Kaninchen	Cell Signaling	1:25	IF
$\alpha$ -GSK3b	27C10	Kaninchen	Cell Signaling	1:100	IF
$\alpha$ -P-H2A.x (S139)	JBW301	Maus	Millipore	1:50	IF
$\alpha$ -rabbit IgG	HRP	Affe	GE Healthcare	1:10.000	WB
$\alpha$ -mouse IgG	HRP	Schaf	GE Healthcare	1:10.000	WB
$\alpha$ -rabbit IgG (H+L)	Alexa Fluor 546	Ziege	Invitrogen	1:500	IF
$\alpha$ -mouse IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen	1:500	IF
$\alpha$ -Ki-67	SolA15 / PerCP-eFluor 710	Ratte	Invitrogen	1:100	FACS

Tabelle 1. Antikörper.

## 2.1.5 Zelllinien

EL08-1D2

Von embryonaler Mausleber abgeleitete Stromazelllinie (Oostendorp et al. 2002).

MV4-11

Etablierte humane akute myeloische Leukämie Zelllinie (Lange et al. 1987).

ID [Paper]	Alter	Geschlecht	Karyotyp	Blasten (%)	FAB	Risk	Status
50	10	männlich	46, XY, t(4;11)(q21;q23)	95	M5	High	untreated

*Tabelle 2. Daten zu dem AML-Patienten von dem die Zelllinie abgeleitet wurde.*

ID [Paper]	Zelllinie	Karyotyp
50	MV4-11	48, XY, (q21;q23), +8, +19

*Tabelle 3. Daten zur etablierten leukämischen Zelllinie.*

Adulte akute myeloische Leukämiezellen

ID [Paper]	Alter	Geschlecht	Karyotyp	FLT3-ITD Ratio (bulk)	NPM1	DNMT3A	Tet2	CD34, %blasts
10	unbekannt	weiblich	46, XX	0,98	mutiert	Wildtyp	mutiert	negativ

*Tabelle 4. Daten zur eingesetzten Patientenprobe.*

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### Zellkultivierung

Die EL08-1D2 Mausstromazellen (Oostendorp et al., 2002) wurden nach raschem Auftauen bei 37°C im Wasserbad in Stromamedium aufgenommen. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 2500 rpm wurden die Zellen auf mit 0,1% Gelatine benetzten Zellkulturschalen in Stromamedium kultiviert, dabei wurden pro 1 ml Medium  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesäht. Bei Konfluenz der Zellkulturschalen wurden die Zellen gesammelt und mittels Zählkammer ausgezählt.

Die humane Zelllinie MV4-11 wurde wie oben beschrieben rasch aufgetaut und in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden bei ca.  $2-10 \times 10^5$  Zellen pro 1 ml Medium in Zellkulturflaschen kultiviert.

Die humanen primären AML-Zellen wurden wie oben beschrieben rasch aufgetaut und in Stromamedium mit DNase-I aufgenommen, um die Zellverklumpung durch DNA-Austritt aus den sterbenden Zellen zu vermindern. Weiterhin wurden die lebenden Zellen über Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation mittels Biocoll-Lösung (1,077 g/ml isotonisch) (Biochrom GmbH) selektiert, gezählt und bei  $5 \times 10^5$  Zellen pro 1 ml Medium in Zellkulturflaschen kultiviert.

#### Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden in Cryotubes bei einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Stroma-, bzw. MV4-11-Zellen pro 1 ml Freezing Medium eingefroren.

## 2.2.2 Phosphoproteomics

Da primäre Zellen mithilfe des SILAC-Ansatzes nicht gelabelt werden können, wurde die ebenfalls eine FLT3-ITD-Insertion aufweisende MV4-11 Zelllinie eingesetzt (Abbildung 1).

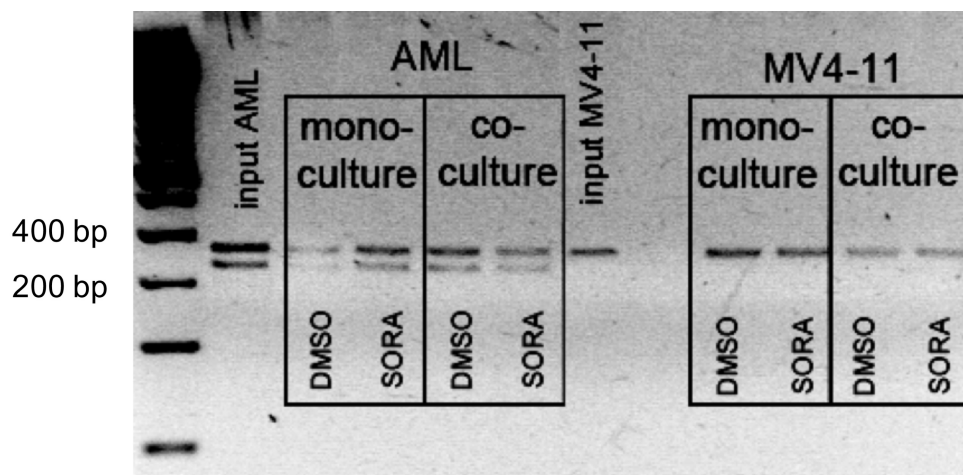


Abbildung 1. PCR-Analyse auf genomische DNA von humanen primären AML-Zellen und MV4-11 Zellen.

Als Nischenzellen wurde die murine EL08-1D2 Zelllinie gewählt, da diese Zelllinie CD34<sup>+</sup> humane Zellen in Langzeit-Kokulturen unterstützt (Kusadasi et al. 2002; Oostendorp, Harvey et al. 2002; Oostendorp et al. 2005).

Wir kultivierten die MV4-11 Zellen für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf konfluent angewachsenen EL08-1D2 Zellen und in Monokultur. Die neu synthetisierten Proteine wurden mittels metabolischer Integration des natürlich vorkommenden <sup>12</sup>C<sub>6</sub> und dessen Isotops <sup>13</sup>C<sub>6</sub> - somit erhielten wir dementsprechend jeweils « leichte » und « schwere » Ketten -, identifiziert. Dafür setzten wir entweder mit stabilem Isotop kodiertes oder mit schwerem Arginin und Lysin (jeweils Arg6, Lys4 und Arg10, Lys8) versetztes Kulturmedium (Pierce SILAC Medium, 10% FCS, 200 mg/L L-proline) ein. Weiterhin behandelten wir die Zellen für 30 Minuten mit 100 nM/L Sorafenib, welches die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors inhibiert. Nach der Kultivierung wurden die MV4-11 Zellen durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 2500 rpm gesammelt und zweimalig mit kaltem 1x PBS gewaschen. Die Stromazellen wurden für 3 Minuten in den Kultivierungsschalen trypsinisiert, mit 1x PBS gewaschen und durch



Zentrifugieren gesammelt. Die Zellpellets wurden im flüssigen Stickstoff eingefroren und für die Massenspektrometrie angewandt.

### 2.2.3 Versuchsaufbau für die weiteren Experimente

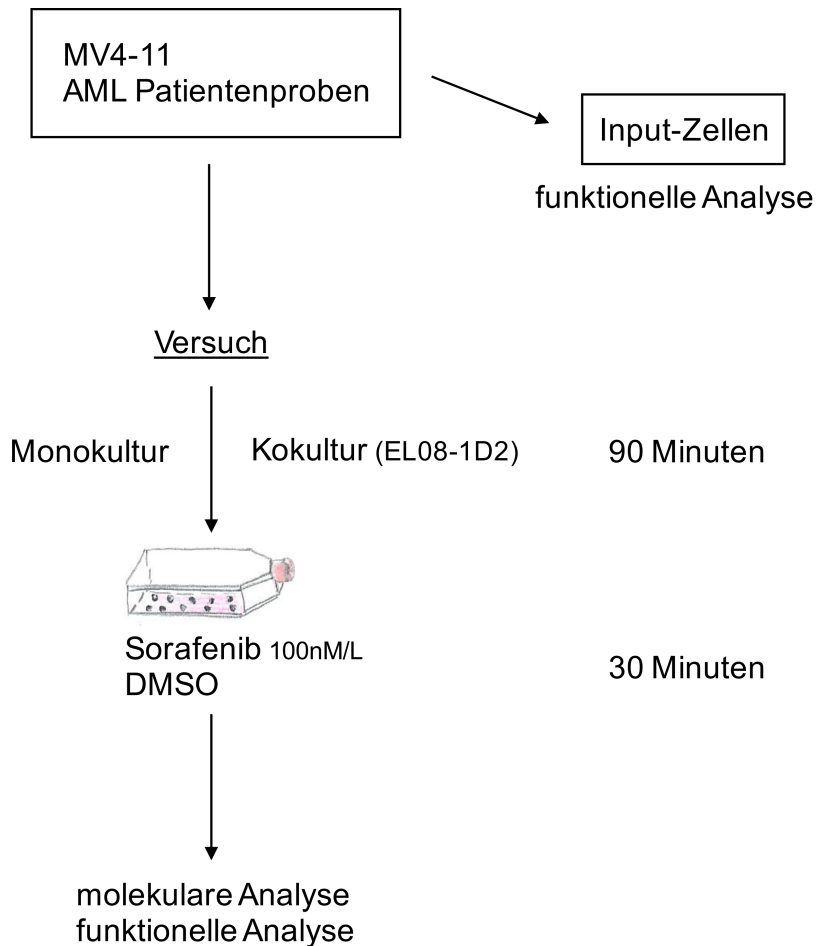


Abbildung 2. Versuchsaufbau.

Vor Durchführung der Experimente expandierte ich die MV4-11 Zellen über zwei Wochen in RPMI 1640, 10% FCS und splittete die Zellen bei  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium in Zellkulturflaschen (Abbildung 2). Die EL08-1D2 Zellen kultivierte ich bis zu 90-95%-iger Konfluenz in Stromamedium (Methoden Seite 27). Am Tag der Durchführung des Experiments nahm ich  $5 \times 10^7$  MV4-11 Zellen in Stromamedium auf und kokultivierte sie auf einem konfluenten Zellrasen aus EL08-1D2 Zellen für 90 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Während der darauffolgenden 30 Minuten der Kultivierung behandelte ich die Zellen (mono- und kokultiviert) mit Sorafenib (Endkonzentration 100

nM/L, gelöst in DMSO 200 mg/ml) und DMSO (100 nM/L) als Kontrolle. Nach der Behandlung sammelte ich die MV4-11 Zellen, wusch sie dreimalig mit kaltem 1x PBS und setzte sie ein zur Bestätigung der Proteine mittels Western Blot und Einzelzellfärbung, zur Analyse des Zelltods (Messung des Apoptoseverhaltens), sowie zur Analyse des Zellzyklus (Ki-67-Färbung) (Methoden Seite 31 bis 33). Für jede Kondition wurden jeweils drei technische Replikate erstellt, um unspezifische Effekte auszuschliessen, des Weiteren wurde das Experiment zweifach wiederholt, um die biologische Relevanz zu beweisen.

Ferner untersuchte ich für die funktionellen Analysen ebenfalls die MV4-11 Input-Zellen.

#### 2.2.4 Proteinisolierung aus den kultivierten Zellen

Für die Proteinisolierung wurden die adhärenenten Zellen (EL08-1D2) mittels 1x Trypsin benetzt und konnten nach dreiminütiger Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> lebend abgenommen und gezählt werden. Die MV4-11- und AML-Zellsuspensionen wurden ebenfalls gesammelt und gezählt. Daraufhin wurden alle Zellen einmalig mit 1x PBS gewaschen, pelletiert, schockgefrostet und bis zur Proteinisolierung bei -80°C gelagert.

Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und mit dem mit Proteaseinhibitoren ergänzten Protein-Lysepuffer vollständig lysiert. Daraufhin erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, wobei die Lysate alle 5 Minuten mittels Vortex-Schüttler durchgemischt wurden. Anschliessend wurden die Lysate mittels des SONOPULS HD 2070 Homogenisators sonifiziert (4 Zyklen, je 10 Sekunden, 30% Power) und bei 4°C für 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme der Aliquots erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen. Dann wurde jedes Lysat 1:1 mit 2x Lämmli Sample Buffer gemischt und bei -20°C gelagert.

#### Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Protein assay Kits von BioRad. Die Lysate wurden auf Eis gehalten. Zunächst erfolgte die Erstellung einer Standard-Verdünnungsreihe mit BSA Protein Standard. Hierfür wurden 5

Verdünnungen in destilliertem H<sub>2</sub>O erstellt. Weiterhin erfolgte dann die Erstellung einer Messreihe in einer flachen 96-Wellplatte. Zunächst wurden je 5 µl H<sub>2</sub>O als Blindwert in 2 Wells zur Doppelbestimmung gegeben, sowie je 5 µl der Standard-Verdünnungsreihe, ebenfalls immer in 2 Wells zur Doppelbestimmung. Dann wurde zur Doppelbestimmung der Proben je 4,5 µl H<sub>2</sub>O in 2 Wells vorgegeben, sowie 0,5 µl jeder Probe in jedes der 2 Wells dazugegeben. Für den ersten Schritt der Färbung erfolgte die Mischung von Reagenz S mit Reagenz A im Verhältnis 1:50 und das Pipettieren von je 25 µl dieses Gemischs in jedes Well. Dann wurden je 200 µl Reagenz B in jedes Well pipettiert und die Reaktionszeit von mindestens 15 Minuten abgewartet. Daraufhin erfolgte die Messung der Proteinkonzentrationen bei 750 nm im ELISA Reader (Programm: Protein in µg/µl).

### 2.2.5 Western Blot

Mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurden unter Verwendung des Mini-PROTEAN Systems von Bio-Rad die Proteine nach Molekülmasse aufgetrennt. Die zuvor mit 2x Loading Buffer versetzten Lysate wurden zunächst bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht. Nach Aufbau des Kammersystems wurde dieses mit 1x Running Buffer randvoll gefüllt. Dann wurde das Gel mit 150 µg Protein der jeweiligen Proben beladen. Als Marker des Molekulargewichts wurde das Precision Plus Protein Dual Color Standard benutzt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden dann bei 800 mA für 30-160 Minuten (30 Minuten für p27, 160 Minuten für FLT3) von dem Gel auf PVDF-Membranen transferiert. Für die Detektion von CDKN1B wurde die Membran mit 5%-igem Milchpulver und 0,1% Tween-20 in 1x TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch geblockt. Für die Detektion aller anderen Proteine wurde 5%-iges BSA und 0,1% Tween-20 in 1x TBS als Blocking Buffer genutzt. Die Membranen wurden dann über Nacht in 50 ml Falcon Tubes mit den primären Antikörpern bei 4°C inkubiert. Hierfür wurden die primären Antikörper zuvor in entsprechender Konzentration mit dem jeweiligen Blocking Buffer verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3 x für jeweils 8 Minuten mit 0,1% Tween-20 in TBS gewaschen. Anschliessend erfolgte die 30-minütige Inkubation der Membranen bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch mit den im Verhältnis 1:10.000 in dem jeweiligen Blocking Buffer verdünnten HPRT-

gebundenen sekundären Antikörpern. Hierbei wurde für die Detektion von CDKN1B ein sekundärer Antikörper vom Maus-Isotyp, für alle anderen Proteine ein sekundärer Antikörper vom Kaninchen-Isotyp benötigt. Die Membranen wurden dann 2 x über jeweils 8 Minuten mit 0,1% Tween-20 in TBS gewaschen, sowie 1 x über 10 Minuten mit reinem TBS. Die Detektion erfolgte mithilfe der SuperSignal Dura oder Femto lumineszenzbasierten Lösungen von Thermo Fisher Scientific. Hierfür wurde 1 ml der Lösung auf die entsprechende Membran gegeben und diese in eine Klarsichtfolie gelegt. Diese Folie wurde dann in eine Amersham™ Hypercassette™ Autoradiography Entwicklungskassette (Thermo Fisher Scientific) gelegt. Nach zweiminütiger Inkubation wurde in der Dunkelkammer ein X-ray Film (Thermo Fisher Scientific) aufgelegt und nach verschiedenen Belichtungszeiten entwickelt.

#### 2.2.6 Quantifizierung von Proteinmengen auf Filmen

Die Quantifizierung der Proteinmengen auf den Filmen erfolgte mit der ImageJ Software. Die Proteinmengen wurden dabei auf die Mengen des Housekeeping Proteins der jeweiligen Probe relativiert.

#### 2.2.7 FACS-Analyse

##### Intrazelluläre FACS-Analyse

Für die intrazelluläre FACS-Analyse wurden die Zellen abzentrifugiert und einmalig mit HF2-Puffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit dem BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences). Als erstes wurden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden dann mit Perm/Wash Puffer gewaschen und über Nacht bei 4°C mit Ki-67-PECy7 in Staining Buffer (4% FCS in 1x PBS) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Perm/Wash Puffer gewaschen, pelletiert und in HF2-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden mittels des CyAn ADP Lx P8 (Beckman Coulter) Flusszytometers gemessen und mittels des FlowJo 8.8.6 Programms analysiert.

## Analyse des Apoptoseverhaltens (AnnexinV-Färbung)

Für die Analyse des Apoptose-Verhaltens wurden die MV4-11-, bzw. die primären AML-Zellen der Patientin nach der Kultivierung zunächst gesammelt und je 500 µl der Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Daraufhin wurde das Medium 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In jedes FACS-Röhrchen wurde 500 µl 1x Annexin-Puffer, 5 µl Annexin-FITC (1:200) (BD Biosciences) und 10 µl PI-Workingsolution (50 µg/ml) gegeben und auf dem Vortex-Schüttler durchgemischt. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei 4°C. Im Anschluss wurde innerhalb der nächsten Stunde die Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen und mittels des FlowJo 8.8.6 Programms analysiert.

### 2.2.8 Immunzytofluoreszenz-Färbung

Für die Einzelzellfärbungen wurden je 1000 Zellen in 50 µl HF2-Puffer auf poly-L-lysine-benetzte Objektträger gegeben. Diese wurden zum Absenken für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, anschliessend mit 4% Paraformaldehyd fixiert, sowie 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10% FCS und 0,1% Triton-X in PBS geblockt. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern im Blocking Buffer inkubiert, entweder mit anti-CDKN1B und anti-Zyklin D1 oder mit anti-GSK3b und anti-γH2Ax. Als sekundärer Antikörper wurden der anti-Kaninchen, Alexa Fluor 546-konjugierte Antikörper, sowie der anti-Maus, Alexa Fluor 488-konjugierte Antikörper eingesetzt. Alle Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Zellen wurden unter 100x Vergrößerung mit einem Leica DM RBE Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und mithilfe des Programms Image J (NIH, Bethesda, USA) die Fluoreszenzintensität einer jeden einzelnen Zelle quantifiziert. Durch die DAPI-Gegenfärbung war es möglich die Kernregion von der zytoplasmatischen Region zu unterscheiden. Die nukleäre Expression konnte entsprechend der DAPI-positiven Region quantifiziert werden. Demzufolge gelang die Quantifizierung der zytoplasmatischen Expression im Zellkompartiment nach Abziehen der DAPI-positiven Region.

## 2.2.9 Genotypisierung mittels PCR

### Genomische DNA-Isolierung

Für die Isolierung der genomischen DNA wurde das Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) benutzt. Zunächst wurden die Zellen pelletiert und mittels Nuclei Lysis Buffer lysiert. Zur Proteinausfällung wurde zu den Zelllysaten Protein Präzipitationslösung gegeben, die Lysate wurden für 30 Sekunden mittels Vortex-Schüttler gut durchgemischt und anschliessend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden dann 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Zellüberstände wurden in neue 1.5 ml Eppis mit je 600 µl Isopropanol (Raumtemperatur) überführt, welche 5-8 Mal invertiert wurden um die DNA-Fäden zu einem kompakteren Gebilde zusammenzufügen. Daraufhin wurden die Eppis bei 14000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, das Isopropanol vorsichtig abpipettiert und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA-Pellets wurden für ca. 15-20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschliessend in 100 µl DNS-Puffer bei 4°C über Nacht resuspendiert.

### PCR-Analyse

Für die PCR-Analyse auf genomische DNA wurde der dNTPs und DNA Tag Polymerase enthaltende peqGOLD PCR Master Mix von Invitrogen eingesetzt. Die eingesetzten Genotypisierungsprimer amplifizieren das DNA-Fragment der ITD-Insertion zwischen Exon 14 und 15 des FLT3-Genes. Die Primersequenzen sind wie folgt: FLT3-ITD forward GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC und FLT3-ITD reverse CTTTCAGCATTGACGGCAACC (Invitrogen). Dabei beträgt das Amplikon des Wildtypallels eine Länge von 239 Basenpaaren, das des Mutantenallels eine Länge von bis zu 329 Basenpaaren. Die genauen PCR-Bedingungen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Komponenten	Quantität (µl)
PCR Master Mix	10
DMSO	1
MgCl <sub>2</sub>	1
Primer Reverse	1
Primer Forward	1
H <sub>2</sub> O	5
DNA (1:10)	0,5
Σ	19,5

Gradanzahl (°C)	Zeit	Zyklen
94	3 Min	8x
94	30 Sek	
70	30 Sek	
72	15 Sek	
94	30 Sek	25x
460	30 Sek	
72	15 Sek	
72	10 Min	1x
4	unendlich	

Tabelle 5. PCR-Mix und PCR-Bedingungen.

### Gelelektrophorese

Die Trennung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte auf 2% Agarosegel (NaB Puffer basiert) und Ethidiumbromid (0,5 µg/mL) in einer Gelelektrophoresekammer gefüllt mit 1x NaB Puffer (0,01 M Dinatriumtetraborat). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem Beladungspuffer (30% Glycerol und Orange G in H<sub>2</sub>O) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 180 V durchgeführt. Die PCR-Amplifikate wurden unter UV-Licht durch das interkalierte Ethidiumbromid mit dem BioRad Gel-Doc XR Imaging System sichtbar gemacht und fotografiert.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Die Identifizierung neuer Target Proteine in kokultivierten AML-Zellen

Ziel dieses Projekts ist zunächst die Identifizierung zusätzlicher Sorafenib-Targets anhand von Phosphoproteomics. Diese aktivierten Phosphoproteine könnten dann als neue Targets zur Eradikation der resistenten FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs in AML-Patienten herangezogen werden. Hierfür führten wir in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Küster (TU München) ein quantitatives Phosphoproteomic-Experiment mithilfe von SILAC-Labeling durch, um die Veränderungen des Phosphoproteoms primärer CD34<sup>+</sup> Zellen, welche aus bestätigten FLT3-ITD<sup>+</sup> Patientenproben gewonnen wurden, nachzuverfolgen. Da primäre Zellen mithilfe des SILAC-Ansatzes nicht gelabelt werden können, setzten wir die ebenfalls eine FLT3-ITD-Insertion aufweisende MV4-11 Zelllinie ein (Methoden, Abbildung 1, Seite 28) und behandelten diese in Mono- oder in Kokultur mit EL08-1D2 Nischenzellen mit dem TKI Sorafenib (Methoden Seite 28).

Wir konnten insgesamt 1105 Phosphorylierungsstellen auf 654 Proteinen identifizieren und quantifizieren. Davon wurden 65 durch die Sorafenib-Behandlung reguliert (Versuch 1), 69 durch die Kokultur auf Stromazellen (Versuch 3) und 91 durch die Kombination von beiden (Versuch 2). In der Tabelle 6 sind ausschliesslich die Proteine mit den spezifischen Phosphorylierungsstellen aufgeführt, welche innerhalb eines jeden Experiments signifikant unterschiedlich waren.



<b>Versuch 1</b>	<b>Versuch 2</b>	<b>Versuch 3</b>
Light Medium MV4-11 Heavy MV4-11 + Sorafenib	Light EL08-1D2 Medium MV4-11 Heavy MV4-11 + Sorafenib	Light EL08-1D2 Medium MV4-11 Heavy MV4-11 + EL08-1D2
<b>Phosphorylierungsstellen</b>		
ACIN1 (pS670)	AHNAK (v1: pS5782 - v2: pS135, pS5731)	AHNAK (pS5739)
CD97 (pS738)	DLCK1 (v1: p32 - v2: pS330/336)	FAM38H (pS914)
PDCD4 (pS445)	EIF4BB (v1: pS450 - v2: pS420)	FARP1 (pT24, pS88)
SGTA (pS301/305)	PHLDB1 (unterschiedliche Phosphorylierungsstellen)	HDAC 7 (pS64)
		PHLDB1 (pS443)
		PPFIBP1 (pS297)

*Tabelle 6. Zusammenfassung der Phosphoproteomic-Ergebnisse.*

In unserem nächsten Versuch bestätigten wir den Status der spezifischen Phosphorylierungsstellen der in Versuch 1, 2 und 3 identifizierten Proteine.

### **3.2 Bestätigung der durch Sorafenib-Behandlung in Mono- und Kokultur an spezifischen Stellen phosphorylierten Proteine**

Zur Zeit meiner Doktorarbeit waren nur zwei Antikörper, nämlich anti-pS305-SGTA und anti-pS422-eIF4B kommerziell verfügbar und wurden für die folgenden Experimente eingesetzt. In diesem Versuchsaufbau (Methoden, Abbildung 2, Seite 29) waren die Bedingungen der Kultivierung und Behandlung der Zellen denen der Experimente für die Proteomanalyse identisch.

Vor Durchführung der Experimente wurden die MV4-11 und die EL08-1D2 Zellen expandiert. Am Tag der Durchführung des Experiments wurden sie kokultiviert und mit Sorafenib oder DMSO als Kontrolle benetzt, um anschliessend einerseits zur Bestätigung der Proteine mittels Western Blot und Einzelzellfärbung, sowie andererseits zur Analyse des Apoptoseverhaltens und des Zellzyklus eingesetzt zu werden (Methoden, Seite 29-33). Für die funktionellen Analysen wurden ebenfalls die MV4-11 Input-Zellen untersucht.

3.2.1 Die Phosphorylierung von SGTA und eIF4B wird nach Sorafenib-Behandlung von monokultivierten oder mit EL08-1D2 Stromazellen kokultivierten MV4-11 Zellen unterschiedlich reguliert

Zunächst analysierte ich den Phosphorylierungsstatus der Proteine SGTA und eIF4B nach Behandlung mit Sorafenib bei Mono- und Kokultur.

Ich konnte eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung des Serinrests S305 des Proteins SGTA in monokultivierten MV4-11 Zellen feststellen, hingegen war diese bei Kokultur signifikant gesteigert (Abbildung 3 A, B).

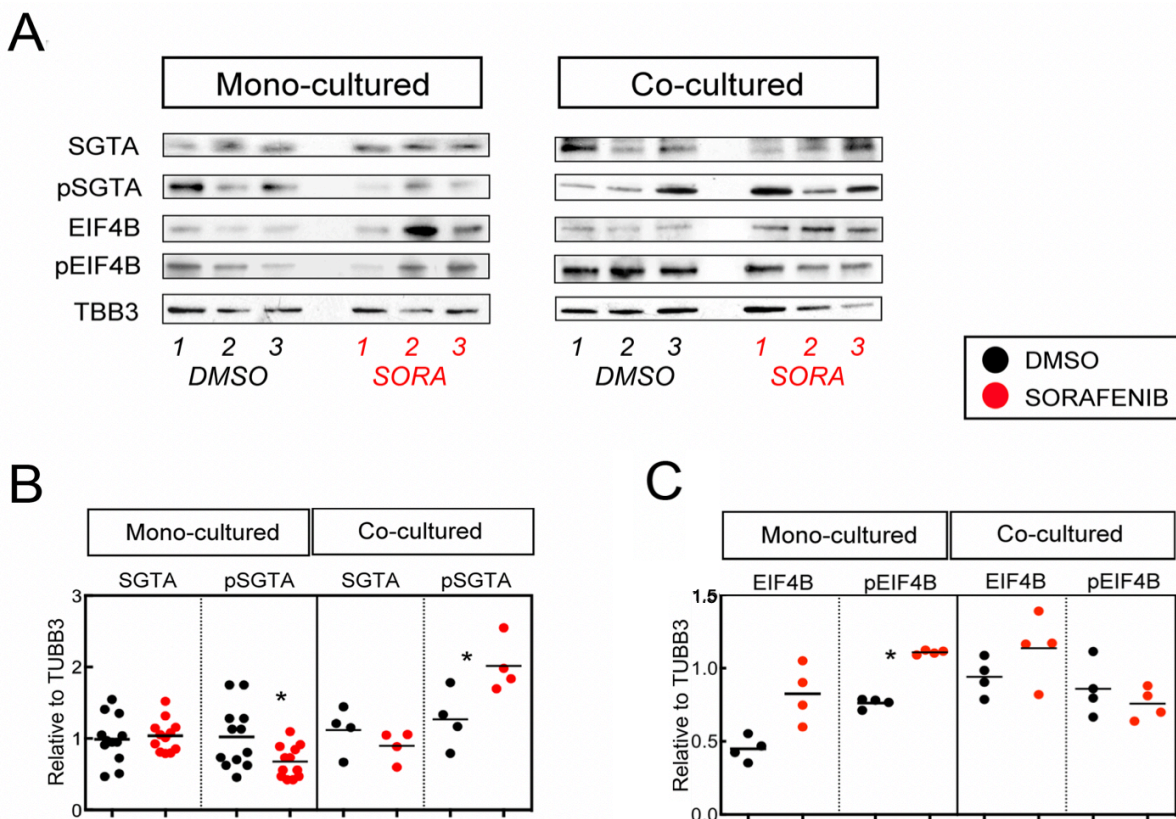


Abbildung 3. Phosphorylierungsstatus von SGTA und eIF4B nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen.

(A) Repräsentative Western Blots (die Zahlen stehen für die technischen Replikate, die roten Zahlen stehen für die mit Sorafenib behandelten Proben); (B, C) Die Streudiagramme (Scatter plots) stellen die relative Expression der analysierten Proteine und ihrer Modifikationen in Bezug auf das house-keeping Gen (TUBB3) dar;  $n \geq 4$ , \* deutet auf einen p-Wert  $< 0.05$  hin. Die Quantifizierung der Proteinmengen auf den entwickelten Westen Blot Filmen erfolgte mit der ImageJ Software.

Die Phosphorylierung des Serinrests S422 des Proteins eIF4B verhielt sich gegensätzlich zu derjenigen des Proteins SGTA. Nach der Behandlung mit Sorafenib war sie in monokultivierten MV4-11 Zellen signifikant gesteigert, in kokultivierten Zellen jedoch im Vergleich zur DMSO-Kontrolle unverändert (Abbildung 3 A, C). Diese Ergebnisse legen einen Einfluss der Stromazellen auf den Phosphorylierungsstatus der beiden analysierten Proteine nahe.

### 3.2.2 Die Modulation des FLT3-ITD-Signalweges durch Sorafenib-Behandlung variiert je nach Kultivierungsbedingungen

Der FLT3-Rezeptortyrosinkinase ist der proliferative PI3K/AKT-Signalweg nachgeschaltet (Abbildung 4). Die Bindung des Liganden FL an den FLT3-Rezeptor führt zu dessen Aktivierung, Dimerisierung und Autophosphorylierung. Im Falle einer FLT3-ITD-Mutation ist die FLT3-Rezeptortyrosinkinase unabhängig vom Liganden FL konstitutiv aktiv (Kiyoi, Towatari M Fau - Yokota et al. 1998). Die aktive FLT3-Kinase führt zu Phosphorylierung und Aktivierung von AKT1 (Brandts et al. 2005), sodass die Caspase-gesteuerte Spaltung des Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p27<sup>Kip1</sup> (CDKN1B) induziert wird (Yang et al. 2012). Hiermit kann p27<sup>Kip1</sup> (CDKN1B) nicht mehr die Aktivität von Zyklin D1 (CCND1) inhibieren, sodass die Progression von G1- zu S-Phase eingeleitet wird und die Zellen proliferieren (Baldin et al. 1993; Ray et al. 2009). Somit sind sie anfälliger für durch Chemotherapie induzierbare Apoptose.

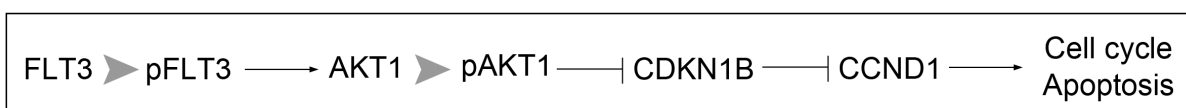
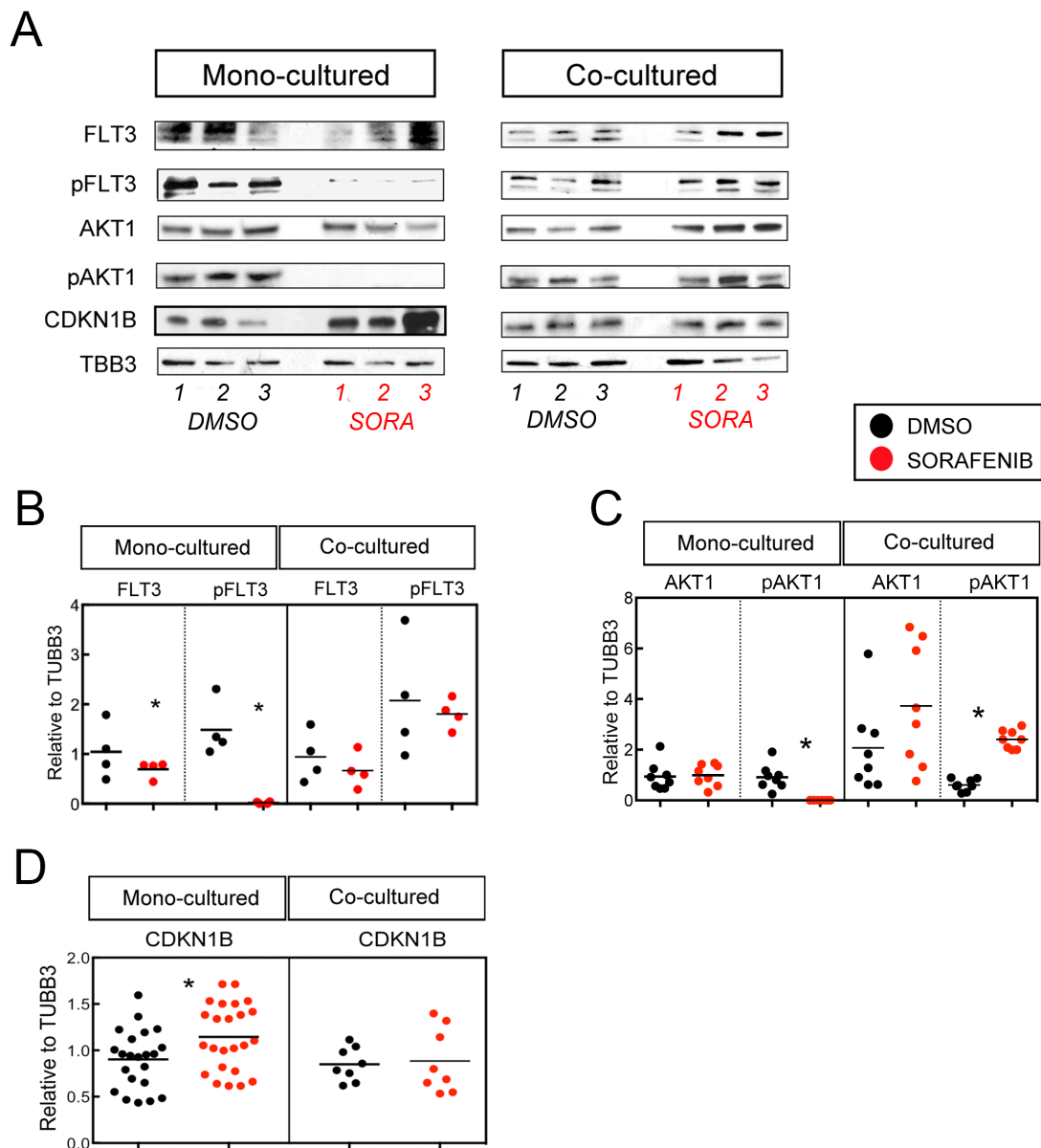


Abbildung 4. Der FLT3-Signalweg in humanen Zellen.

➤ steht für Aktivierung, —| steht für Block.

In dem nächsten Versuch untersuchte ich den durch Sorafenib-Behandlung modulierbaren FLT3-Signalweg. In Übereinstimmung mit vorherigen Erkenntnissen (Auclair, Miller et al. 2007), resultierte die Sorafenib-Behandlung in einer drastischen Abnahme der FLT3-Phosphorylierung in monokultivierten MV4-11 Zellen (Abbildung 5 A, B).



**Abbildung 5.** *Phosphorylierungsstatus von FLT3 und AKT1 und Proteinmenge von CDKN1B nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen.* (A) Repräsentative Western Blots (die Zahlen stehen für die technischen Replikate, die roten Zahlen stehen für die mit Sorafenib behandelten Proben); (B, C) Die Streudiagramme (Scatter plots) stellen die relative Expression der analysierten Proteine und ihrer Modifikationen in Bezug auf das house-keeping Gen (TUBB3) dar; (D) Das Streudiagramm stellt die relative Expression des analysierten Proteins in Bezug auf das house-keeping Gen (TUBB3) dar;  $n \geq 4$ , \* deutet auf einen p-Wert  $< 0.05$  hin. Die Quantifizierung der Proteinmengen auf den entwickelten Westen Blot Filmen erfolgte mit der ImageJ Software.

Im Gegensatz hierzu war die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors infolge der Sorafenib-Behandlung nicht betroffen, wenn die Zellen mit EL08-1D2 kokultiviert wurden (Abbildung 5 A, B). Der aktivierte FLT3-Rezeptor phosphoryliert eine Vielfalt an verschiedenen Substraten (Takahashi 2011). Eines dieser Targets ist die durch das AKT1 Gen kodierte RAC-alpha Serin-/Threonin-Proteinkinase, welche Zellmetabolismus, -proliferation, -überleben, -wachstum und die Angiogenese reguliert. In monokultivierten mit Sorafenib behandelten MV4-11 Zellen war die Phosphorylierung von AKT1 nahezu undetektierbar (Abbildung 5 A, C). In kokultivierten mit Sorafenib behandelten MV4-11 Zellen hingegen erschien die Phosphorylierung von AKT1 signifikant gesteigert (Abbildung 5 A, C).

In zahlreichen Karzinomzellen regulierte AKT1 die Expression des Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p27<sup>Kip1</sup> (CDKN1B) durch PI3K/AKT-vermittelte proteasomale Degradation (Motti et al. 2005; Yang, Liu et al. 2012). Ich stellte eine signifikante Steigerung von CDKN1B nach der Sorafenib-Behandlung monokultivierter MV4-11 Zellen fest (Abbildung 5 C, D). In kokultivierten mit Sorafenib behandelten MV4-11 Zellen erschien die Gesamtproteinmenge von CDKN1B unverändert (Abbildung 5 C, D). Diese Ergebnisse legen einen modifizierten Zellzyklus nahe, da bekannt ist, dass CDKN1B den Zellzyklus durch Bindung unterschiedlicher Zyklinabhängiger Kinasen blockiert. Über den gleichen Mechanismus der Komplexbildung mit CDK4 kann CCND1 die Zellproliferation induzieren (Blain et al. 1997; Sherr and Roberts 1999; Sherr et al. 2016).

### 3.2.3 Auswirkung des modifizierten FLT3-ITD-Signalweges auf den Zellzyklus und das Zellüberleben

Zunächst analysierte ich durch Kombination von AnnexinV- und Propidiumiodid-Färbung (PI-Färbung) die Viabilität der mit Sorafenib behandelten MV4-11 Zellen in Mono- oder Kokultur (Methoden, Seite 33). Hierbei bindet AnnexinV an das Phosphatidylserin (PS), welches bei Apoptose einer Zelle von der Innenseite auf die Außenseite ihrer Membran transloziert wird. Die PI-Färbung ermöglicht eine zusätzliche separate Darstellung der nekrotischen Zellen in der FACS-Analyse.

Die Sorafenib-Behandlung führte in den monokultivierten MV4-11 Zellen zu einer verminderten Prozentanzahl lebender, AnnexinV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> Zellen und zu einer gesteigerten Prozentanzahl apoptotischer, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> Zellen (Abbildung 6 B, C).

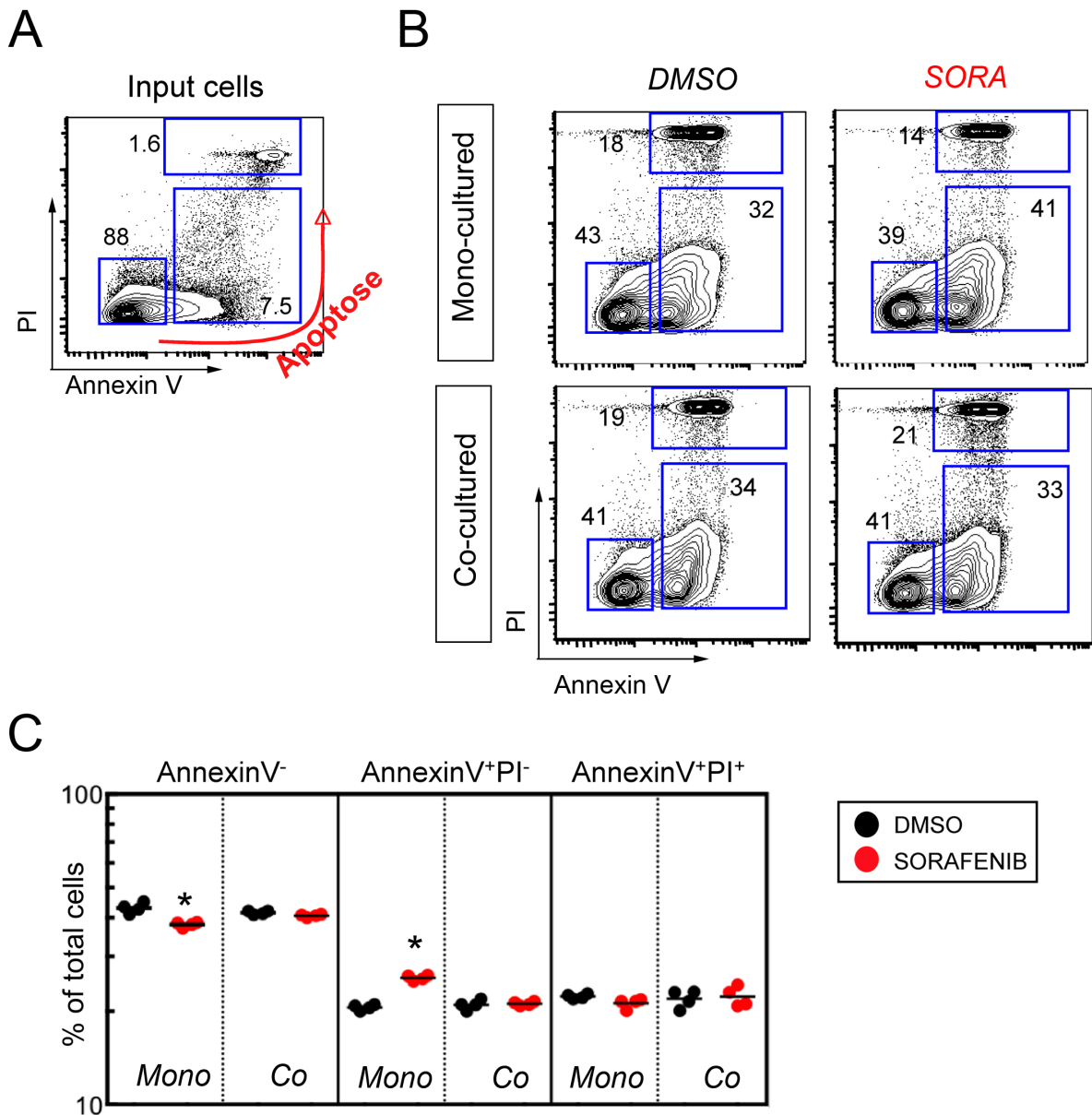


Abbildung 6. Viabilität der MV4-11 Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer AnnexinV-Färbung; (A) Repräsentatives FACS Diagramm der Input-Zellen. Lebende Zellen sind AnnexinV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>, apoptotische Zellen sind AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, nekrotische Zellen sind AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>; (B) Repräsentative FACS Diagramme von behandelten MV4-11 Zellen in Mono- und Kokulturen; (C) Das Streudiagramm zeigt den Prozentanteil an AnnexinV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen der behandelten MV4-11 Zellen in Mono- und Kokulturen an; n=4, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin. Zur Visualisierung aller Daten wurde eine logarithmische Skala eingesetzt.

Der Prozentanteil der nekrotischen AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen war nach Sorafenib-Behandlung vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle. In den kokultivierten MV4-11 Zellen war die Anzahl apoptotischer Zellen nach Sorafenib-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle unverändert (Abbildung 6 B, C). Diese Ergebnisse stimmen überein mit der in vorherigen Publikationen beschriebenen protektiven Funktion der Stromazellen (Parmar, Marz et al. 2011).

Im nächsten Versuch analysierte ich die Proliferation der MV4-11 Zellen. Diese fixierte und permeabilisierte ich und färbte sie mit einem gegen das Protein Ki-67 gerichteten Antikörper, sowie mit PI (Methoden, Seite 32). Das Ki-67 Protein ist in proliferierenden Zellen deutlich nachweisbar und PI interkaliert sowohl in DNA, als auch in RNA. Die G0-, G1- und S-Phasen des Zellzyklus sind folgendermaßen definiert: G0-Zellen sind negativ für Ki-67 und PI, G1-Zellen beginnen Ki-67 zu exprimieren, haben aber keine DNA akkumuliert und S-Phasen-Zellen sind durch die DNA-Duplikation sowohl für Ki-67, als auch für PI positiv.

In der Monokultur befanden sich die mit Sorafenib behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vermehrt in der G0-Phase und vermindert in G1-Phase des Zellzyklus, die S-Phase erschien unverändert (Abbildung 7 B, C).

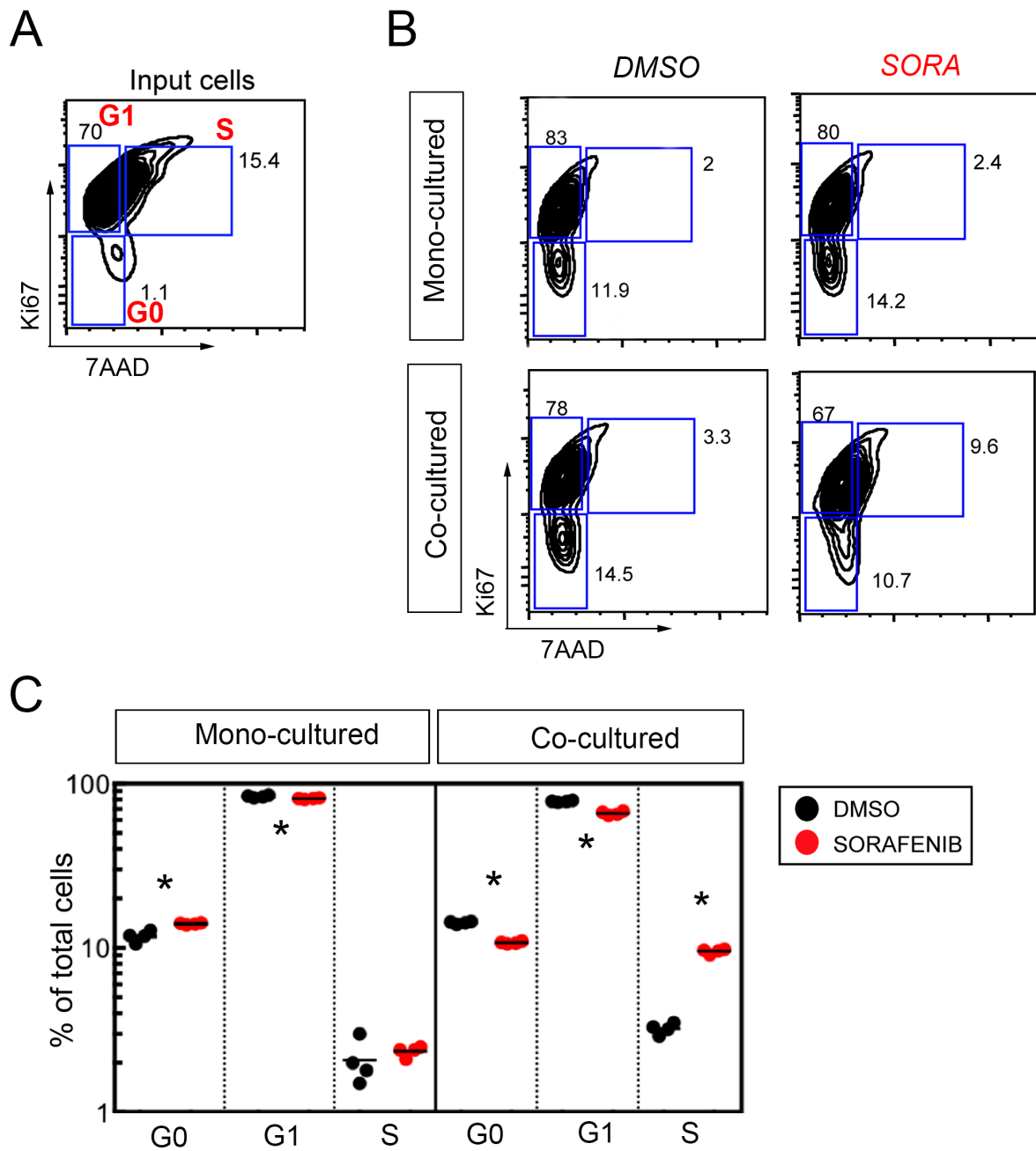


Abbildung 7. Proliferation der MV4-11 Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung.

(A) Repräsentatives FACS Diagramm der Input-Zellen. G0-Zellen sind negativ für Ki-67 und PI, G1-Zellen sind Ki-67 positiv, S-Phasen-Zellen sind positiv für Ki-67 und PI; (B) Repräsentative FACS Diagramme von behandelten MV4-11 Zellen in Mono- und Kokulturen; (C) Das Streudiagramm zeigt den Prozentanteil an sich in der G0-, G1- oder S-Phase befindenden MV4-11 Zellen an, die in Mono- und Kokulturen behandelt wurden; n=4, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin. Zur Visualisierung aller Daten wurde eine logarithmische Skala eingesetzt.

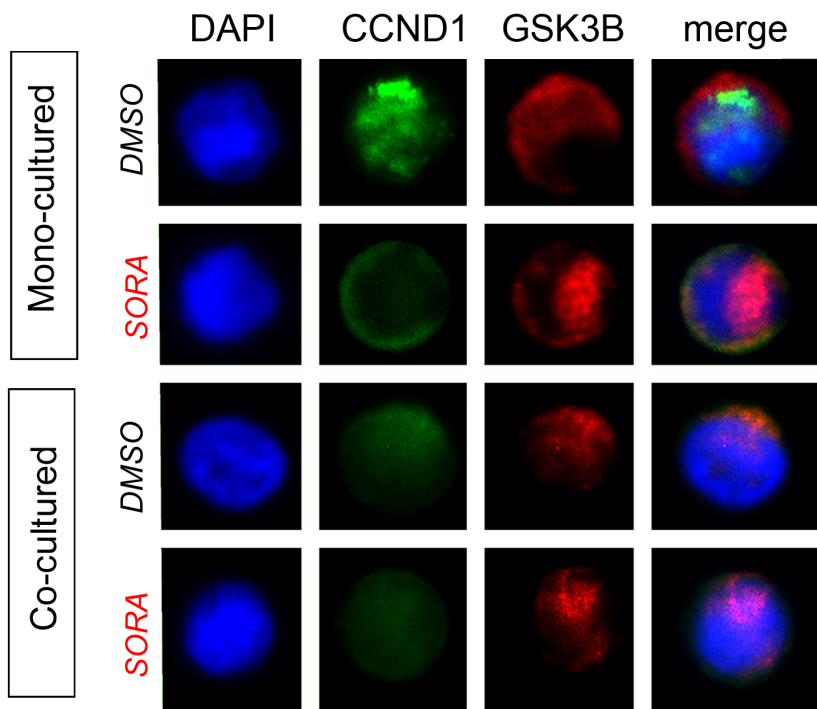


In der Kokultur befanden sich die mit Sorafenib behandelten MV4-11 Zellen vermindert in der G0- und G1-Phase, sowie vermehrt in der S-Phase des Zellzyklus (Abbildung 7 B, C). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auf Stroma kokultivierte MV4-11 Zellen die Behandlung mit Sorafenib durch Aktivierung des Zellzyklus kompensieren, sodass die MV4-11 Zellen beschleunigt proliferieren.

Auf der molekularen Ebene wird die Progression von G1- zu S-Phase durch Transkriptionsfaktoren unterstützt, welche über die Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins durch den aktiven Komplex von Zyklin D1 (CCND1) und Zyklinabhängigen Kinasen induziert werden (Baldin, Lukas et al. 1993; Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008).

Ich identifizierte nach Sorafenib-Behandlung der monokultivierten MV4-11 Zellen eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verminderte Expression von CCND1 (Abbildung 8 A, B).

A



B

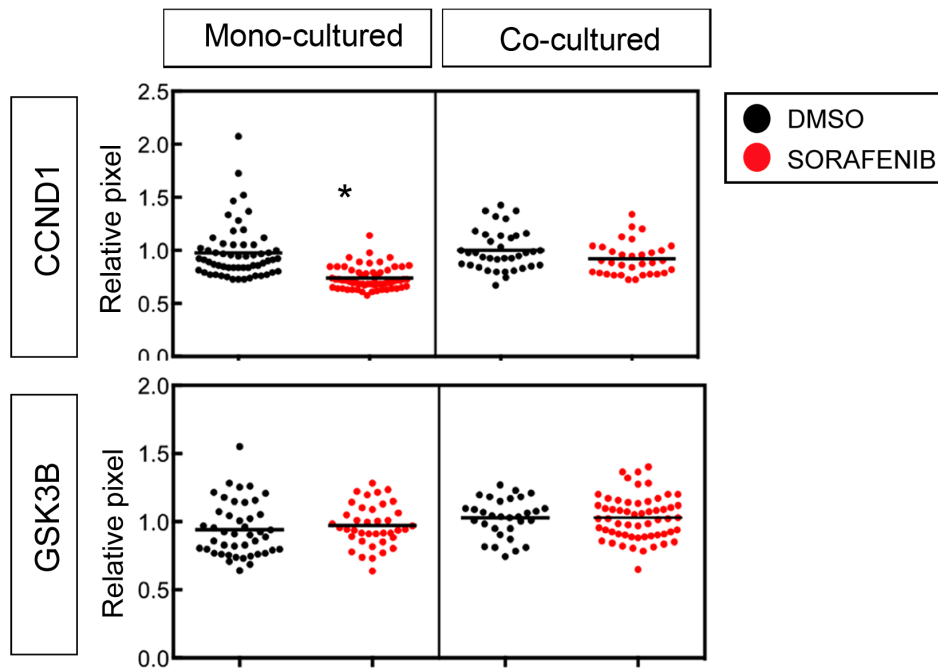


Abbildung 8. Expression von CCND1 und GSK3B in MV4-11 Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen.

(A) Repräsentative Aufnahmen einzelner Zellen, gefärbt mit den jeweiligen Antikörpern (Grünes Signal entspricht der Expression von CCND1, rotes Signal - GSK3B; alle Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt - blaues Signal); (B) Die Streudiagramme zeigen die relative Pixelintensität in Bezug zum Mittelwert der DMSO-Kontrolle an. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.

Die Expression von GSK3B war nach Sorafenib-Behandlung unverändert, sodass GSK3B nicht die Ursache der verminderten CCND1-Expression zu sein scheint und ein anderer Signalweg hierfür verantwortlich sein könnte. Um den Wnt-Signalweg als Ursache der modifizierten CCND1-Expression sicher ausschließen zu können, wäre die Wiederholung der Färbung mit anti-pGSK3B notwendig, welche leider erfolglos war.

Dieses Ergebnis unterstützt meine vorherigen Ergebnisse, welche eine verminderte Proliferation der mit Sorafenib behandelten monokultivierten MV4-11 Zellen nahelegen. Interessanterweise hatte die Behandlung mit Sorafenib keinen Einfluss auf die CCND1-Expression in mit EL08-1D2 Stromazellen kokultivierten MV4-11 Zellen (Abbildung 8 A, B).

Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Anprechen der MV4-11 Zellen auf Sorafenib durch ihre Kokultur mit Stromazellen moduliert wird. Der Großteil der kokultivierten MV4-11 Zellen befand sich in der S-Phase des Zellzyklus, möglicherweise durch unbeeinträchtigte Expression des CCND1 Proteins nach der Sorafenib-Behandlung (Abbildung 9).

MV4-11  
30 minutes

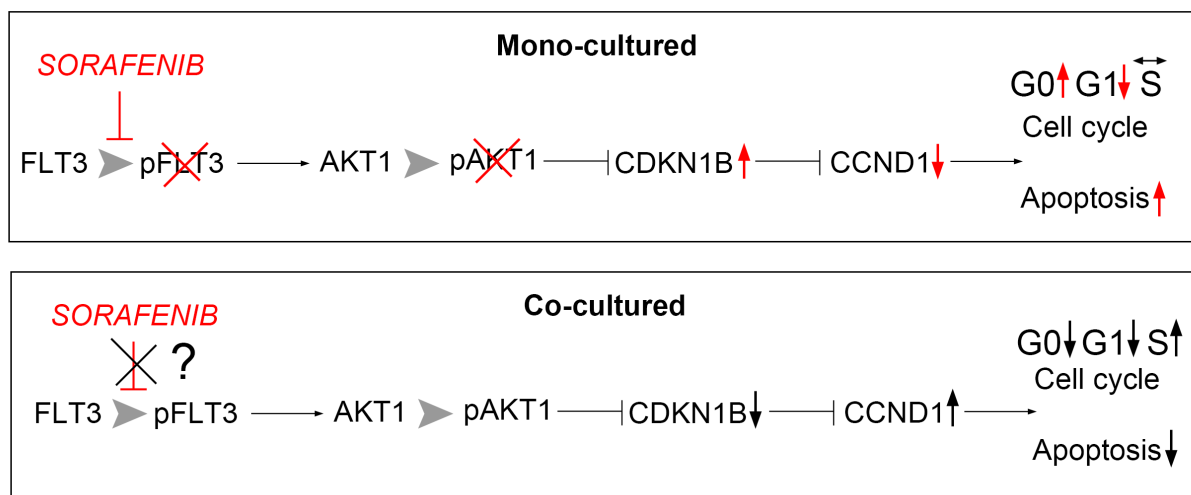


Abbildung 9. Schematische Darstellung des FLT3-Signalweges in Mono- und Kokulturen basierend auf oben erwähnte Ergebnisse.

➤ steht für Aktivierung, —| steht für Block.

Im Gegensatz hierzu war die Expression des CCND1 Proteins in monokultivierten MV4-11 Zellen nach der Behandlung mit Sorafenib reduziert. Dies könnte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in G0-, G1- und S-Phase zur Folge gehabt haben. Des Weiteren waren die auf einer Stromazellschicht kokultivierten MV4-11 Zellen nach der Sorafenib-Behandlung weniger apoptotisch als die monokultivierten Zellen. Diese funktionellen Unterschiede zwischen kokultivierten und monokultivierten MV4-11 Zellen ereignen sich möglicherweise durch die Modulation des FLT3-Rezeptor-Signalweges, welcher durch Sorafenib unterdrückt wird. Ich beobachtete in den monokultivierten MV4-11 Zellen eine signifikante Inhibition der FLT3-Phosphorylierung nach der Behandlung mit Sorafenib. Dies führte zu einem verminderten Anteil des aktiven phosphorylierten AKT1, welches die Wirkung von CDKN1B unterdrückt, indem es dessen Spaltung hervorruft. In der Folge war CDKN1B vermehrt nachweisbar und inhibierte die Expression von CCND1, sodass die Progression von G1- zu S-Phase gehemmt wurde.

Bei Kokultur der MV4-11 Zellen mit EL08-1D2 Stromazellen konnte ich nach der Behandlung mit Sorafenib keine Suppression der Phosphorylierung von FLT3 mehr feststellen. Folglich ist der Anteil des aktiven phosphorylierten AKT1 wieder angestiegen. Interessanterweise erschien jedoch bei der Kokultur sowohl die Expression des Proteins CDKN1B, als auch die Expression von CCND1 durch die Sorafenib-Behandlung unbeeinträchtigt.

Das Protein SGTA spielt eine Rolle im Zellzyklus und korreliert mit Tumorzellproliferation (Wang, Huang et al. 2014; Zhu, Ji et al. 2014). Der Knockdown dieses Proteins hat eine verminderte Expression von CCND1 zur Folge (Chen et al. 2014). Ich konnte eine Modulation dieses Proteins durch die Nische feststellen. Während der Anteil des phosphorylierten SGTAs durch Sorafenib bei Monokultur vermindert erschien, war er bei Kokultur der Zellen auf Stromazellen deutlich erhöht. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die durch Sorafenib unbeeinträchtigte CCND1-Expression bei Kokultur.

Das Protein eIF4B spielt ebenfalls eine Rolle in der Tumorentstehung, wobei dessen Phosphorylierung am Serinrest 422 dessen Aktivität steigert und somit die Translation fördert (Raught et al. 2004; Shahbazian, Parsyan et al. 2010).

Auch bei diesem Protein konnte ich eine Modulation durch die Nische feststellen, diese war gegensätzlich zu der des Proteins SGTA. Der Anteil des phosphorylierten eIF4Bs

erschien durch Sorafenib bei Monokultur gesteigert, bei Kokultur auf Stromazellen hingegen zeigte sich im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine Veränderung.

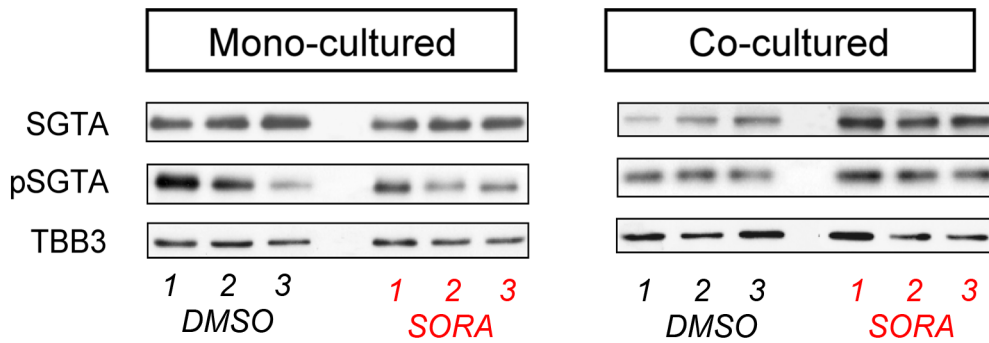
### 3.2.4 Die Phosphorylierung von SGTA wird nach Sorafenib-Behandlung von monokultivierten oder mit EL08-1D2 Stromazellen kokultivierten humanen primären AML-Zellen unterschiedlich reguliert

Zunächst analysierte ich den Phosphorylierungsstatus des Proteins SGTA nach Behandlung mit Sorafenib bei Mono- und Kokultur.

Der für die Detektion von eIF4B in MV4-11 Zellen eingesetzte Antikörper führte bedauerlicherweise zu keinen Ergebnissen in der molekularen Analyse des Primärmaterials. Es fehlten die finanziellen Mittel zur Bestellung eines anderen Antikörpers.

Wie schon zuvor bei den MV4-11 Zellen beobachtet, konnte ich eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung des Serinrests S305 des SGTA Proteins in monokultivierten mit Sorafenib behandelten primären AML-Zellen feststellen, hingegen war diese bei Kokultur erneut signifikant gesteigert (Abbildung 10 A, B).

A



B

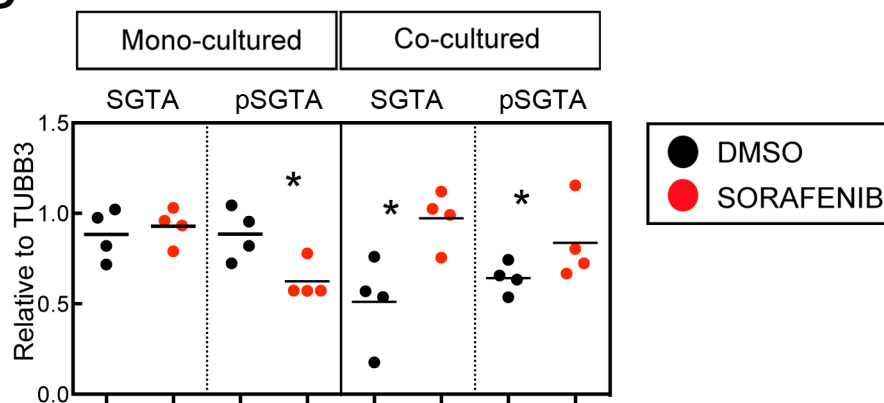


Abbildung 10. Phosphorylierungsstatus von SGTA nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen.

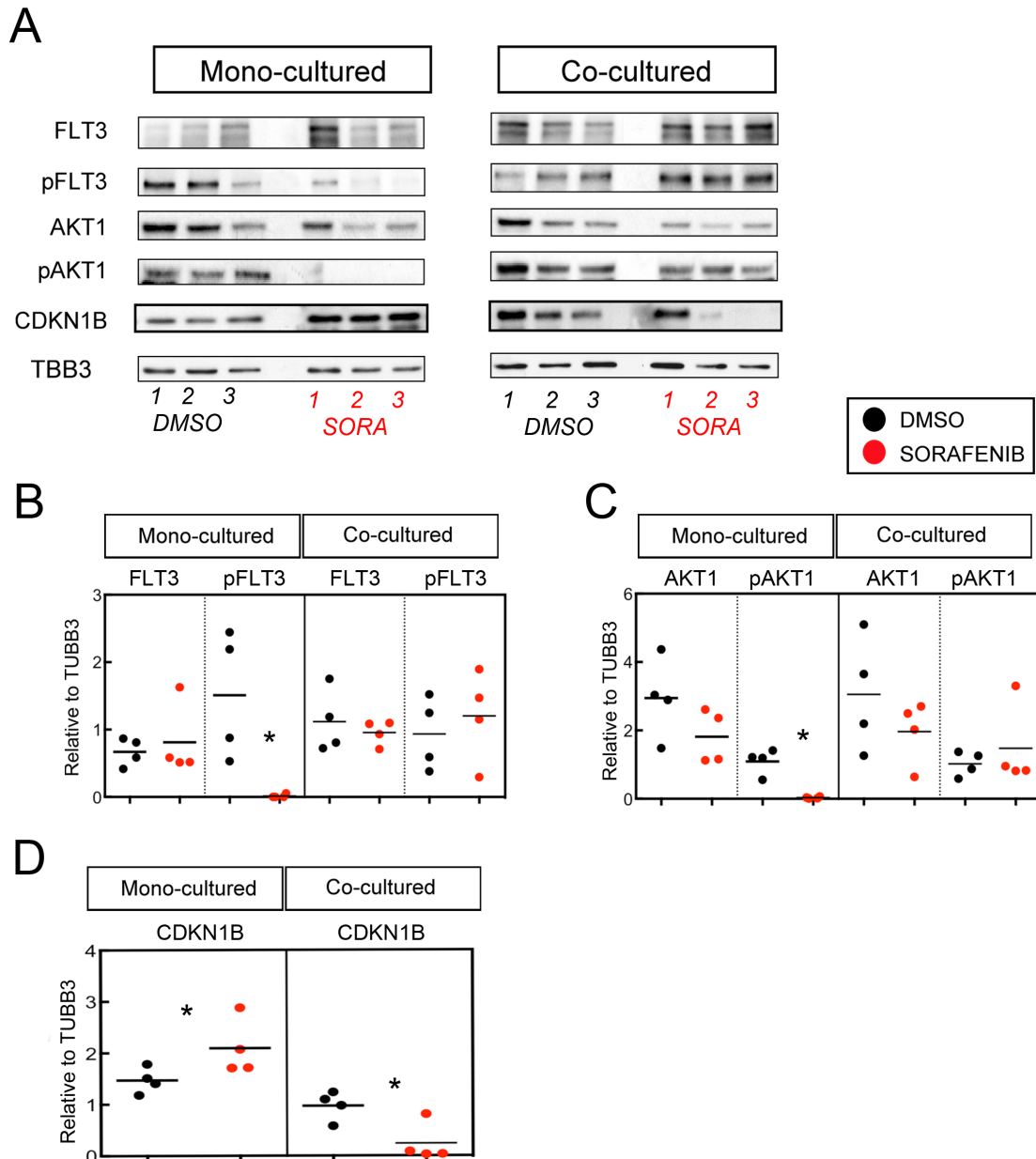
(A) Repräsentative Western Blots (die Zahlen stehen für die technischen Replikate, die roten Zahlen stehen für die mit Sorafenib behandelten Proben); (B) Das Streudiagramm (Scatter plot) stellt die relative Expression der analysierten Proteine und ihrer Modifikationen in Bezug auf das house-keeping Gen (TUBB3) dar; n=4, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin. Die Quantifizierung der Proteinmengen auf den entwickelten Western Blot Filmen erfolgte mit der ImageJ Software.

Zusätzlich beobachtete ich bei Kokultur der AML-Zellen einen signifikanten Anstieg der Gesamtmenge des Proteins SGTA. Diese Ergebnisse legen einen Einfluss der Stromazellen auf den Phosphorylierungsstatus des analysierten Proteins nahe.

### 3.2.5 Die Modulation des FLT3-ITD-Signalweges durch Sorafenib-Behandlung variiert je nach Kultivierungsbedingungen in humanen primären AML-Zellen

In dem nächsten Versuch untersuchte ich den durch Sorafenib-Behandlung modulierbaren FLT3-Signalweg (Abbildung 4, Seite 39). In Übereinstimmung mit den

bei den MV4-11 Zellen beobachteten Ergebnissen, resultierte die Sorafenib-Behandlung in einer drastischen Abnahme der FLT3-Phosphorylierung in monokultivierten primären AML-Zellen (Abbildung 11 A, B).



**Abbildung 11. Phosphorylierungsstatus von FLT3 und AKT1 und Proteinmenge von CDKN1B nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen.** (A) Repräsentative Western Blots (die Zahlen stehen für die technischen Replikate, die roten Zahlen stehen für die mit Sorafenib behandelten Proben); (B, C) Die Streudiagramme (Scatter plots) stellen die relative Expression der analysierten Proteine und ihrer Modifikationen in Bezug auf das house-keeping Gen (TUBB3) dar; (D) Das Streudiagramm stellt die relative Expression des analysierten Proteins in Bezug auf das house-keeping Gen (TUBB3) dar; n=4, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin. Die Quantifizierung der Proteinmengen auf den entwickelten Western Blot Filmen erfolgte mit der ImageJ Software.

Wiederum war die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors infolge der Sorafenib-Behandlung nicht betroffen, wenn die Zellen mit EL08-1D2 kokultiviert wurden. In den monokultivierten mit Sorafenib behandelten primären AML-Zellen war die Phosphorylierung von AKT1, ein Substrat der FLT3-Kinase, nahezu undetektierbar (Abbildung 11 A, C). In kokultivierten mit Sorafenib behandelten primären AML-Zellen hingegen erschien die Phosphorylierung von AKT1 unbeeinträchtigt.

Ich stellte wie auch bei den MV4-11 Zellen eine signifikante Steigerung von CDKN1B nach der Sorafenib-Behandlung monokultivierter primärer AML-Zellen fest (Abbildung 11 A, D). Bei ihrer Kokultur und Behandlung mit Sorafenib erschien die Expression von CDKN1B hingegen nicht unverändert zur DMSO-Kontrolle wie bei den MV4-11 Zellen, sondern signifikant erniedrigt. Diese Ergebnisse legen einen modifizierten Zellzyklus nahe, da CDKN1B ein bekannter Inhibitor des G1/S-Phasen-Übergangs des Zellzyklus ist.

### 3.2.6 Auswirkung des modifizierten FLT3-ITD-Signalweges auf den Zellzyklus und das Zellüberleben in humanen primären AML-Zellen

Zunächst analysierte ich durch AnnexinV-Färbung die Viabilität der mit Sorafenib behandelten primären AML-Zellen in Mono- oder Kokultur (Methoden, Seite 33). Die Sorafenib-Behandlung führte in den monokultivierten AML-Zellen zu einer verminderten Prozentanzahl lebender, AnnexinV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> Zellen und zu einer gesteigerten Prozentanzahl nekrotischer, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 12 B, C).



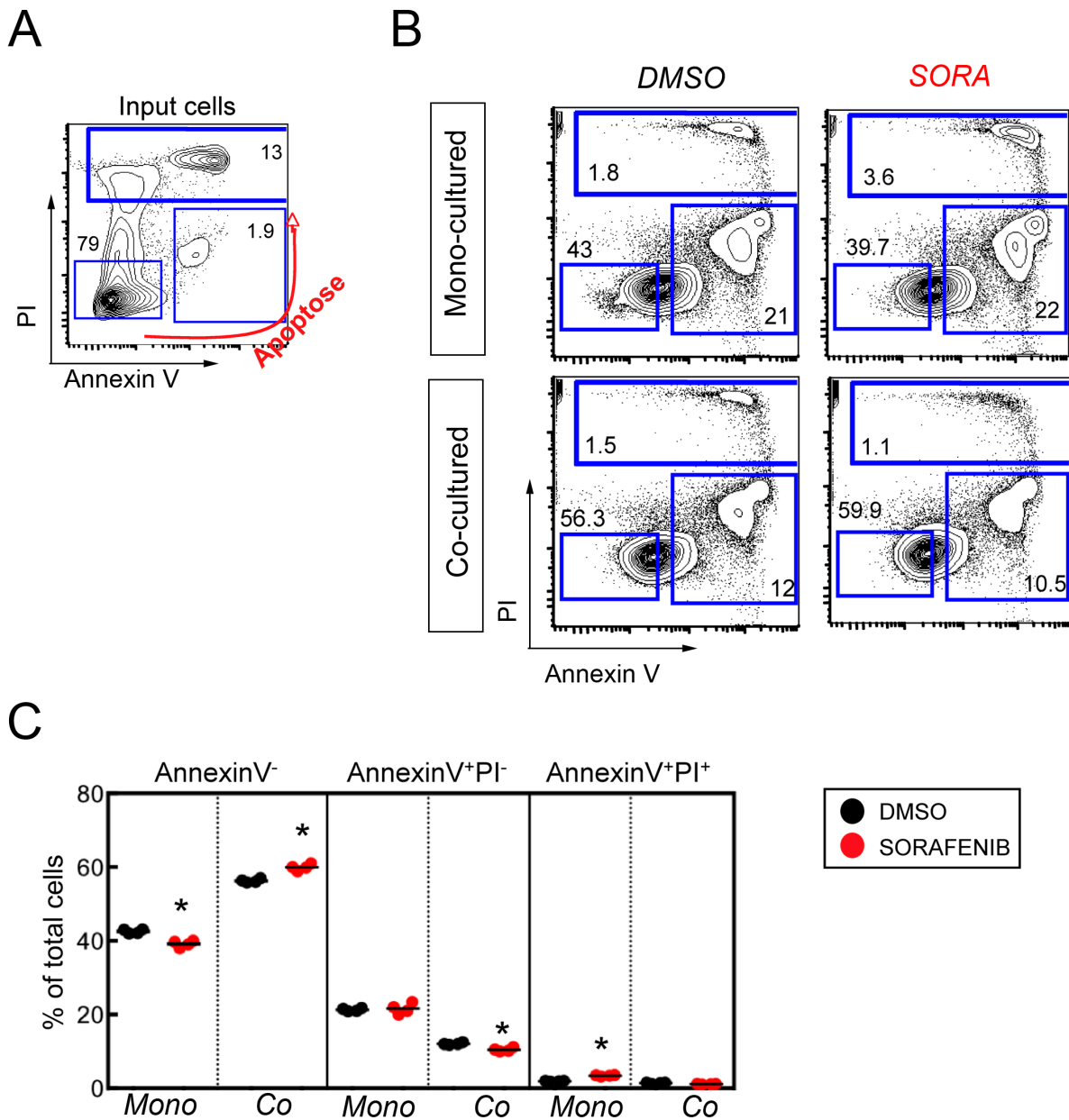


Abbildung 12. Viabilität der AML-Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer AnnexinV-Färbung;  
 (A) Repräsentatives FACS Diagramm der Input-Zellen. Lebende Zellen sind AnnexinV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>, apoptotische Zellen sind AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, nekrotische Zellen sind AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>; (B) Repräsentative FACS Diagramme von behandelten AML-Zellen in Mono- und Kokulturen; (C) Das Streudiagramm zeigt den Prozentanteil an AnnexinV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen der behandelten AML-Zellen in Mono- und Kokulturen an; n=4, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin.

Der Prozentanteil der apoptotischen, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> Zellen war nach Sorafenib-Behandlung vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle. In den kokultivierten AML-Zellen war der Prozentanteil der lebenden, AnnexinV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> Zellen nach Sorafenib-Behandlung signifikant gesteigert, der Anteil apoptotischer, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> Zellen signifikant erniedrigt. Der Prozentanteil nekrotischer, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen war nach Sorafenib-Behandlung vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit der in vorherigen Publikationen beschriebenen protektiven Funktion der Stromazellen (Parmar, Marz et al. 2011).

Im nächsten Versuch analysierte ich die Proliferation der primären AML-Zellen. Diese fixierte und permeabilisierte ich und färbte sie mit einem gegen das Protein Ki-67 gerichteten Antikörper, sowie mit PI (Methoden, Seite 32).

In der Monokultur befanden sich die mit Sorafenib behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vermehrt in der G1-Phase und vermindert in der S-Phase des Zellzyklus, die G0-Phase erschien unverändert (Abbildung 13 B, C ).

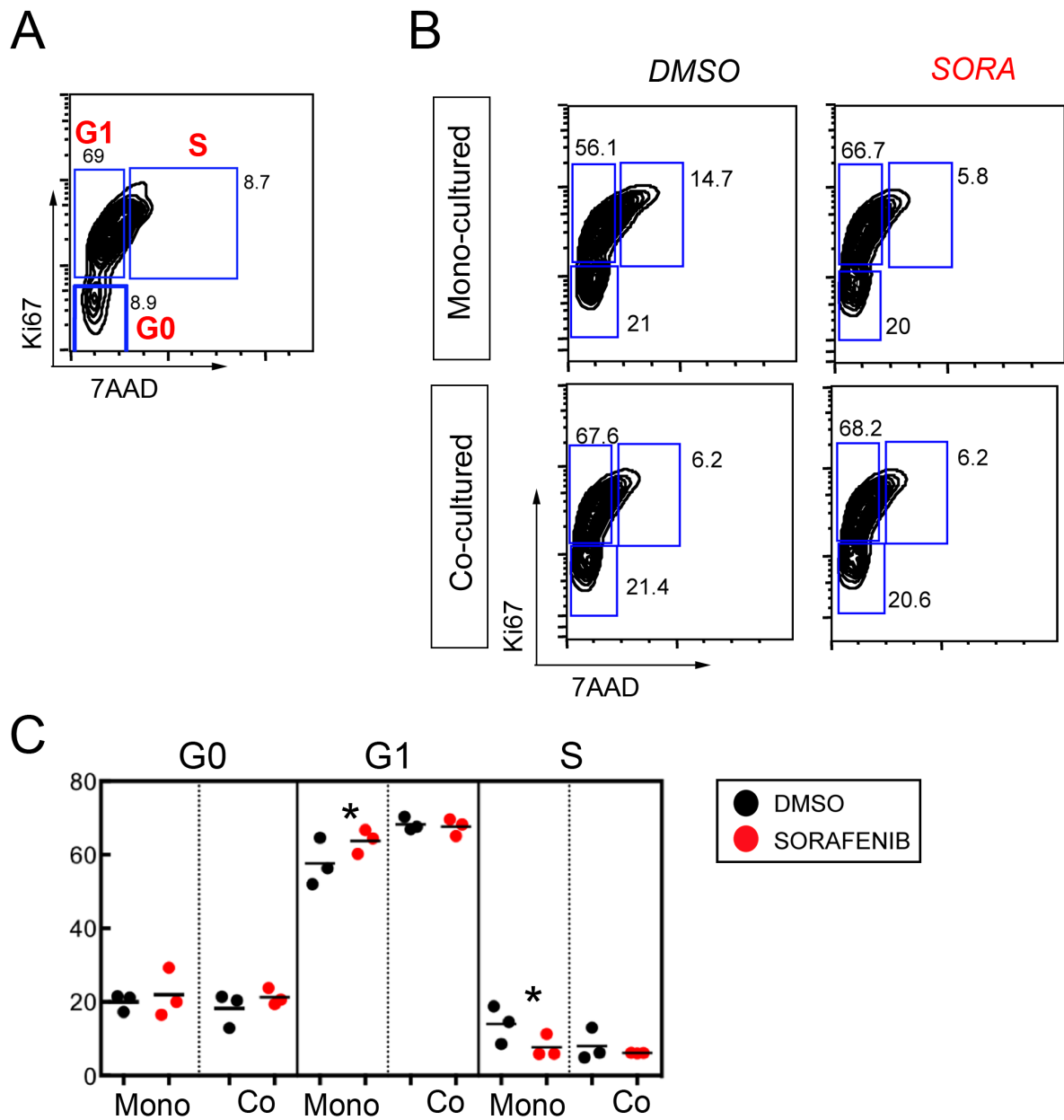


Abbildung 13. Proliferation der AML-Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung.

(A) Repräsentatives FACS Diagramm der Input-Zellen. G0-Zellen sind negativ für Ki-67 und PI, G1-Zellen sind Ki-67 positiv, S-Phasen-Zellen sind positiv für Ki-67 und PI; (B) Repräsentative FACS Diagramme von behandelten AML-Zellen in Mono- und Kokulturen; (C) Das Streudiagramm zeigt den Prozentanteil an sich in der G0-, G1- oder S-Phase befindenden AML-Zellen an, die in Mono- und Kokulturen behandelt wurden; n=3, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin.

In der Kokultur erschien die Verteilung der AML-Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus durch Sorafenib unbeeinträchtigt (Abbildung 13 B, C). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auf Stroma kokultivierte AML-Zellen die Behandlung mit Sorafenib kompensieren können, sodass die AML-Zellen ungestört proliferieren können.

### 3.2.7 Auswirkung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib auf kokultivierte humane primäre AML-Zellen

Um den durch die Kokultivierung der AML-Zellen auf Stromazellen bedingten protektiven Effekt zu umgehen, zielte ich in dem nächsten Versuch eine Stabilisierung des Abbaus von Proteinen ab, welche den Zellzyklus und somit das Zellwachstum regulieren. Hierfür setzte ich den Proteasom-Inhibitor Bortezomib ein, welcher schon erfolgreich beim Melanom und beim metastasierten Mammakarzinom in der Klinik eingesetzt wurde (Adelson et al. 2016; Sun et al. 2017).

Ich untersuchte die Apoptose und den Zellzyklus in primären AML-Zellen während ihrer Mono- und Kokultur und Behandlung mit Sorafenib über 30 Minuten, 2 Stunden oder 24 Stunden (Abbildung 14 A).

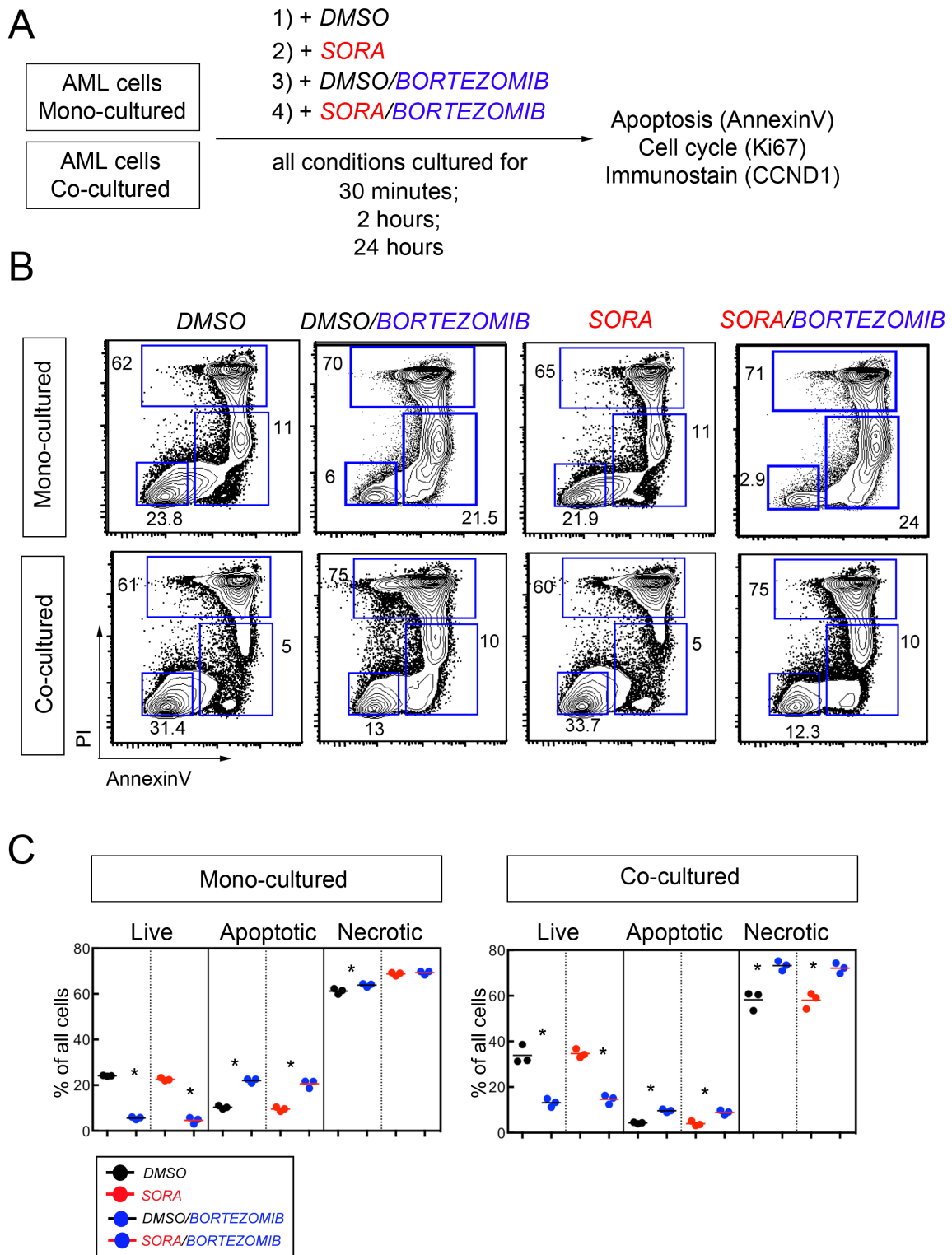


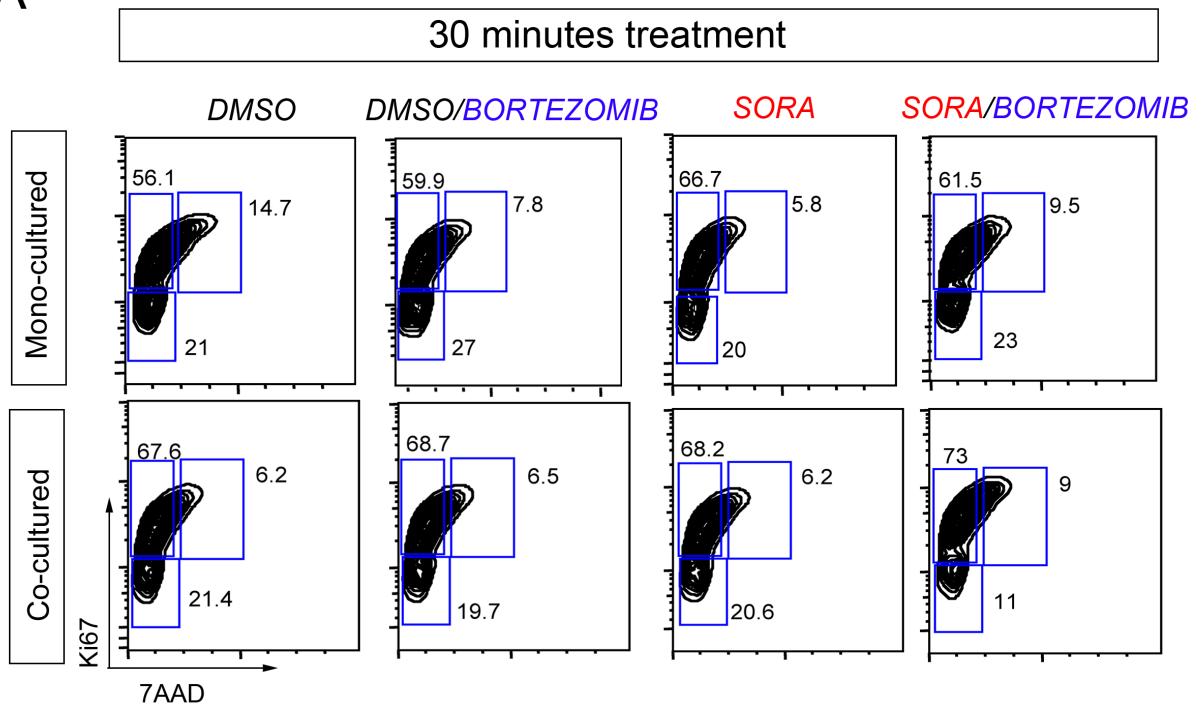
Abbildung 14. Auswirkung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib auf kokultivierte humane primäre AML-Zellen.

(A) Versuchsaufbau; (B) Repräsentative FACS Diagramme; (C) Das Streudiagramm zeigt den Prozentanteil an AnnexinV-, AnnexinV+PI-, AnnexinV+PI+ Zellen der behandelten AML-Zellen in Mono- und Kokulturen an. Blaue Punkte zeigen die kombinierte Behandlung mit Sorafenib und Bortezomib an. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe. n=3, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin.

Tatsächlich konnte ich bereits nach 30-minütiger kombinierter Behandlung der AML-Zellen mit Sorafenib und Bortezomib (10 nM) sowohl bei ihrer Monokultur, als auch bei ihrer Kokultur einen deutlich verminderten Prozentanteil der lebenden, AnnexinV-PI<sup>-</sup> Zellen, sowie einen signifikant erhöhten Prozentanteil der apoptotischen, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> Zellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Sorafenib feststellen (Abbildung 14 B, C). Bei Kokultur der AML-Zellen beobachtete ich zusätzlich einen signifikant erhöhten Prozentanteil der nekrotischen, AnnexinV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen.

Die Verteilung der AML-Zellen in G0-, G1- und S-Phase war bei 30-minütiger kombinierter Behandlung der monokultivierten AML-Zellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Sorafenib unverändert (Abbildung 15 A, B).

A



B

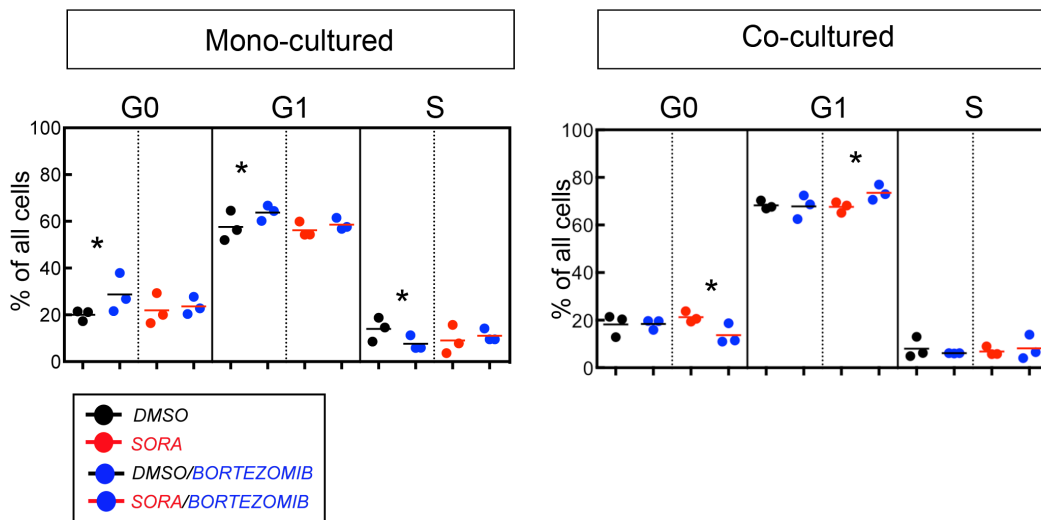


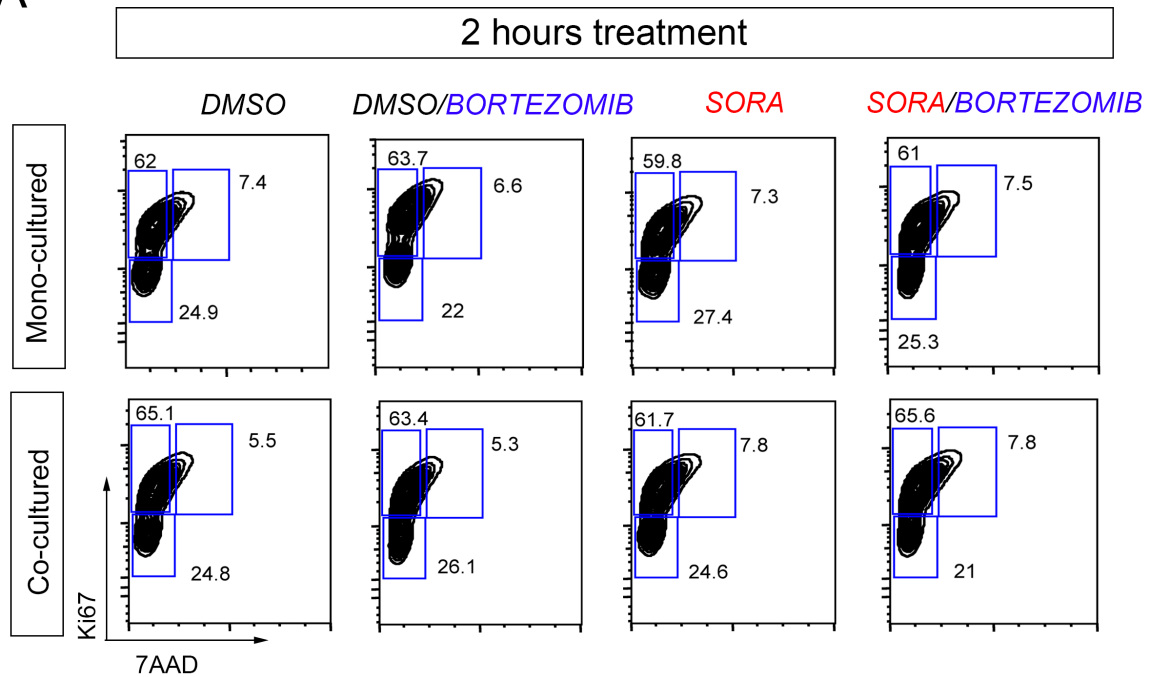
Abbildung 15. Proliferation der AML-Zellen nach 30-minütiger Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung;

(A) Repräsentative FACS Diagramme von behandelten AML-Zellen in Mono- und Kokulturen; (B) Die Streudiagramme zeigen den Prozentanteil an sich in der G0-, G1- oder S-Phase befindenden AML-Zellen an, die in Mono- und Kokulturen behandelt wurden. Blaue Punkte zeigen die kombinierte Behandlung mit Sorafenib und Bortezomib an. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe. n=3, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin.

Hingegen stellte ich bei Kokultur und kombinierter Behandlung der AML-Zellen einen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Sorafenib vermehrten Prozentanteil an Zellen in der G1-Phase, bei einem verminderten Prozentanteil an Zellen in der G0-Phase und einem unverändertem Prozentanteil an Zellen in der S-Phase fest. Die prozentuelle Verteilung der AML-Zellen in G0-, G1- und S-Phase war bei 2-stündiger kombinierter Behandlung sowohl der mono- als auch der kokultivierten AML-Zellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Sorafenib unverändert (Abbildung 16 A, B).



A



B

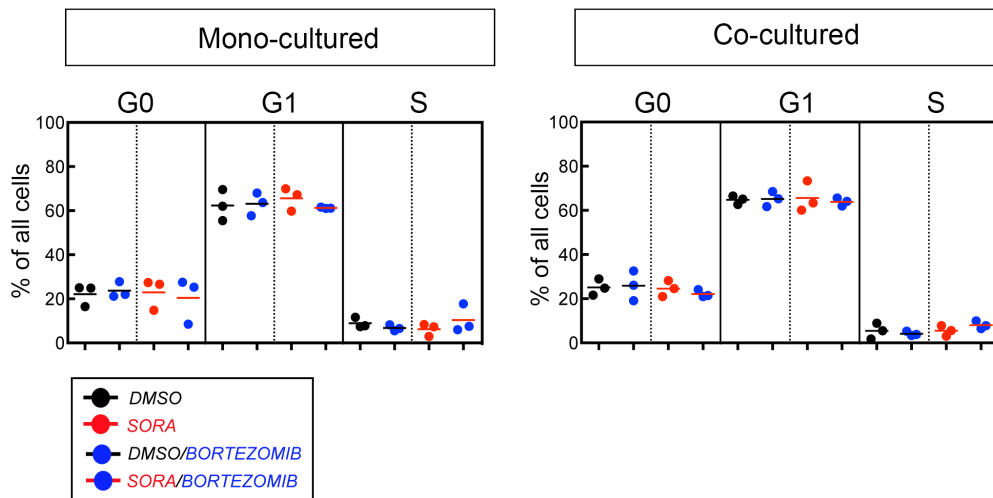


Abbildung 16. Proliferation der AML-Zellen nach 2-stündiger Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung; (A) Repräsentative FACS Diagramme von behandelten AML-Zellen in Mono- und Kokulturen; (B) Die Streudiagramme zeigen den Prozentanteil an sich in der G0-, G1- oder S-Phase befindenden AML-Zellen an, die in Mono- und Kokulturen behandelt wurden. Blaue Punkte zeigen die kombinierte Behandlung mit Sorafenib und Bortezomib an. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe. n=3, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin.

Bei 24-stündiger Behandlung der AML-Zellen mit Sorafenib und Bortezomib befanden sich die monokultivierten Zellen im Vergleich zu denen, die allein mit Sorafenib behandelt wurden, vermindert in der S-Phase, jedoch war der Prozentanteil der Zellen in der G0- und G1-Phase unverändert (Abbildung 17 A, B).

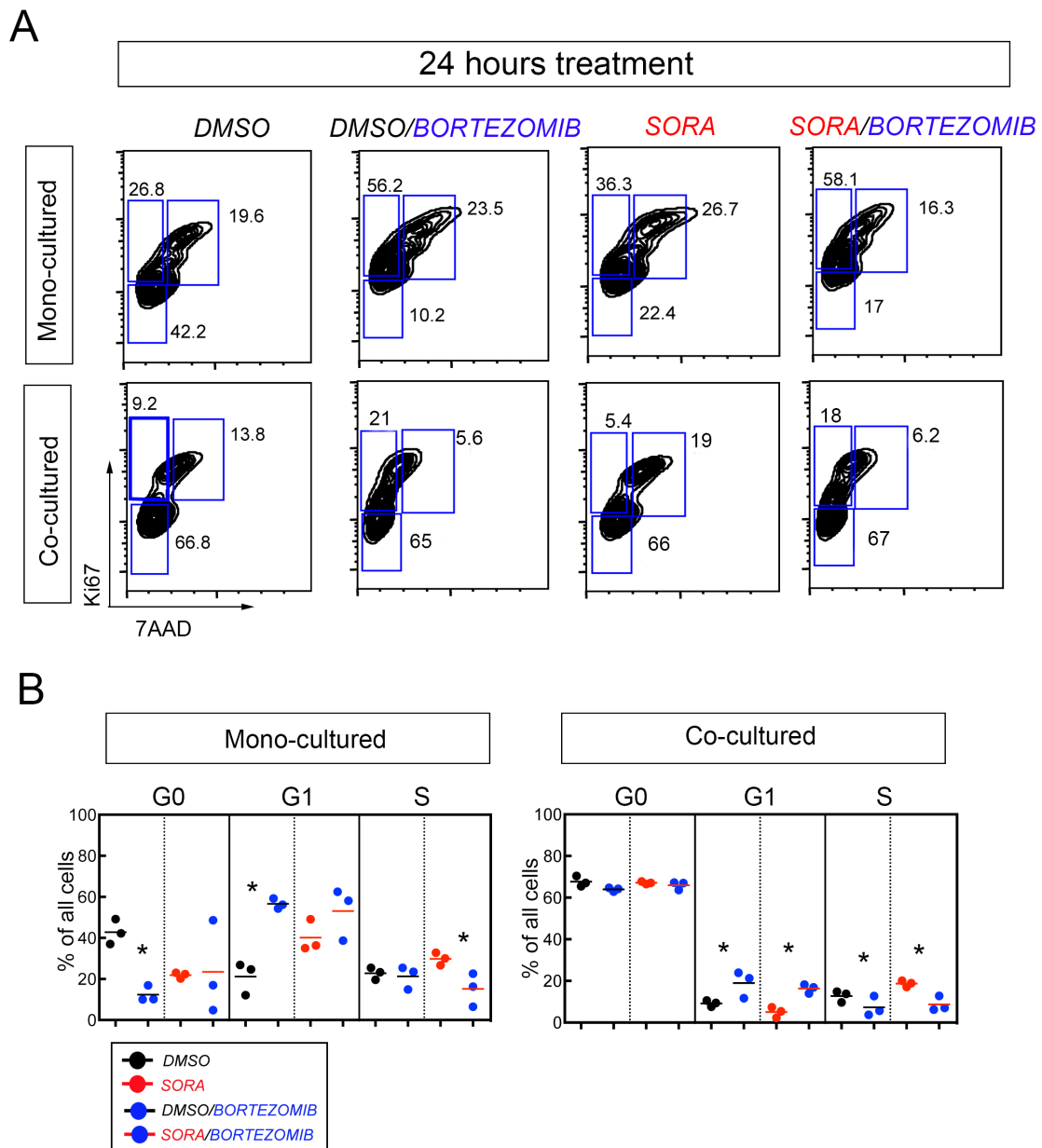


Abbildung 17. Proliferation der AML-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung; (A) Repräsentative FACS Diagramme von behandelten AML-Zellen in Mono- und Kokulturen; (B) Die Streudiagramme zeigen den Prozentanteil an sich in der G0-, G1- oder S-Phase befindenden AML-Zellen an, die in Mono- und Kokulturen behandelt wurden. Blaue Punkte zeigen die kombinierte Behandlung mit Sorafenib und Bortezomib an. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe. n=3, \* deutet auf einen p-Wert < 0.05 hin.

Die kokultivierten AML-Zellen die kombiniert mit Sorafenib und Bortezomib behandelt wurden verteilten sich im Vergleich zu denen, die nur mit Sorafenib behandelt wurden vermehrt in die G1-Phase und vermindert in die S-Phase, bei unverändertem Prozentanteil an Zellen in der G0-Phase.

Ich identifizierte nach 30-minütiger Sorafenib- und Bortezomib-Behandlung der monokultivierten AML-Zellen eine im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Sorafenib vermehrte Expression von CCND1 (Abbildung 18 A, B).

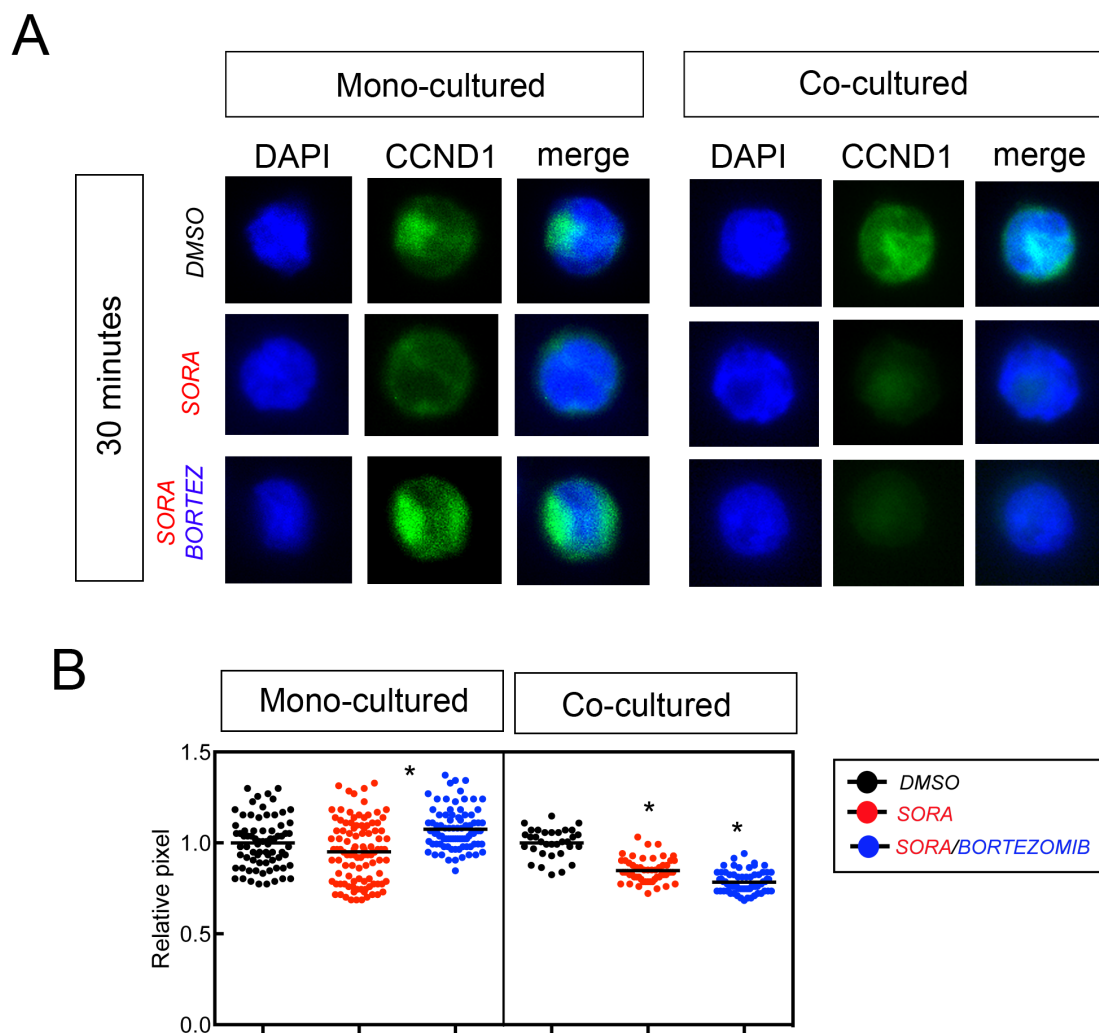


Abbildung 18. Expression von CCND1 in AML-Zellen nach ihrer 30-minütigen Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen.

(A) Repräsentative Aufnahmen einzelner Zellen, gefärbt mit dem jeweiligen Antikörper (Grünes Signal entspricht der Expression von CCND1; alle Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt - blaues Signal); (B) Die Streudiagramme zeigen die relative Pixelintensität in Bezug zum Mittelwert der DMSO-Kontrolle an. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.

Bei Kokultivierung der Zellen hingegen war die CCND1-Expression bei kombinierter Behandlung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Sorafenib noch weiter vermindert.

Bei einer Behandlungszeit von 2 Stunden hingegen erschien die CCND1-Expression sowohl bei Mono-, als auch bei Kokultur der AML-Zellen, gleichermaßen durch die alleinige und durch die mit Bortezomib kombinierte Behandlung unbeeinträchtigt (Abbildung 19 A, B).

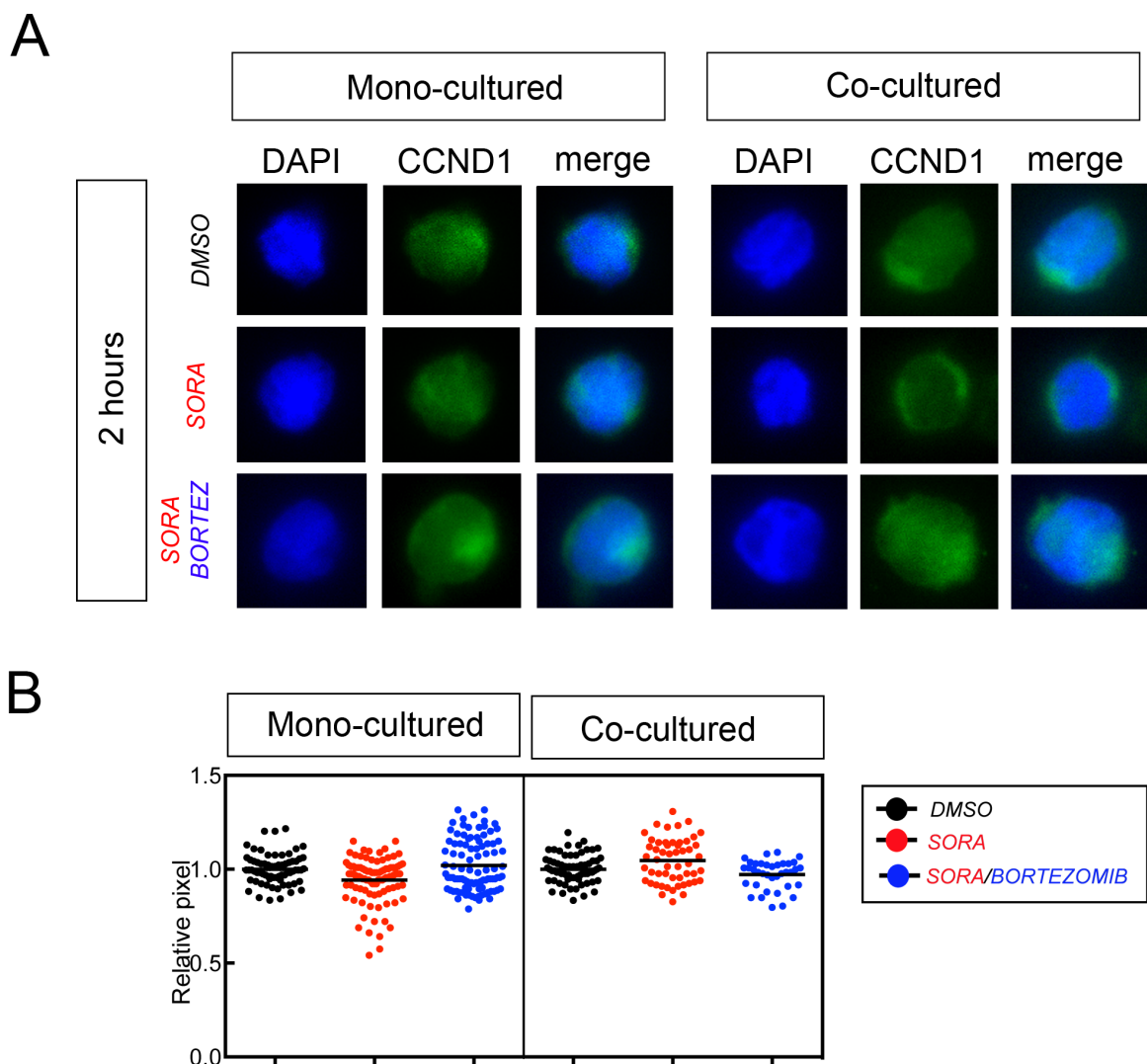


Abbildung 19. Expression von CCND1 in AML-Zellen nach ihrer 2-stündigen Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen.

(A) Repräsentative Aufnahmen einzelner Zellen, gefärbt mit dem jeweiligen Antikörper (Grünes Signal entspricht der Expression von CCND1; alle Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt - blaues Signal); (B) Die Streudiagramme zeigen die relative Pixelintensität in Bezug zum Mittelwert der DMSO-Kontrolle an. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.

Bei Verlängerung der Behandlungszeit auf 24 Stunden bewirkte die kombinierte Sorafenib- und Bortezomib-Behandlung bei den monokultivierten AML-Zellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Sorafenib eine verminderte CCND1-Expression (Abbildung 20 A, B).

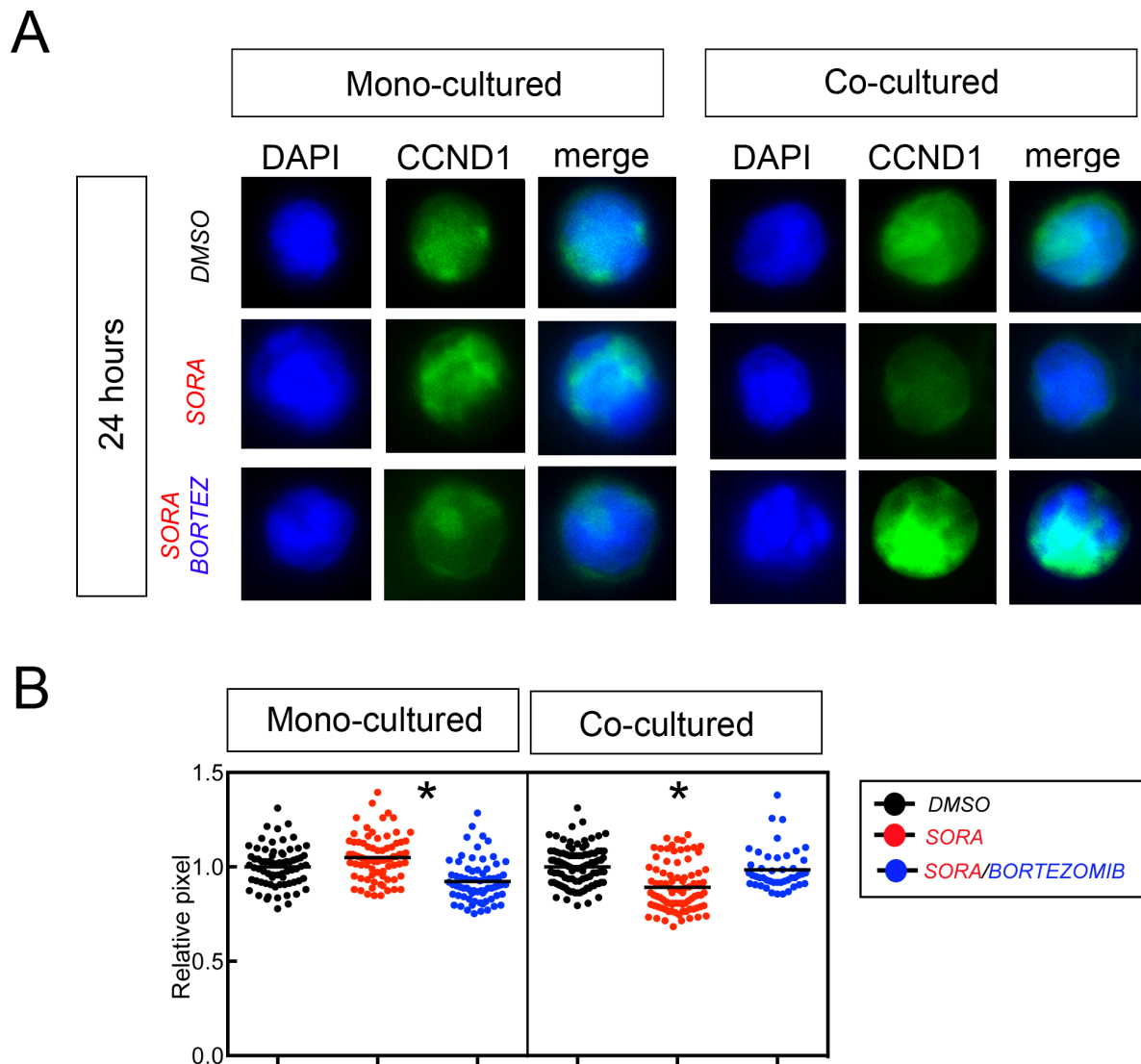


Abbildung 20. Expression von CCND1 in AML-Zellen nach ihrer 24-stündigen Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen.

(A) Repräsentative Aufnahmen einzelner Zellen, gefärbt mit dem jeweiligen Antikörper (Grünes Signal entspricht der Expression von CCND1; alle Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt - blaues Signal); (B) Die Streudiagramme zeigen die relative Pixelintensität in Bezug zum Mittelwert der DMSO-Kontrolle an. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.

Bei Kokultur der AML-Zellen hingegen führte die alleinige Sorafenib-Behandlung zu verringerter CCND1-Expression, bei kombinierter Behandlung war diese unverändert (Abbildung 20 A, B).

Im nächsten Schritt verglich ich, bezogen auf die als schwarze Linie angezeigte DMSO-Kontrolle, die in Form von relativen Zahlen dargestellte Kinetik von CCND1 und dem Prozentanteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Abbildung 21).

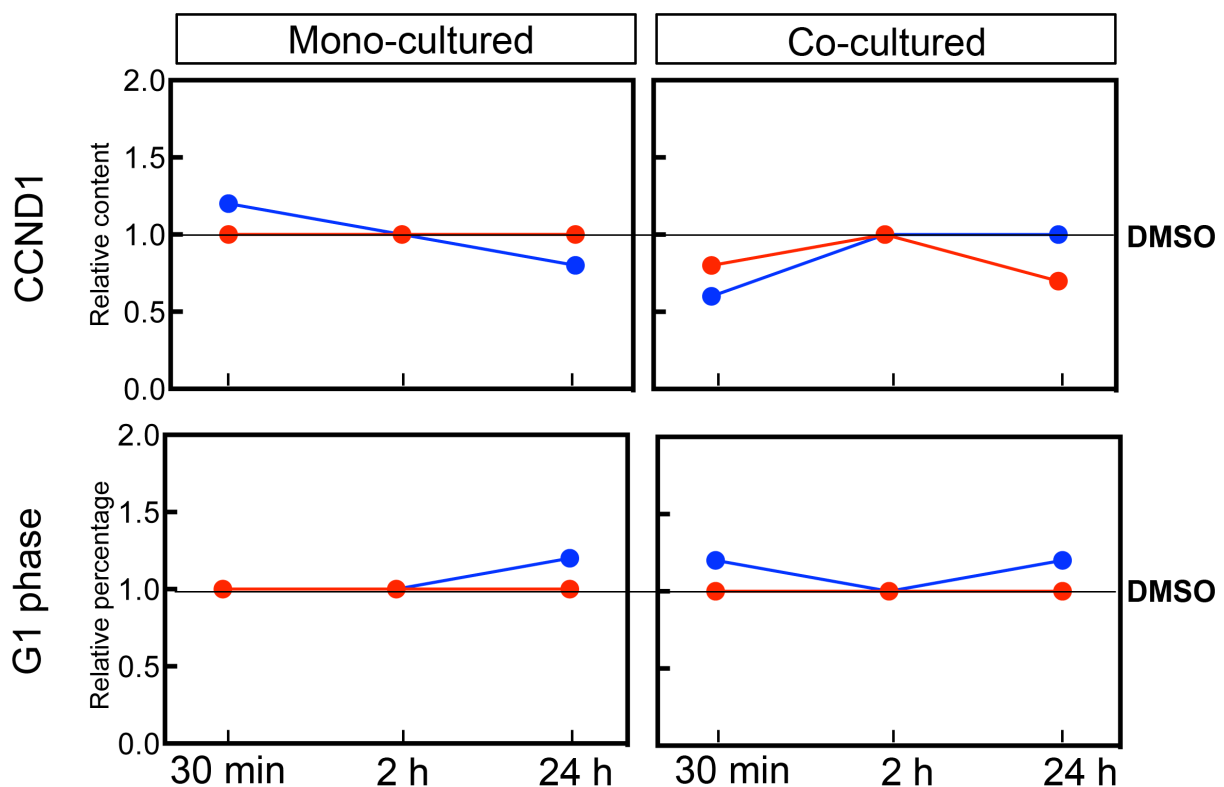


Abbildung 21. Kinetik des CCND1 Proteins und der G1-Phase des Zellzyklus.

Die schwarze Linie stellt die DMSO-Kontrolle dar (für den CCND1-Proteingehalt, für den Prozentanteil der Zellen in der G1-Phase). Die roten Punkte und Linien zeigen den relativen Gehalt/Prozentanteil der mit Sorafenib behandelten Zellen. Die blauen Punkte und Linien zeigen den relativen Gehalt/Prozentanteil der mit Sorafenib und Bortezomib behandelten Zellen.

Zusammenfassend blieben in der Monokultur zu allen drei Zeitpunkten sowohl der CCND1-Gehalt, als auch der Prozentanteil der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus von der DMSO-Behandlung unbeeinflusst. Die kombinierte 30-minütige Behandlung mit Bortezomib und Sorafenib in der Monokultur führte zu einem gesteigerten Gehalt an CCND1. Dennoch stellte ich im Vergleich zu den allein mit DMSO behandelten Proben keinerlei Veränderungen im Zellzyklus fest. Dies ist womöglich durch eine gesteigerte Apoptose erklärbar und sollte in weiteren Experimenten analysiert werden. Nach 2-stündiger kombinierter Behandlung waren CCND1-Gehalt und Prozentanteil der Zellen in G1-Phase im Vergleich zu den allein mit DMSO behandelten Zellen unverändert. Erstaunlicherweise beobachtete ich nach 24-stündiger kombinierter Behandlung bei einem verminderten CCND1-Gehalt einen gesteigerten Prozentanteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Womöglich wurde dieser Effekt durch andere Regulatoren des Zellzyklus gesteuert. Allerdings wäre auch unter diesen Versuchsbedingungen die Analyse der Zellviabilität durch AnnexinV-Färbung unerlässlich.

In den Kokulturen war der CCND1-Gehalt nach 30-minütiger Behandlung mit Sorafenib vermindert, die kombinierte Behandlung mit Bortezomib und Sorafenib verstärkte diesen Effekt noch weiterhin. Interessanterweise war der Prozentanteil der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bei kombinierter Behandlung mit Bortezomib und Sorafenib erhöht und in den Zellen, die allein mit Sorafenib behandelt wurden, unverändert. Nach 2-stündiger Inkubation waren CCND1-Gehalt und Prozentanteil der Zellen in G1-Phase unter beiden Konditionen im Vergleich zu den allein mit DMSO behandelten Zellen unverändert. Allerdings war 24 Stunden später der CCND1-Gehalt in den mit Sorafenib behandelten Zellen bei unverändertem Zellzyklus verringert. Im Gegensatz hierzu führte die kombinierte Behandlung mit Sorafenib und Bortezomib zu unverändertem CCND1-Gehalt und zu einem erhöhten Prozentanteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus.

Die Kombination dieser Ergebnisse mit denen der AnnexinV-Färbung nach 30-minütiger Behandlung (Abbildung 14 C, Seite 57) legt nahe, dass sowohl die mono-, als auch die kokultivierten Zellen durch die Hinzugabe von Bortezomib verstärkt auf die Sorafenib-Behandlung ansprechen. Dies spiegelt sich in dem signifikant gesteigerten Prozentanteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen bei kombinierter

Therapie wieder. Eine synergistische Wirkung von Bortezomib und Sorafenib konnte schon zuvor in in-vitro Studien mit AML-Zelllinien beobachtet werden (Liesveld et al. 2011).

Zusätzlich hierzu konnte ich nachweisen, dass durch die Addition von Bortezomib der durch die Kokultivierung der AML-Zellen auf Stromazellen bedingte protektive Effekt gegenüber der Sorafenib-Behandlung eventuell umgangen werden kann. Die kombinierte Therapie mit Sorafenib und Bortezomib erwies sich in einer Phase 1 Studie in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren als vielversprechend (Kumar et al. 2013). Womöglich könnte die Kombination dieser Agenzien auch für die Behandlung von AML-Subtypen mit besonders schlechter Prognose, wie zum Beispiel der FLT3-ITD<sup>+</sup> Leukämie, aussichtsreich sein.



## 4. DISKUSSION

### 4.1 SGTA, mögliches neues Target zur Eradikation der FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs

#### 4.1.1 SGTA, das bisher unbekannte Signalmolekül der FLT3-ITD-Signalkaskade

SGTA zeigte sich in dem Proteinscreening der FLT3-ITD tragenden MV4-11 Zellen als eines der Proteine mit einer spezifischen Phosphorylierungsstelle, dessen Phosphorylierungsstatus über den FLT3-Rezeptor gesteuert wird (Ergebnisse, Tabelle 6, Seite 37). Es ist ein bisher in diesem Zusammenhang unbekanntes Target, welches bei Kokultur mit Stromazellen trotz Hemmung des FLT3-Signalweges durch Sorafenib phosphoryliert wird. SGTA könnte somit ein interessantes neues Target bei der Behandlung der FLT3-ITD<sup>+</sup> Leukämie sein und zur effektiven Eradikation der FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs beitragen.

#### 4.1.2 SGTA, ein möglicher Mitspieler im Schutzmechanismus der leukämischen Zellen durch deren Kokultur mit Nischenzellen

Sowohl in der MV4-11 Zelllinie, als auch in primären AML-Zellen, konnte ich die Beeinflussung des FLT3-Signalweges durch die Sorafenib-Behandlung bestätigen. In beiden Fällen führte die Inhibition der Signalkaskade zu einer vermehrten CDKN1B-Expression und folglich zur Hemmung der Zellprogression in die S-Phase. In der Kokultur mit den Nischenzellen EL08-1D2 konnten diese Effekte jeweils revidiert werden. Bereits in Non-Hodgkin-Lymphom Zelllinien konnte festgestellt werden, dass die SGTA-Expression diejenige von CDKN1B beeinflusst und somit auch die Zellproliferation moduliert (Wang, Huang et al. 2014). In humanen Brustkarzinomzellen ging eine gesteigerte Expression von SGTA mit einer gesteigerten Expression von Ki-67 und somit mit einer schlechteren Prognose einher (Zhu, Ji et al. 2014). In einer NSCLC Zelllinie war die Imatinib-Behandlung deutlich wirksamer nach SGTA-Knockdown durch siRNA (Moritz, Li et al. 2010). Möglicherweise spielt das Protein SGTA, dessen Serinrest 305 bei Kokultur der mit Sorafenib behandelten leukämischen Zellen in meiner Arbeit signifikant mehr phosphoryliert war, eine Rolle beim Schutzmechanismus durch die Stromazellen.

#### 4.1.3 SGTA, ein Downstream Signalmolekül der FLT3-ITD-Signalkaskade

AKT wurde erst kürzlich als mögliche Kinase von SGTA beschrieben (Moritz, Li et al. 2010). Auch meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass SGTA ein Downstream Signalmolekül der FLT3-ITD-Signalkaskade sein könnte, denn in den kokultivierten mit Sorafenib behandelten MV4-11-, bzw. primären AML-Zellen, konnte ich parallel zur hochregulierten Phosphorylierung des Serinrests 305 von SGTA eine steigende, bzw. wieder hergestellte Phosphorylierung des Serinrests 473 von AKT feststellen. Bereits mehrere andere Studien beschrieben den möglichen Zusammenhang der Moleküle PI3K, AKT und SGTA. Der SGTA-Knockdown in der C4-2B Prostatakarzinomzelllinie führte zu einer verminderten PI3K-Expression, sowie zu einer verminderten Phosphorylierung von AKT (Trotta, Need et al. 2013). Andersherum führte die Inhibition von PI3K in humanen Brustkarzinomzelllinien zu einer verminderten SGTA-Expression und Phosphorylierung von AKT (Zhu, Ji et al. 2014). In beiden Fällen führte die verminderte SGTA-Expression zu einer verminderten Proliferation der Karzinomzellen. SGTA könnte sich somit im oberen Bereich des FLT3-ITD-Signalweges, auf gleicher Höhe wie PI3K und AKT befinden (Abbildung 22).

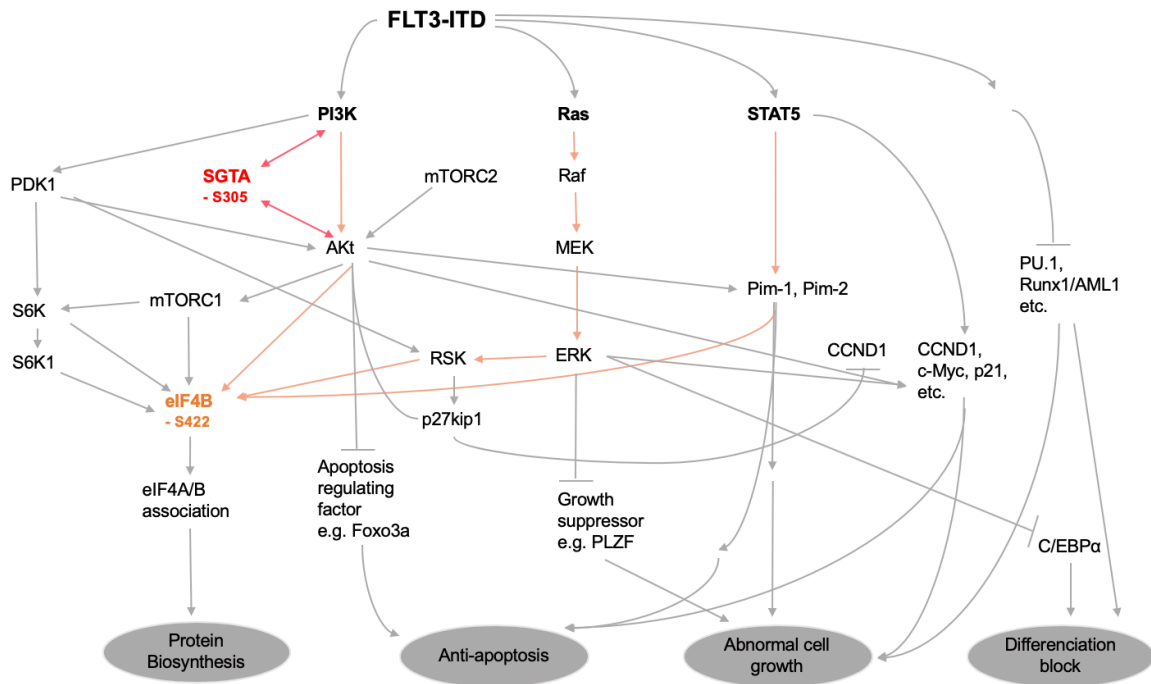


Abbildung 22. FLT3-ITD-Signalkaskade mit möglichem neuem Downstream Signalmolekül SGTA (in rot), sowie bekanntem Downstream Signalmolekül eIF4B und die Kontrolle der Phosphorylierung dessen Serinrests 422 über die drei Hauptsignalwege PI3K/MAPK/STAT5 (in orange)

#### 4.1.4 Stabilisiert SGTA als Cochaperon in seiner phosphorylierten Form den FLT3-ITD-Rezeptor, sodass die Sorafenib-Wirkung bei Kokultur auf Stromazellen umgangen werden kann?

Es ist bekannt, dass innerhalb der Mikroumgebung von Tumorzellen zahlreiche zytotoxische Stressoren vorhanden sind (Whitesell and Lindquist 2005). Um sich vor diesen zu schützen kommt es durch die Tumorzellen zu einer Hochregulation verschiedener Chaperone, welche ihnen ermöglichen in einer prinzipiell schädlichen, nicht unterstützenden Umgebung zu proliferieren, zu metastasieren und sich gegenüber verschiedenen Therapien resistent zu zeigen (Cardillo and Ippoliti 2006). Chaperone arbeiten gemeinsam mit Cochaperonen, wobei insbesondere TPR-enhaltende Cochaperone als Adaptermoleküle für z.B. das Chaperon Hsp90 bei Steroidrezeptoren und Serin-/Threoninkinasen wirken (Smith and Toft 2008). Es wurde bereits in vorherigen Studien nachgewiesen, dass das TPR-enhaltende Cochaperon SGTA mit den Chaperonen HSP90, HSP70 und HSC70 interagiert (Liu, Wu et al. 1999; Tobaben et al. 2001; Angeletti et al. 2002; Liou and Wang 2005). Weiterhin wurde

SGTA im Zusammenhang mit Androgen-, Progesteron-, Glucocorticoid- und Wachstumshormonrezeptoren als ein Cochaperon beschrieben, welches einen Einfluss auf die Rezeptoraktivität und den Rezeptortransport hat (Paul, Garcia et al. 2014).

Der FLT3-Rezeptor tritt in zwei verschiedenen Formen auf, nämlich in einer intrazellulären, teilweise glykosylierten, unreifen 130-kDa Form, sowie in einer reifen komplex glykosylierten 160-kDa Form, welche an der Zelloberfläche präsent ist (Stirewalt and Radich 2003). Der erste Schritt der Glykosylierung erfolgt bekanntlich im endoplasmatischen Retikulum (ER), der zweite im Golgi-Apparat. Womöglich unterstützt SGTA in seiner phosphorylierten Form die Reifung des FLT3-ITD-Rezeptors und anschliessend den Transport an die Zelloberfläche, so wie es vermutlich bei der tail-anchored Protein Biogenese bei der Membranintegration in das ER unterstützend wirkt (Winnefeld et al. 2006) (Leznicki et al. 2010). Möglicherweise führt SGTA über die Phosphorylierung des Serinrests 305 zu einer Stabilisierung des reifen FLT3-ITD-Rezeptors, wodurch die Signalkaskade trotz Sorafenib-Behandlung aufrechterhalten werden kann.

#### 4.1.5 SGTA beeinflusst womöglich durch seinen Phosphorylierungsstatus die Reifung des FLT3-ITD-Rezeptors und folglich den Phosphorylierungsstatus dessen Downstream Moleküls eIF4B

Interessanterweise verhielt sich in meiner Arbeit die Phosphorylierung von S422-eIF4B in den MV4-11 Zellen gegensätzlich zu derjenigen von S305-SGTA (Ergebnisse, Abbildung 3 A, B, C, Seite 38). Nach der Behandlung mit Sorafenib war sie in monokultivierten MV4-11 Zellen signifikant gesteigert, in kokultivierten Zellen jedoch unverändert zur DMSO-Kontrolle.

eIF4B spielt eine zentrale Rolle in der Initiation der eukaryotischen Translation. Über die Phosphorylierung dessen Serinrests 422 wird die Translation durch Steigerung dessen Affinität zu eIF3 stimuliert (Hay and Sonenberg 2004; Beglinger, Villa et al. 2017). S422-eIF4B ist ein gemeinsames Substrat der drei Signalwege JAK/STAT/PIM, PI3K/Akt/mTOR und MAPK, welche bekanntlich FLT3-ITD untergeordnet sind (Shahbazian, Roux et al. 2006; Yang, Wang et al. 2013; Chen, Yang et al. 2016).

Nur bei Vorhandensein der FLT3-ITD-Mutation kommt es zu einer vorzeitigen Aktivierung des unreifen, sich noch im Intrazellularraum bzw. im ER befindenden

Rezeptors und somit zur vorzeitigen Stimulation seiner Substrate. Er unterscheidet sich somit in seiner Aktivität von dem ausgereiften Rezeptor. Insbesondere scheint er zu einer vermehrten Aktivierung von STAT5, Pim-1 und deren Targets fähig zu sein (Choudhary et al. 2009). Sowohl in vitro, als auch in vivo führte im ER verankertes FLT3-ITD zur anhaltenden STAT5-Aktivierung und behielt die Fähigkeit zur malignen Transformation der Zellen (Schmidt-Arras et al. 2009).

FLT3-ITD besitzt demnach in leukämischen Zellen die Fähigkeit seine nachgeschalteten intrazellulären Substrate des STAT5-Signalweges von denjenigen des PI3K- und MAPK-Signalweges, welche von dem auf der Zelloberfläche exprimierten FLT3 aktiviert werden, zu entkoppeln (Choudhary, Olsen et al. 2009; Parmar, Marz et al. 2011) (Abbildung 23).

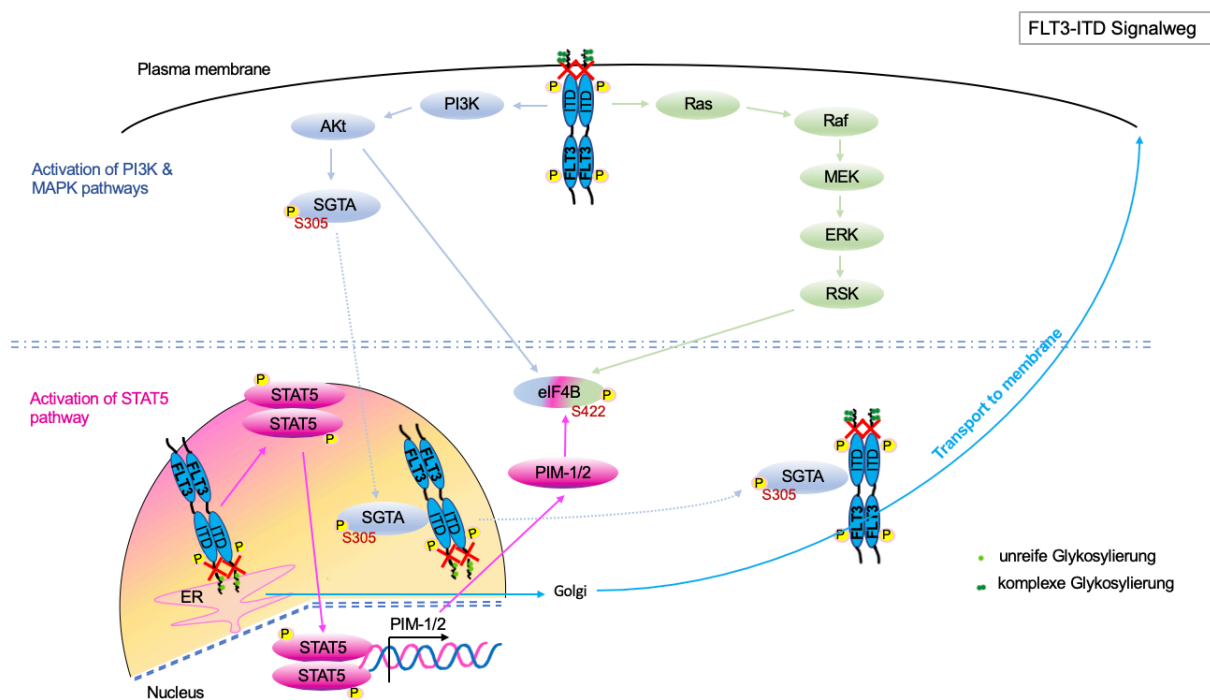


Abbildung 23. Die Phosphorylierung und Aktivierung von FLT3-ITD erfolgt ebenso wie die Aktivierung dessen nachgeschalteter Signalmoleküle Zellkompartiment spezifisch.

Das neue Signalmolekül SGTA ist Teil des „oberen“ Signalweges. Die Phosphorylierung des Serinrestes 422 des bekannten Downstream Signalmoleküls eIF4B wird über die drei Hauptsignalwege PI3K/MAPK/STAT5 kontrolliert.



herbeiführen, sodass der FLT3-ITD-Rezeptor seine Reifung vollenden könnte und folglich an seinen richtigen Zielort, die Zelloberfläche, transportiert werden würde. Somit könnte wie in meinen Ergebnissen zunächst die Phosphorylierung von S422-eIF4B bei Wegfall des aberranten STAT5-Signalweges im Vergleich zur Monokultur reduziert sein (Abbildung 25). Diese Hypothese wird durch einen bereits in vorherigen Studien nachgewiesenen biphasischen Verlauf der Phosphorylierung von S422-eIF4B unterstützt (Shahbazian, Roux et al. 2006). Möglicherweise würde somit bei Beobachtung über einen gewissen Zeitraum und nicht nur wie in meiner Arbeit zu dem Zeitpunkt 30 Minuten nach Sorafenib-Behandlung, die Phosphorylierung des Serinrests S422 des Proteins eIF4B erneut kompensatorisch über den PI3K- und MAPK-Signalweg ansteigen. Um diesen Ansatz zu beweisen, wäre es nötig sowohl den STAT5-, als auch den MAPK-Signalweg genauer zu untersuchen, sowie die Phosphorylierung von S422-eIF4B nach unterschiedlich langen Zeitintervallen zu bestimmen. Dies war zeitbedingt bei meiner Arbeit nicht mehr möglich.

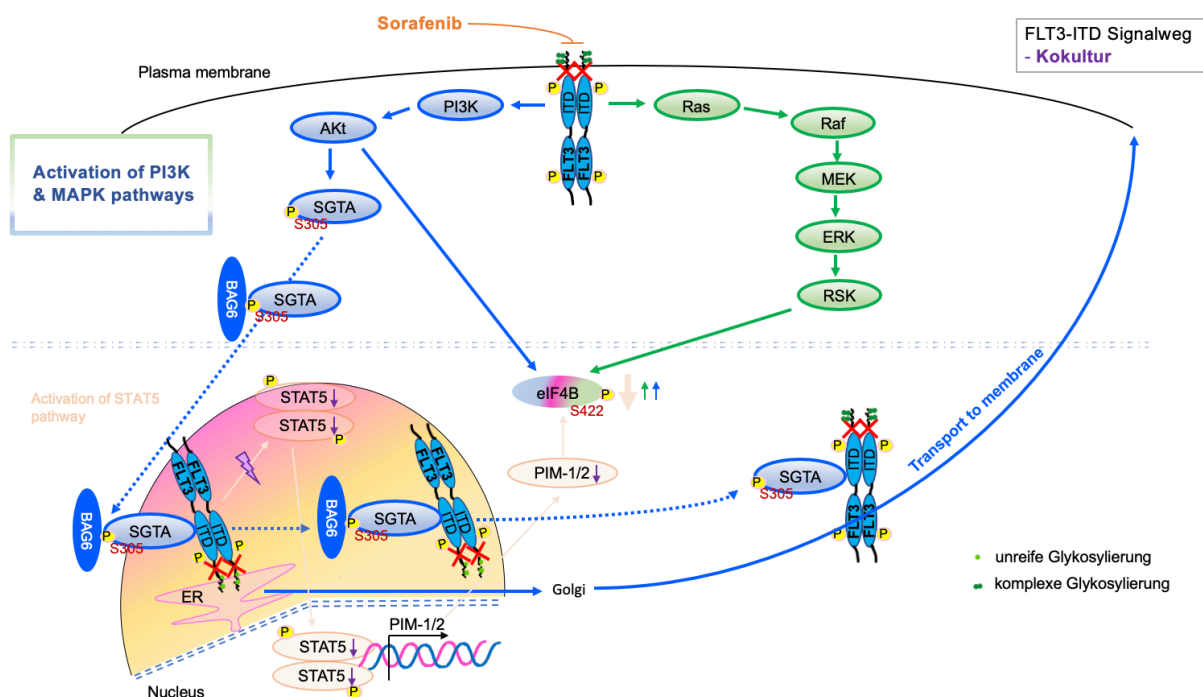


Abbildung 25. Wirkung von Sorafenib auf die FLT3-ITD-Signalkaskade in auf EL08-1D2 Stromazellen kokultivierten MV4-11/AML-Zellen.

Der PI3K- und MAPK-Signalweg werden aufrechterhalten. Der aberrante STAT5-Signalweg wird durch die Förderung der adäquaten Reifung des FLT3-ITD-Rezeptors durch dessen komplexe Glykosylierung unterdrückt.

#### 4.1.6 Die kombinierte Sorafenib- und Bortezomib-Therapie kann den schützenden Effekt der Stromazellen umgehen

Vorherige Studien beschrieben bereits, dass die kombinierte in vitro Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zu einem erhöhten Ansprechen der Tumorzellen auf eine TKI-Therapie führen kann (Larrue, Saland et al. 2016).

Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass der bei Kokultur von primären AML-Zellen mit Stromazellen auftretende schützende Effekt durch die kombinierte Sorafenib-Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib umgangen werden kann (Ergebnisse, Abbildung 14, Seite 57).

Um den genauen Mechanismus zu verstehen wären jedoch weitere Experimente notwendig, da dieser Effekt zum Beispiel durch eine gesteigerte Apoptose erklärt werden könnte. Insgesamt befanden sich nach 30 Minuten und 24 Stunden kombinierter Behandlung mehr Zellen in der G1-Phase, dies könnte durch eine zelluläre Seneszenz erklärt werden, welche bekanntlich als Antwort auf durch Chemotherapeutika ausgelösten Zellstress auftreten kann. In kolorektalen Karzinomzellen führte Bortezomib zu einer Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p21 (Dabiri et al. 2017), welches dazu beiträgt, dass seneszente Zellen vor Apoptose geschützt werden, indem die Progression von G1- zu S-Phase verhindert wird (Yosef et al. 2017). Um die Bortezomib-Wirkung richtig interpretieren zu können, wären allerdings Analysen der Zellviabilität durch AnnexinV-Färbung auch bei der 2-stündigen und 24-stündigen Behandlung notwendig gewesen.



## 4.2 Einschränkungen

### 4.2.1 Weitere Targets der Phosphoproteomics

In dem ursprünglichen Protein-Screening der MV4-11 Zellen wurden noch weitere mögliche Targets identifiziert, welche ebenfalls analysiert werden müssten. Zu dem Zeitpunkt meiner Arbeit waren nur Antikörper gegen pS305-SGTA und pS422-eIF4B kommerziell verfügbar. Die Anwendung des erhaltenen anti-pS422-eIF4B Antikörpers blieb in den primären humanen AML-Zellen leider erfolglos. In Zukunft könnten jedoch noch weitere Antikörper sowohl gegen pS422-eIF4B, als auch gegen die übrigen Targets kommerziell verfügbar sein.

### 4.2.2 Fehlende Heterogenität der untersuchten Zelllinien und Patientenproben

Der gesamte Versuchsaufbau wurde bisher nur mit einer Zelllinie durchgeführt, dies ist nicht repräsentativ für die grosse Heterogenität der leukämischen Zelllinien. Ausschlaggebend wäre zu wissen, ob ähnliche oder vollkommen unterschiedliche Ergebnisse in der Untersuchung der humanen leukämischen FLT3-WT exprimierenden RS4-11 Zelllinie, sowie in der heterozygot FLT3-ITD<sup>+</sup> MOLM-13 Zelllinie zu erwarten wären. Nur so könnte bewiesen werden, dass die beschriebenen Effekte relevant und zudem spezifisch für die FLT3-ITD<sup>+</sup> Zelllinie sind.

Gleiches ist für das Primärmaterial geltend. Bisher wurde der Versuchsaufbau mit der AML-Probe einer einzigen Patientin durchgeführt, welche eine hohe FLT3-ITD-Ratio aufwies. Um definitiv sagen zu können, dass die beschriebenen Effekte auch in humanen primären AML-Zellen relevant sind, müssten die Versuche mit mehreren Patientenproben durchgeführt werden, insbesondere weil jeder Patient eine unterschiedlich hohe Last an mutierten Allelen, sowie unterschiedlich lange ITD-Insertionen aufweist. Zudem müssten die Versuche auch mit Patientenproben durchgeführt werden, welche andere FLT3-Mutationen aufweisen, um beweisen zu können, dass die beschriebenen Effekte spezifisch für FLT3-ITD<sup>+</sup> humane primäre AML-Zellen sind. Interessant wäre zum Beispiel zu wissen, wie sich eine Patientenprobe mit einer Punktmutation in der Tyrosinkinasedomäne, welche die Aktivierungsschleife des Rezeptors (FLT3/TKD) miteinbezieht verhalten würde, sowie

die Untersuchung einer gesunden Patientenprobe. Weiterhin sind in AML-Patienten häufig mehrere Genmutationen gleichzeitig auffindbar, neben FLT3-ITD-Mutationen und Mutationen der FLT3-Tyrosinkinasedomäne werden typischerweise auch NPM1-, TET2- und DNMT3A-Mutationen nachgewiesen. Diese zeigten sich ebenfalls als massgebliche prognostische Faktoren, welche mitberücksichtigt werden sollten (Tian et al. 2014; Hirsch et al. 2015; Ahn et al. 2016). Die hier verwendeten primären humanen AML-Zellen zeigten zusätzlich zur FLT3-ITD-Mutation sowohl eine NPM1-, als auch eine TET2-Mutation. Auch dies könnte die Ergebnisse beeinflusst haben.

#### 4.2.3 Sorafenib, ein Multikinase-Inhibitor

Ich setzte das Chemotherapeutikum Sorafenib ein, welches ein Multikinase-Inhibitor ist und somit auf viele Signalwege gleichzeitig modulierend wirkt. Dementsprechend wäre es ausgesprochen wichtig auch die weiteren Target-Gene zu untersuchen. Ich untersuchte im Rahmen meiner Arbeit eines dieser weiteren vielen Targets namens PDGFRa. Die Gesamtmenge des Proteins PDGFRa verhielt sich dem Phosphorylierungsstatus des Serinrests 305 des Proteins SGTA in den mit Sorafenib behandelten MV4-11 Zellen sehr ähnlich. In den monokultivierten Zellen war die Gesamtmenge des Proteins PDGFRa gleichermassen wie die Phosphorylierung von S305-SGTA signifikant erniedrigt (Abbildung 26). Bei Kokultivierung war es hingegen identisch zu dem Phosphorylierungsstatus von S305-SGTA genau umgekehrt, die Gesamtmenge des PDGFRa stieg signifikant an. Dieses Ergebnis zeigt, dass es unerlässlich wäre den PDGFRa-Signalweg zu untersuchen, insbesondere weil bereits vorherige Studien zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen PDGFRa und der Phosphorylierung von S305-SGTA besteht (Moritz, Li et al. 2010). Dies war zeitbedingt während meiner Doktorarbeit nicht mehr möglich.

A



B

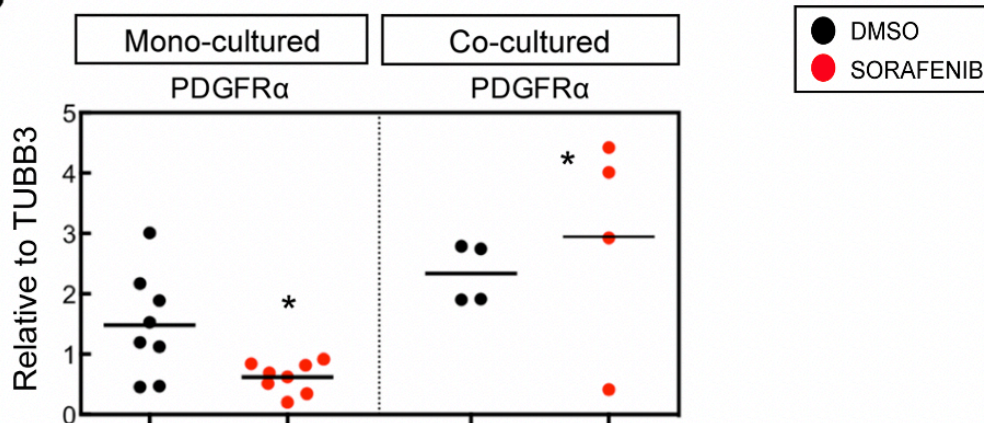


Abbildung 26. Proteinmenge von PDGFRα nach der Behandlung mit Sorafenib in mono- und kokultivierten MV4-11 Zellen.

(A) Repräsentative Western Blots (die Zahlen stehen für die technischen Replikate, die roten Zahlen stehen für die mit Sorafenib behandelten Proben); (B) Das Streudiagramm (Scatter plot) stellt die relative Expression des analysierten Proteins in Bezug auf das house-keeping Gen (TUBB3) dar;  $n \geq 4$ , \* deutet auf einen p-Wert  $< 0.05$  hin. Die Quantifizierung der Proteinmengen auf den entwickelten Western Blot Filmen erfolgte mit der ImageJ Software.

#### 4.2.4 Viabilität und funktionelle Aktivität der behandelten Zellen

Es wäre ausgesprochen wichtig zu prüfen, ob die behandelten kokultivierten Zellen, wirklich auf dem Stroma überlebt haben. Hierfür müssten die Zellen auf Methylcellulose gegeben werden, sodass wir in vitro testen könnten, ob ein Kolonienwachstum noch stattfinden würde. Ebenfalls müssten in vivo Testungen angeschlossen werden. Die Zellen müssten in immundefiziente Mäuse (NOD/SCID) transplantiert werden, um festzustellen ob sie nach Behandlung noch funktionell aktiv sind und ob sie auch in vivo noch eine Leukämie hervorrufen würden.

#### 4.2.5 Ausblick

SGTA ist ein vielversprechendes neues Target in der Behandlung der FLT3-ITD<sup>+</sup> Leukämie. Nach der Bestätigung von SGTA als neues Target, wäre die Entwicklung neuer Inhibitoren notwendig. Diese sollten gezielt das Protein blockieren, oder aber die Faktoren, welche sezerniert werden. Ebenfalls könnten dann Inhibitoren der Kinase, welche SGTA phosphoryliert, eingesetzt werden. Akt2 wurde zuvor als mögliche Kinase für pS305-SGTA beschrieben, da bei einem Akt2-Knockdown in Mauszellen eine reduzierte Phosphorylierung von S305-SGTA festgestellt werden konnte (Moritz, Li et al. 2010). Dies müsste noch weiter bestätigt werden.

Weiterhin müsste dann das phosphorylierte S305-SGTA durch das Einsetzen eines Antikörpers gegen die spezifische Phosphorylierungsstelle blockiert werden. Zuletzt sollten in vitro und in vivo Testungen durchgeführt werden, um festzustellen ob diese spezifische Phosphorylierungsstelle S305-SGTA tatsächlich die Ursache der vermehrten Rückfälle der FLT3-ITD<sup>+</sup> Leukämie ist.

Es werden noch zahlreiche Studien notwendig sein, pS305-SGTA zeigte sich jedoch bereits jetzt als vielversprechendes neues Target, welches es noch in seiner Ganzheit zu verstehen gilt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

**HINTERGRUND:** Trotz stetiger Fortschritte in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML), stellt die Behandlung erwachsener Patienten mit interner Tandemduplikation des FMS-like tyrosine kinase 3 Gens [(FLT3); FLT3-ITD<sup>+</sup> AML] noch immer eine grosse Herausforderung dar, denn obwohl ähnliche Remissionsraten wie bei anderen AML-Formen erreicht werden können, ist die FLT3-ITD<sup>+</sup> AML mit Remissionen von kürzerer Dauer, mit einer hohen Rückfallrate und einer besonders schlechten Prognose assoziiert. Dies scheint durch die Resistenz der FLT3-ITD<sup>+</sup> leukämischen Stammzellen (LSCs) gegenüber den bisher eingesetzten Therapien bedingt zu sein. Die meisten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wurden mit etablierten Zelllinien entwickelt, sodass die relevanten phosphorylierten Targets der FLT3-Inhibitoren in primären Patientenzellen womöglich nicht gleichermaßen wie in den Zelllinien beeinflusst werden.

**ZIELSETZUNG:** Ziel dieser Studie war es zunächst die Unterschiede des Phosphoproteoms der FLT3-ITD<sup>+</sup> MV4-11- und der primären FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Zellen mit oder ohne Kontakt zur Mikroumgebung zu erfassen. Die Identifizierung der durch FLT3-ITD-Fehlexpression phosphorylierten Targets sollte die spezifischen Modulationen durch TKI-Therapie aufdecken. Dies sollte die Entdeckung TKI-resistenter Phosphoproteine und somit die Entdeckung zusätzlicher Targets in primären AML-Zellen ermöglichen, welche zu einer effizienteren Elimination der FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs führen könnten.

**METHODEN:** Phosphorylierte Targets, welche durch den TKI Sorafenib und/oder die stromale Mikroumgebung beeinflusst werden, konnten mittels „stable isotope labeling by amino acids in cell culture“ (SILAC-Labeling) in Kokulturen sowohl der FLT3-ITD<sup>+</sup> MV4-11-, als auch der FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Zellen auf EL08-1D2 Stromazellen entdeckt werden. Die unterschiedliche Phosphorylierung wurde dann mittels Western Blot bestätigt. Zusätzlich erfolgten Zellzyklus- und Zellviabilitäts-Analysen, sowie Immunzytofluoreszenzfärbungen, welche anschliessend nach zusätzlicher Anwendung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib wiederholt wurden.

ERGEBNISSE: In dieser Arbeit konnten zunächst mithilfe von SILAC-Labeling neue Phosphorylierungsstellen von Proteinen in FLT3-ITD<sup>+</sup> MV4-11 Zellen detektiert werden, welche signifikant durch die Behandlung mit dem TKI Sorafenib, durch die Kokultur mit EL08-1D2 Stromazellen, oder durch die Kombination beider beeinflusst werden.

In einem nächsten Versuch konnte mittels Western Blot und Immunzytofluoreszenzfärbungen sowohl die durch Sorafenib-Behandlung in Mono- oder Kokultur bedingte Modulation des FLT3-Signalweges, als auch die Modulation spezifischer phosphorylierter Proteine, nämlich pS305-SGTA und pS422-eIF4B, festgestellt werden. Bei anschließender Wiederholung der Versuche in primärem Patientenmaterial (FLT3-ITD<sup>+</sup> AML-Zellen) konnten durch die Sorafenib-Behandlung und/oder Kokultur auf Stromazellen ähnliche Modulationen sowohl des Phosphoproteins pS305-SGTA, als auch der Zellviabilität beobachtet werden. Bedauerlicherweise war die Detektion von eIF4B mittels des in MV4-11 Zellen eingesetzten Antikörpers im Primärmaterial nicht erfolgreich.

Durch den in einem letzten Experiment zusätzlichen Einsatz des Proteasom-Inhibitors Bortezomib konnte der Überlebensvorteil der mit Sorafenib behandelten kokultivierten AML-Zellen umgangen werden.

AUSBLICK: Sowohl in MV4-11-, als auch in AML-Zellen, zeigte sich das Cochaperon SGTA bei kombinierter Sorafenib-Behandlung und Kokultur signifikant mehr an der Stelle Serin 305 phosphoryliert. Daraus lässt sich schliessen, dass die Phosphorylierung dieses Proteins signifikant zur Resistenz der FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs beitragen könnte. pS305-SGTA bietet sicherlich einen interessanten Ansatz für weitere Forschungsprojekte, welche das Ziel haben die definitive Eradikation der FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs sicherzustellen um die Prognose von FLT3-ITD<sup>+</sup> AML Patienten zu verbessern.

## 6. SUMMARY

**BACKGROUND:** Despite steady progress in acute myeloid leukemia (AML) therapy, treatment of adults with constitutively activated FMS-like tyrosine kinase 3 [(FLT3); FLT3-ITD<sup>+</sup> AML] still constitutes a huge challenge. Even though similar remission rates as in other AML subtypes may be achieved, FLT3-ITD<sup>+</sup> AML is associated with shorter remission periods, as well as a higher relapse rate and a particularly bad overall survival. This seems to be due to the resistance of FLT3-ITD<sup>+</sup> leukemic stem cells (LSCs) to therapies which have been in clinical use so far. As most tyrosine kinase inhibitors (TKI) were developed in established cell lines, relevant phosphorylated FLT3-inhibitor targets could possibly not be influenced the same way in primary AML patient samples.

**AIM OF THE STUDY:** Our first goal was the identification of differences between phosphorylated targets in the FLT3-ITD<sup>+</sup> MV4-11 cell line and primary FLT3-ITD<sup>+</sup> AML cells by using a phosphoproteomic approach. Furthermore, identification of targets modulated by the microenvironment and possibly involved in therapy resistance. Pinpointing phosphorylation of possible targets should enable the discovery of phosphoproteins resistant to TKI and the microenvironment and as a result the discovery of supplementary targets in primary AML cells could then facilitate reduced therapy-resistance and more efficient elimination of FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs.

**METHODS:** Phosphorylated targets modulated by the TKI Sorafenib and/or the stromal microenvironment were determined through “stable isotope labeling by amino acids in cell culture” (SILAC-Labeling) in co-cultures of both FLT3-ITD<sup>+</sup> MV4-11 cells and primary FLT3-ITD<sup>+</sup> AML cells on EL08-1D2 stroma cells. Differential phosphorylation was then confirmed by Western Blot. Additional investigations took place through cell viability and cell cycle assays, as well as immunohistochemical staining. These experiments were then repeated after the additional use of the proteasome inhibitor Bortezomib.

**RESULTS:** We detected several new phosphorylated proteins in FLT3-ITD<sup>+</sup> MV4-11 cells which are significantly altered when treated with the TKI Sorafenib, co-cultured with EL08-1D2 stroma cells, or treated with Sorafenib while being co-cultured on EL08-1D2 stroma cells, using the SILAC-Labeling approach.

We confirmed differential phosphorylation of FLT3 and downstream targets, as well as the newly identified pS305-SGTA and pS422-eIF4B in Sorafenib-modulated mono- or co-cultures by Western Blot and immunohistochemical staining.

When these experiments were repeated in AML patient samples (FLT3-ITD<sup>+</sup> AML cells) similar modulations of the protein pS305-SGTA and cell viability were observed when treated with Sorafenib in mono- or co-culture. However, we couldn't detect eIF4B using the same antibody as in MV4-11 cells. Finally, the survival benefit of Sorafenib treated, co-cultured AML cells could be bypassed by adding the proteasome inhibitor Bortezomib.

**CONCLUSION:** In MV4-11 cells, as well as in primary AML cells, phosphorylation of the cochaperone SGTA at Serine 305 was significantly higher when combining Sorafenib treatment and co-culture, indicating that phosphorylation of this protein might contribute to the resistance of FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs. My findings strongly suggest that pS305-SGTA is a potential target for further studies aiming to definitively eradicate FLT3-ITD<sup>+</sup> LSCs, thereby improving the prognosis of FLT3-ITD<sup>+</sup> AML patients.



## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
7-AAD	7-Aminoactinomycine D
AML	akute myeloische Leukämie
ARM	Arginine-rich motif
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumine
Bortez	Bortezomib
CCND1	Cyclin D1
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN1B	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1B
cDNA	Complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNMT3a	DNA methyltransferase 3 alpha
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EIF4-B	Eukaryotic translation initiation factor 4BB
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
Erk	Extracellular signal-regulated kinases
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FL	FLT3 Ligand
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
GSK3b	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks's buffered salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
HS	Horse Serum
HSC	Hematopoietic stem cell
HSP	Heat shock protein
ITD	Internal tandem duplication
JAK	Janus Kinasen
LTC Medium	Long-term culture (LTC) Medium
LSCs	Leukämische Stammzellen
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEM	Minimum Essential Media
Met-tRNA	N-Formyl-Methionyl-transfer-RNA
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaB	Dinatriumtetraborat
NaF	Natriumfluorid
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
NOD	Non obese diabetic
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid
Rpm	Runs per min
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRM	RNA Recognition Motif
RSK	Ribosomal s6 kinase
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SILAC	Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture
SGTA	Small Glutamine Rich Tetratricopetide Repeat Containing Alpha
Sora	Sorafenib
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TBS	Tris-buffered salin
TBB3	Tubulin beta-3
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2
TGS	TRIS-Glycin-SDS
TKD	Tyrosinkinasedomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTRS	Untranslatierte Regionen
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.	PCR-Analyse auf genomische DNA von humanen primären AML-Zellen und MV4-11 Zellen. ....	28
Abbildung 2.	Versuchsaufbau. ....	29
Abbildung 3.	Phosphorylierungsstatus von SGTA und eIF4B nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen. ....	38
Abbildung 4.	Der FLT3-Signalweg in humanen Zellen. ....	39
Abbildung 5.	Phosphorylierungsstatus von FLT3 und AKT1 und Proteinmenge von CDKN1B nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen. ....	40
Abbildung 6.	Viabilität der MV4-11 Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer AnnexinV-Färbung. ....	42
Abbildung 7.	Proliferation der MV4-11 Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung..	44
Abbildung 8.	Expression von CCND1 und GSK3B in MV4-11 Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen. ....	46
Abbildung 9.	Schematische Darstellung des FLT3-Signalweges in Mono- und Kokulturen basierend auf oben erwähnte Ergebnisse.....	47
Abbildung 10.	Phosphorylierungsstatus von SGTA nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen. ....	50
Abbildung 11.	Phosphorylierungsstatus von FLT3 und AKT1 und Proteinmenge von CDKN1B nach der Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen. ....	51

Abbildung 12. Viabilität der AML-Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer AnnexinV-Färbung. ....	53
Abbildung 13. Proliferation der AML-Zellen nach ihrer Behandlung mit Sorafenib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung.....	55
Abbildung 14. Auswirkung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib auf kokultivierte humane primäre AML-Zellen.....	57
Abbildung 15. Proliferation der AML-Zellen nach 30-minütiger Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung. ....	59
Abbildung 16. Proliferation der AML-Zellen nach 2-stündiger Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung. ....	61
Abbildung 17. Proliferation der AML-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, analysiert anhand einer Ki-67-Färbung. ....	62
Abbildung 18. Expression von CCND1 in AML-Zellen nach ihrer 30-minütigen Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen. ....	63
Abbildung 19. Expression von CCND1 in AML-Zellen nach ihrer 2-stündigen Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen. ....	64
Abbildung 20. Expression von CCND1 in AML-Zellen nach ihrer 24-stündigen Behandlung mit Bortezomib in Mono- und Kokulturen, identifiziert anhand von Einzelzellfärbungen. ....	65
Abbildung 21. Kinetik des CCND1 Proteins und der G1-Phase des Zellzyklus. ....	66

Abbildung 22.	FLT3-ITD-Signalkaskade mit möglichem neuem Downstream Signalmolekül SGTA, sowie bekanntem Downstream Signalmolekül eIF4B und die Kontrolle der Phosphorylierung dessen Serinrests 422 über die drei Hauptsignalwege PI3K/MAPK/STAT5.....	71
Abbildung 23.	Die Phosphorylierung und Aktivierung von FLT3-ITD erfolgt ebenso wie die Aktivierung dessen nachgeschalteter Signalmoleküle Zellkompartiment spezifisch. ....	73
Abbildung 24.	Wirkung von Sorafenib auf die FLT3-ITD-Signalkaskade in monokultivierten MV4-11/AML-Zellen. ....	74
Abbildung 25.	Wirkung von Sorafenib auf die FLT3-ITD-Signalkaskade in auf EL08-1D2 Stromazellen kokultivierten MV4-11/AML-Zellen.....	75
Abbildung 26.	Proteinmenge von PDGFRa nach der Behandlung mit Sorafenib in mono- und kokultivierten MV4-11 Zellen.....	79

## 9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.	Antikörper.....	25
Tabelle 2.	Daten zu dem AML-Patienten von dem die Zelllinie abgeleitet wurde.	26
Tabelle 3.	Daten zur etablierten leukämischen Zelllinie .....	26
Tabelle 4.	Daten zur eingesetzten Patientenprobe.....	26
Tabelle 5.	PCR-Mix und PCR-Bedingungen.....	35
Tabelle 6.	Zusammenfassung der Phosphoproteomic-Ergebnisse .....	37

## 10. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adelson, K., B. Ramaswamy, J. A. Sparano, P. J. Christos, J. J. Wright, G. Raptis, G. Han, M. Villalona-Calero, C. X. Ma, D. Hershman, J. Baar, P. Klein, T. Cigler, G. T. Budd, Y. Novik, A. R. Tan, S. Tannenbaum, A. Goel, E. Levine, C. L. Shapiro, E. Andreopoulou, M. Naughton, K. Kalinsky, S. Waxman and D. Germain (2016). "Randomized phase II trial of fulvestrant alone or in combination with bortezomib in hormone receptor-positive metastatic breast cancer resistant to aromatase inhibitors: a New York Cancer Consortium trial." NPJ Breast Cancer **2**: 16037.
2. Ahn, J.-S., H.-J. Kim, Y.-K. Kim, S.-S. Lee, S.-H. Jung, D.-H. Yang, J.-J. Lee, N. Y. Kim, S. H. Choi, C. W. Jung, J.-H. Jang, H. J. Kim, J. H. Moon, S. K. Sohn, J.- H. Won, S.-H. Kim and D. D. H. Kim (2016). "DNMT3A R882 Mutation with FLT3-ITD Positivity Is an Extremely Poor Prognostic Factor in Patients with Normal-Karyotype Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation." Biology of Blood and Marrow Transplantation **22**(1): 61-70.
3. Al-Mawali, A., D. Gillis and I. Lewis (2016). "Immunoprofiling of leukemic stem cells CD34+/CD38-/CD123+ delineate FLT3/ITD-positive clones." Journal of Hematology & Oncology **9**: 61.
4. Andreou, A. Z., U. Harms and D. Klostermeier (2017). "eIF4B stimulates eIF4A ATPase and unwinding activities by direct interaction through its 7-repeats region." RNA Biology **14**(1): 113-123.
5. Angeletti, P. C., D. Walker and A. T. Panganiban (2002). "Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity." Cell stress & chaperones **7**(3): 258-268.
6. Auclair, D., D. Miller, V. Yatsula, W. Pickett, C. Carter, Y. Chang, X. Zhang, D. Wilkie, A. Burd, H. Shi, S. Rocks, R. Gedrich, L. Abriola, H. Vasavada, M. Lynch, J. Dumas, P. A. Trail and S. M. Wilhelm (2007). "Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells." Leukemia **21**(3): 439-445.
7. Bakker, E., M. Qattan, L. Mutti, C. Demonacos and M. Krstic-Demonacos (2016). "The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1863**(3): 414-426.
8. Baldin, V., J. Lukas, M. J. Marcote, M. Pagano and G. Draetta (1993). "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1." Genes & Development **7**(5): 812-821.
9. Beglinger, K., N. Villa, A. Andaya, J. Leary and C. Fraser (2017). "Analysis of Eukaryotic Translation Initiation Factor (eIF) Phosphorylation by Mass Spectrometry." The FASEB Journal **31**(1 Supplement): 600.601-600.601.
10. Blain, S. W., E. Montalvo and J. Massagué (1997). "Differential Interaction of the Cyclin-dependent Kinase (Cdk) Inhibitor p27Kip1 with Cyclin A-Cdk2 and Cyclin D2-Cdk4." Journal of Biological Chemistry **272**(41): 25863-25872.
11. Brandts, C. H., B. Sargin, M. Rode, C. Biermann, B. Lindtner, J. Schwäble, H. Buerger, C. Müller-Tidow, C. Choudhary, M. McMahon, W. E. Berdel and H. Serve (2005). "Constitutive Activation of Akt by Flt3 Internal Tandem Duplications Is Necessary for Increased Survival, Proliferation, and Myeloid Transformation." Cancer Research **65**(21): 9643.



12. Broxmeyer, H. E., S. Lu L Fau - Cooper, L. Cooper S Fau - Ruggieri, Z. H. Ruggieri L Fau - Li, S. D. Li Zh Fau - Lyman and S. D. Lyman (1995). "Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells." Experimental Hematology **23**(10): 1121-1129.
13. Brunner, A. M., S. Li, A. T. Fathi, M. Wadleigh, V. T. Ho, K. Collier, C. Connolly, K. K. Ballen, C. S. Cutler, B. R. Dey, A. El-Jawahri, S. Nikiforow, S. L. McAfee, J. Koreth, D. J. Deangelo, E. P. Alyea, J. H. Antin, T. R. Spitzer, R. M. Stone, R. J. Soiffer and Y.-B. Chen (2016). "Haematopoietic cell transplantation with and without sorafenib maintenance for patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia in first complete remission." British Journal of Haematology **175**(3): 496-504.
14. Buchanan, G., C. Ricciardelli, J. M. Harris, J. Prescott, Z. C.-L. Yu, L. Jia, L. M. Butler, V. R. Marshall, H. I. Scher, W. L. Gerald, G. A. Coetzee and W. D. Tilley (2007). "Control of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer by the Cochaperone Small Glutamine-Rich Tetratricopeptide Repeat Containing Protein  $\alpha$ ." Cancer Research **67**(20): 10087.
15. Bullinger, L., K. Döhner and H. Döhner (2017). "Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways." Journal of Clinical Oncology **35**(9): 934-946.
16. Cardillo, M. R. and F. Ippoliti (2006). "IL-6, IL-10 and HSP-90 Expression in Tissue Microarrays from Human Prostate Cancer Assessed by Computer-assisted Image Analysis." Anticancer Research **26**(5A): 3409-3416.
17. Chartron, J. W., D. G. VanderVelde and W. M. Clemons (2012). "Structures of the Sgt2/SGTA dimerization domain with the Get5/UBL4A UBL domain reveal a novel interaction that forms a conserved dynamic interface." Cell reports **2**(6): 10.1016/j.celrep.2012.1010.1010.
18. Chen, K., J. Yang, J. Li, X. Wang, Y. Chen, S. Huang and J.-L. Chen (2016). "eIF4B is a convergent target and critical effector of oncogenic Pim and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in Abl transformants." Oncotarget **7**(9): 10073-10089.
19. Chen, M., X. Xia, X. Zhu, J. Cao, D. Xu, Y. Ni, Y. Liu, S. Yan, X. Cheng, Y. Liu and Y. Wang (2014). "Expression of SGTA correlates with neuronal apoptosis and reactive gliosis after spinal cord injury." Cell and Tissue Research **358**(2): 277-288.
20. Chen, Y., Y. Pan, Y. Guo, W. Zhao, W. T. Ho, J. Wang, M. Xu, F.-C. Yang and Z. J. Zhao (2017). "Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia." Stem Cell Investigation **4**: 48.
21. Choudhary, C., J. V. Olsen, C. Brandts, J. Cox, P. N. G. Reddy, F. D. Böhmer, V. Gerke, D.-E. Schmidt-Arras, W. E. Berdel, C. Müller-Tidow, M. Mann and H. Serve (2009). "Mislocalized Activation of Oncogenic RTKs Switches Downstream Signaling Outcomes." Molecular Cell **36**(2): 326-339.
22. Ciechanover, A. (1994). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway." Cell **79**(1): 13-21.
23. Civini, S., P. Jin, J. Ren, M. Sabatino, L. Castiello, J. Jin, H. Wang, Y. Zhao, F. Marincola and D. Stroncek (2013). "Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells." Journal of Translational Medicine **11**: 298-298.
24. Colmone, A., M. Amorim, A. L. Pontier, S. Wang, E. Jablonski and D. A. Sipkins (2008). "Leukemic Cells Create Bone Marrow Niches That Disrupt the Behavior of Normal Hematopoietic Progenitor Cells." Science **322**(5909): 1861.

25. Csibi, A., G. Lee, S.-O. Yoon, H. Tong, D. Ilter, I. Elia, S.-M. Fendt, T. M. Roberts and J. Blenis (2014). "The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc translation." Current biology : CB **24**(19): 2274-2280.
26. Csizmar, C. M., D. H. Kim and Z. Sachs (2016). "The role of the proteasome in AML." Blood Cancer Journal **6**(12): e503-e503.
27. Cziepluch, C., E. Kordes, R. Poirey, A. Grewenig, J. Rommelaere and J.-C. Jauniaux (1998). "Identification of a Novel Cellular TPR-Containing Protein, SGT, That Interacts with the Nonstructural Protein NS1 of Parvovirus H-1." Journal of Virology **72**(5): 4149-4156.
28. Dabiri, Y., S. Kalman, C.-M. Gürth, J. Y. Kim, V. Mayer and X. Cheng (2017). "The essential role of TAp73 in bortezomib-induced apoptosis in p53-deficient colorectal cancer cells." Scientific reports **7**(1): 5423-5423.
29. Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." Blood **112**(13): 4793.
30. Döhner, H. (2007). "Implication of the Molecular Characterization of Acute Myeloid Leukemia." ASH Education Program Book **2007**(1): 412-419.
31. Döhner, H., E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Büchner, A. K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R. A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, B. Löwenberg and C. D. Bloomfield (2010). "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet." Blood **115**(3): 453.
32. Döhner, H., D. J. Weisdorf and C. D. Bloomfield (2015). "Acute Myeloid Leukemia." New England Journal of Medicine **373**(12): 1136-1152.
33. Dombret, H. and C. Gardin (2016). "An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia." Blood **127**(1): 53-61.
34. Dutta, S. and Y.-J. Tan (2008). "Structural and Functional Characterization of Human SGT and Its Interaction with Vpu of the Human Immunodeficiency Virus Type 1." Biochemistry **47**(38): 10123-10131.
35. Elliott, P. J. and J. S. Ross (2001). "The Proteasome A New Target for Novel Drug Therapies." American Journal of Clinical Pathology **116**(5): 637-646.
36. Eppert, K., K. Takenaka, E. R. Lechman, L. Waldron, B. Nilsson, P. van Galen, K. H. Metzeler, A. Poepl, V. Ling, J. Beyene, A. J. Canty, J. S. Danska, S. K. Bohlander, C. Buske, M. D. Minden, T. R. Golub, I. Jurisica, B. L. Ebert and J. E. Dick (2011). "Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia." Nature Medicine **17**(9): 1086-1093.
37. Escudier, B., T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov and R. M. Bukowski (2007). "Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma." New England Journal of Medicine **356**(2): 125-134.
38. Estey, E. and H. Döhner (2006). "Acute myeloid leukaemia." The Lancet **368**(9550): 1894-1907.
39. Fathi, A. T. and Y.-B. Chen (2017). "The role of FLT3 inhibitors in the treatment of FLT3-mutated acute myeloid leukemia." European Journal of Haematology **98**(4): 330-336.

40. Fey, M. F. and C. Buske (2013). "Acute myeloblastic leukaemias in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Annals of Oncology **24**(suppl\_6): vi138-vi143.
41. Forman, S. J. and J. M. Rowe (2013). "The myth of the second remission of acute leukemia in the adult." Blood **121**(7): 1077-1082.
42. Fouladi, F., L. B. Jehn, S. K. Metzelder, F. Hub, K. Henkenius, A. Burchert, C. Brendel, T. Stiewe and A. Neubauer (2015). "Sorafenib induces paradoxical phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase pathway in acute myeloid leukemia cells lacking FLT3-ITD mutation." Leukemia & lymphoma **56**(9): 2690-2698.
43. Fröhling, S., R. F. Schlenk, J. Breitnick, A. Benner, S. Kreitmeier, K. Tobis, H. Döhner and K. Döhner (2002). "Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm." Blood **100**(13): 4372.
44. Fröhling, S., C. Scholl, D. G. Gilliland and R. L. Levine (2005). "Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenetic and Clinical Implications." Journal of Clinical Oncology **23**(26): 6285-6295.
45. Gilliland, D. G. and J. D. Griffin (2002). "The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia." Blood **100**(5): 1532.
46. Hackl, H., K. Astanina and R. Wieser (2017). "Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia." Journal of Hematology & Oncology **10**: 51.
47. Handley, M. A., S. Paddock, A. Dall and A. T. Panganiban (2001). "Association of Vpu-Binding Protein with Microtubules and Vpu-Dependent Redistribution of HIV-1 Gag Protein." Virology **291**(2): 198-207.
48. Hanke, K., C. Chudak, R. Kurth and N. Bannert (2013). "The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT)." International Journal of Cancer **132**(3): 556-567.
49. Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes & Development **18**(16): 1926-1945.
50. Hilt, W. and D. H. Wolf (1996). "Proteasomes: destruction as a programme." Trends in Biochemical Sciences **21**(3): 96-102.
51. Hinnebusch, A. G. and J. R. Lorsch (2012). "The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **4**(10): a011544.
52. Hirsch, P., G. Qassa, C. Marzac, R. Tang, J.-Y. Perrot, F. Isnard, M. Mohty, J. P. Marie and O. Legrand (2015). "Acute myeloid leukemia in patients older than 75: prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutations " Leukemia & lymphoma **56**(1): 147-150.
53. Holz, M. K., B. A. Ballif, S. P. Gygi and J. Blenis (2005). "mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events." Cell **123**(4): 569-580.
54. Horvilleur, E., T. Sbarrato, K. Hill, R. V. Spriggs, M. Screen, P. J. Goodrem, K. Sawicka, L. C. Chaplin, C. Touriol, G. Packham, K. N. Potter, S. Dirnhofer, A. Tzankov, M. J. S. Dyer, M. Bushell, M. MacFarlane and A. E. Willis (2014). "A role for eukaryotic initiation factor 4B overexpression in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma." Leukemia **28**(5): 1092-1102.

55. Kim, Y., G. D. Lee, J. Park, J. H. Yoon, H. J. Kim, W. S. Min and M. Kim (2015). "Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length." Blood Cancer Journal **5**(8): e336.
56. Kiyoi, H., S. Towatari M Fau - Yokota, M. Yokota S Fau - Hamaguchi, R. Hamaguchi M Fau - Ohno, H. Ohno R Fau - Saito, T. Saito H Fau - Naoe and T. Naoe (1998). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product." Leukemia **12**(9): 1333-1337.
57. Konopleva, M. Y. and C. T. Jordan (2011). "Leukemia Stem Cells and Microenvironment: Biology and Therapeutic Targeting." Journal of Clinical Oncology **29**(5): 591-599.
58. Köthe, S., J. P. Müller, S.-A. Böhmer, T. Tschongov, M. Fricke, S. Koch, C. Thiede, R. P. Requardt, I. Rubio and F. D. Böhmer (2013). "Features of Ras activation by a mislocalized oncogenic tyrosine kinase: FLT3 ITD signals through K-Ras at the plasma membrane of acute myeloid leukemia cells." Journal of Cell Science **126**(20): 4746.
59. Kottaridis, P. D., R. E. Gale, M. E. Frew, G. Harrison, S. E. Langabeer, A. A. Belton, H. Walker, K. Wheatley, D. T. Bowen, A. K. Burnett, A. H. Goldstone and D. C. Linch (2001). "The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials." Blood **98**(6): 1752.
60. Kumar, S. K., J. Jett, R. Marks, R. Richardson, F. Quevedo, T. Moynihan, G. Croghan, S. N. Markovic, K. C. Bible, R. Qin, A. Tan, J. Molina, S. H. Kaufmann, C. Erlichman and A. A. Adjei (2013). "Phase 1 Study of Sorafenib in Combination with Bortezomib in Patients with Advanced Malignancies." Investigational new drugs **31**(5): 1201-1206.
61. Kusadasi, N., R. Oostendorp, W. J. Koevoet, E. A. Dzierzak and R. E. Ploemacher (2002). "Stromal cells from murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region, liver and gut mesentery expand human umbilical cord blood-derived CAFC(week6) in extended long-term cultures." Leukemia **16**(9): 1782.
62. Lange, B., M. Valtieri, D. Santoli, D. Caracciolo, F. Mavilio, I. Gemperlein, C. Griffin, B. Emanuel, J. Finan and P. Nowell (1987). "Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines." Blood **70**(1): 192.
63. Larrue, C., E. Saland, H. Boutzen, F. Vergez, M. David, C. Joffre, M.-A. Hospital, J. Tamburini, E. Delabesse, S. Manenti, J. E. Sarry and C. Récher (2016). "Proteasome inhibitors induce FLT3-ITD degradation through autophagy in AML cells." Blood **127**(7): 882.
64. Laurenti, E. and B. Göttgens (2018). "From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes." Nature **553**(7689): 418-426.
65. Lavagna-Sevenier, C., D. Marchetto S Fau - Birnbaum, O. Birnbaum D Fau - Rosnet and O. Rosnet (1998). "FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates." Leukemia **12**(3): 301-310.

66. Levis, M., J. Allebach, K.-F. Tse, R. Zheng, B. R. Baldwin, B. D. Smith, S. Jones-Bolin, B. Ruggeri, C. Dionne and D. Small (2002). "A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo." Blood **99**(11): 3885.
67. Levis, M., K. M. Murphy, R. Pham, K.-T. Kim, A. Stine, L. Li, I. McNiece, B. D. Smith and D. Small (2005). "Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells." Blood **106**(2): 673.
68. Levis, M., F. Ravandi, E. S. Wang, M. R. Baer, A. Perl, S. Coutre, H. Erba, R. K. Stuart, M. Baccarani, L. D. Cripe, M. S. Tallman, G. Meloni, L. A. Godley, A. A. Langston, S. Amadori, I. D. Lewis, A. Nagler, R. Stone, K. Yee, A. Advani, D. Douer, W. Wiktor-Jedrzejczak, G. Juliusson, M. R. Litzow, S. Petersdorf, M. Sanz, H. M. Kantarjian, T. Sato, L. Tremmel, D. M. Bensen-Kennedy, D. Small and B. D. Smith (2011). "Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse." Blood **117**(12): 3294-3301.
69. Leznicki, P., A. Clancy, B. Schwappach and S. High (2010). "Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins." Journal of Cell Science **123**(Pt 13): 2170-2178.
70. Leznicki, P. and S. High (2012). "SGTA antagonizes BAG6-mediated protein triage." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(47): 19214-19219.
71. Liesveld, J. L., K. E. Rosell, J. Bechelli, C. Lu, P. Messina, D. Mulford, J. J. Iftikhharuddin, C. T. Jordan and G. L. Phillips (2011). "Proteasome Inhibition in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myelogenous Leukemia Cell Lines." Cancer investigation **29**(7): 439-450.
72. Liou, S.-T. and C. Wang (2005). "Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions." Archives of Biochemistry and Biophysics **435**(2): 253-263.
73. Liu, F.-H., S.-J. Wu, S.-M. Hu, C.-D. Hsiao and C. Wang (1999). "Specific Interaction of the 70-kDa Heat Shock Cognate Protein with the Tetratricopeptide Repeats." Journal of Biological Chemistry **274**(48): 34425-34432.
74. Llovet, J. M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.-F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J.-L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J.-F. Seitz, I. Borbath, D. Häussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis and J. Bruix (2008). "Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma." New England Journal of Medicine **359**(4): 378-390.
75. Lu, C., G. Liu, X. Cui, J. Zhang, L. Wei, Y. Wang, X. Yang, Y. Liu, X. Cong, L. Lv, R. Ni and X. Huang (2014). "Expression of SGTA Correlates with Prognosis and Tumor Cell Proliferation in Human Hepatocellular Carcinoma." Pathology & Oncology Research **20**(1): 51-60.
76. Lwin, T., L. A. Hazlehurst, S. Dessureault, R. Lai, W. Bai, E. Sotomayor, L. C. Moscinski, W. S. Dalton and J. Tao (2007). "Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCF(Skp2) ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas." Blood **110**(5): 1631-1638.

77. Lyons, J. F., S. Wilhelm, B. Hibner and G. Bollag (2001). "Discovery of a novel Raf kinase inhibitor." Endocrine-Related Cancer **8**(3): 219-225.
78. Man, C. H., T. K. Fung, C. Ho, H. H. C. Han, H. C. H. Chow, A. C. H. Ma, W. W. L. Choi, S. Lok, A. M. S. Cheung, C. Eaves, Y. L. Kwong and A. Y. H. Leung (2012). "Sorafenib treatment of FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia: favorable initial outcome and mechanisms of subsequent nonresponsiveness associated with the emergence of a D835 mutation." Blood **119**(22): 5133.
79. Manzella, J. M., W. Rychlik, R. E. Rhoads, J. W. Hershey and P. J. Blackshear (1991). "Insulin induction of ornithine decarboxylase. Importance of mRNA secondary structure and phosphorylation of eucaryotic initiation factors eIF-4B and eIF-4E." Journal of Biological Chemistry **266**(4): 2383-2389.
80. Medves, S. and J.-B. Demoulin (2012). "Tyrosine kinase gene fusions in cancer: translating mechanisms into targeted therapies." Journal of Cellular and Molecular Medicine **16**(2): 237-248.
81. Méthot, N., A. Pause, J. W. Hershey and N. Sonenberg (1994). "The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleoprotein consensus sequence." Molecular and Cellular Biology **14**(4): 2307-2316.
82. Méthot, N., M. S. Song and N. Sonenberg (1996). "A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3." Molecular and Cellular Biology **16**(10): 5328-5334.
83. Milburn, S. C., J. Pelletier, N. Sonenberg and J. W. B. Hershey (1988). "Identification of the 80-kDa protein that crosslinks to the cap structure of eukaryotic mRNAs as initiation factor eIF-4B." Archives of Biochemistry and Biophysics **264**(1): 348-350.
84. Moritz, A., Y. Li, A. Guo, J. Villén, Y. Wang, J. MacNeill, J. Kornhauser, K. Sprott, J. Zhou, A. Possemato, J. M. Ren, P. Hornbeck, L. C. Cantley, S. P. Gygi, J. Rush and M. J. Comb (2010). "Akt-RSK-S6-kinase Signaling Networks Activated by Oncogenic Receptor Tyrosine Kinases." Science signaling **3**(136): ra64-ra64.
85. Motti, M. L., D. Califano, G. Troncone, C. De Marco, I. Migliaccio, E. Palmieri, L. Pezzullo, L. Palombini, A. Fusco and G. Viglietto (2005). "Complex Regulation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27(kip1) in Thyroid Cancer Cells by the PI3K/AKT Pathway: Regulation of p27(kip1) Expression and Localization." The American Journal of Pathology **166**(3): 737-749.
86. Mrózek, K., N. A. Heerema and C. D. Bloomfield (2004). "Cytogenetics in acute leukemia." Blood Reviews **18**(2): 115-136.
87. Oostendorp, R. A. J., K. N. Harvey, N. Kusadasi, M. F. T. R. de Bruijn, C. Saris, R. E. Ploemacher, A. L. Medvinsky and E. A. Dzierzak (2002). "Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity." Blood **99**(4): 1183.
88. Oostendorp, R. A. J., C. Robin, C. Steinhoff, S. Marz, R. Bräuer, U. A. Nuber, E. A. Dzierzak and C. Peschel (2005). "Long-Term Maintenance of Hematopoietic Stem Cells Does Not Require Contact with Embryo-Derived Stromal Cells in Cocultures." STEM CELLS **23**(6): 842-851.
89. Parmar, A., S. Marz, S. Rushton, C. Holzwarth, K. Lind, S. Kayser, K. Döhner, C. Peschel, R. A. J. Oostendorp and K. S. Götze (2011). "Stromal Niche Cells Protect Early Leukemic FLT3-ITD+ Progenitor Cells against First-Generation FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors." Cancer Research **71**(13): 4696.

90. Paul, A., Y. A. Garcia, B. Zierer, C. Patwardhan, O. Gutierrez, Z. Hildenbrand, D. C. Harris, H. A. Balsiger, J. C. Sivils, J. L. Johnson, J. Buchner, A. Chadli and M. B. Cox (2014). "The Cochaperone SGTA (Small Glutamine-rich Tetratricopeptide Repeat-containing Protein Alpha) Demonstrates Regulatory Specificity for the Androgen, Glucocorticoid, and Progesterone Receptors." The Journal of Biological Chemistry **289**(22): 15297-15308.
91. Philp, L. K., M. S. Butler, T. E. Hickey, L. M. Butler, W. D. Tilley and T. K. Day (2013). "SGTA: A New Player in the Molecular Co-Chaperone Game." Hormones and Cancer **4**(6): 343-357.
92. Pollard, J. A., T. A. Alonzo, R. B. Gerbing, W. G. Woods, B. J. Lange, D. A. Sweetser, J. P. Radich, I. D. Bernstein and S. Meshinchi (2006). "FLT3 internal tandem duplication in CD34+/CD33- precursors predicts poor outcome in acute myeloid leukemia." Blood **108**(8): 2764.
93. Raught, B., F. Peiretti, A.-C. Gingras, M. Livingstone, D. Shahbazian, G. L. Mayeur, R. D. Polakiewicz, N. Sonenberg and J. W. B. Hershey (2004). "Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases." The EMBO Journal **23**(8): 1761-1769.
94. Ravandi, F., H. Kantarjian, S. Faderl, G. Garcia-Manero, S. O'Brien, C. Koller, S. Pierce, M. Brandt, D. Kennedy, J. Cortes and M. Beran (2010). "OUTCOME OF PATIENTS WITH FLT3 MUTATED ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN FIRST RELAPSE." Leukemia Research **34**(6): 752-756.
95. Ray, A., M. K. James, S. Larochele, R. P. Fisher and S. W. Blain (2009). "p27(Kip1) Inhibits Cyclin D-Cyclin-Dependent Kinase 4 by Two Independent Modes." Molecular and Cellular Biology **29**(4): 986-999.
96. Rodrigo-Brenni, Monica C., E. Gutierrez and Ramanujan S. Hegde (2014). "Cytosolic Quality Control of Mislocalized Proteins Requires RNF126 Recruitment to Bag6." Molecular Cell **55**(2): 227-237.
97. Rogers, G. W., N. J. Richter and W. C. Merrick (1999). "Biochemical and Kinetic Characterization of the RNA Helicase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A." Journal of Biological Chemistry **274**(18): 12236-12244.
98. Röllig, C., H. Serve, A. Hüttmann, R. Noppeney, C. Müller-Tidow, U. Krug, C. D. Baldus, C. H. Brandts, V. Kunzmann, H. Einsele, A. Krämer, K. Schäfer-Eckart, A. Neubauer, A. Burchert, A. Giagounidis, S. W. Krause, A. Mackensen, W. Aulitzky, R. Herbst, M. Hänel, A. Kiani, N. Frickhofen, J. Kullmer, U. Kaiser, H. Link, T. Geer, A. Reichle, C. Junghanß, R. Repp, F. Heits, H. Dürk, J. Hase, I.-M. Klut, T. Illmer, M. Bornhäuser, M. Schaich, S. Parmentier, M. Görner, C. Thiede, M. von Bonin, J. Schetelig, M. Kramer, W. E. Berdel and G. Ehninger (2015). "Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial." The Lancet Oncology **16**(16): 1691-1699.
99. Rosen, D. B., M. D. Minden, S. M. Kornblau, A. Cohen, U. Gayko, S. Putta, J. Woronicz, E. Evensen, W. J. Fantl and A. Cesano (2010). "Functional Characterization of FLT3 Receptor Signaling Deregulation in Acute Myeloid Leukemia by Single Cell Network Profiling (SCNP)." PLoS ONE **5**(10): e13543.
100. Rosnet, O., C. Schiff, M. J. Pebusque, S. Marchetto, C. Tonnelles, Y. Toiron, F. Birg and D. Birnbaum (1993). "Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells." Blood **82**(4): 1110.

101. Saraceni, F., M. Labopin, N.-C. Gorin, D. Blaise, R. Tabrizi, L. Volin, J. Cornelissen, J.-Y. Cahn, P. Chevallier, C. Craddock, D. Wu, A. Huynh, W. Arcese, M. Mohty, A. Nagler, B. Acute Leukemia Working Party of the European society for and T. Marrow (2016). "Matched and mismatched unrelated donor compared to autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a retrospective, propensity score-weighted analysis from the ALWP of the EBMT." Journal of Hematology & Oncology **9**(1): 79.
102. Schantl, J. A., M. Roza, A. P. De Jong and G. J. Strous (2003). "Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGT) interacts with the ubiquitin-dependent endocytosis (UbE) motif of the growth hormone receptor." Biochemical Journal **373**(Pt 3): 855-863.
103. Schmidt-Arras, D., S.-A. Böhmer, S. Koch, J. P. Müller, L. Blei, H. Cornils, R. Bauer, S. Korasikha, C. Thiede and F.-D. Böhmer (2009). "Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality." Blood **113**(15): 3568.
104. Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells **4**(1-2): 7-25.
105. Schwartz, R. and T. Davidson (2004). "Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib." ONCOLOGY **18**(14\_Suppl\_11 Oncology Journal, Multiple Myeloma): 14-21.
106. Serve, H., U. Krug, R. Wagner, M. C. Sauerland, A. Heinecke, U. Brunnberg, M. Schaich, O. Ottmann, J. Duyster, H. Wandt, T. Fischer, A. Giagounidis, A. Neubauer, A. Reichle, W. Aulitzky, R. Noppeney, I. Blau, V. Kunzmann, R. Stuhlmann, A. Krämer, K.-A. Kreuzer, C. Brandts, B. Steffen, C. Thiede, C. Müller-Tidow, G. Ehninger and W. E. Berdel (2013). "Sorafenib in Combination With Intensive Chemotherapy in Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Randomized, Placebo-Controlled Trial." Journal of Clinical Oncology **31**(25): 3110-3118.
107. Shahbazian, D., A. Parsyan, E. Petroulakis, J. Hershey and N. Sonenberg (2010). "eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by proto-oncogenic signaling pathways." Cell Cycle **9**(20): 4106-4109.
108. Shahbazian, D., P. P. Roux, V. Mieulet, M. S. Cohen, B. Raught, J. Taunton, J. W. B. Hershey, J. Blenis, M. Pende and N. Sonenberg (2006). "The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity." The EMBO Journal **25**(12): 2781-2791.
109. Sherr, C. J., D. Beach and G. I. Shapiro (2016). "TARGETING CDK4 AND CDK6: FROM DISCOVERY TO THERAPY." Cancer discovery **6**(4): 353-367.
110. Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes & Development **13**(12): 1501-1512.
111. Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2017). "Cancer statistics, 2017." CA: A Cancer Journal for Clinicians **67**(1): 7-30.
112. Smith, B. D., M. Levis, M. Beran, F. Giles, H. Kantarjian, K. Berg, K. M. Murphy, T. Dausers, J. Allebach and D. Small (2004). "Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia." Blood **103**(10): 3669.
113. Smith, D. F. and D. O. Toft (2008). "Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions." Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **22**(10): 2229-2240.



114. Spiekermann, K., R. J. Dirschinger, R. Schwab, K. Bagrintseva, F. Faber, C. Buske, S. Schnittger, L. M. Kelly, D. G. Gilliland and W. Hiddemann (2003). "The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3." Blood **101**(4): 1494.
115. Stirewalt, D. L. and J. P. Radich (2003). "The role of FLT3 in haematopoietic malignancies." Nature Reviews Cancer **3**: 650.
116. Stone, R. M., D. J. DeAngelo, V. Klimek, I. Galinsky, E. Estey, S. D. Nimer, W. Grandin, D. Lebowitz, Y. Wang, P. Cohen, E. A. Fox, D. Neuberg, J. Clark, D. G. Gilliland and J. D. Griffin (2004). "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.
117. Sun, C.-y., J.-y. Li, Z.-b. Chu, L. Zhang, L. Chen and Y. Hu (2017). "Efficacy and Safety of Bortezomib Maintenance in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis." Bioscience Reports.
118. Szer, J. (2012). "The prevalent predicament of relapsed acute myeloid leukemia." ASH Education Program Book **2012**(1): 43-48.
119. Takahashi, S. (2011). "Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications." Journal of Hematology & Oncology **4**: 13-13.
120. Takahashi-Yanaga, F. and T. Sasaguri (2008). "GSK-3 $\beta$  regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy." Cellular Signalling **20**(4): 581-589.
121. Tallman, M. S., D. G. Gilliland and J. M. Rowe (2005). "Drug therapy for acute myeloid leukemia." Blood **106**(4): 1154.
122. Tian, X., Y. Xu, J. Yin, H. Tian, S. Chen, D. Wu and A. Sun (2014). "TET2 gene mutation is unfavorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients with NPM1+ and FLT3-ITD- mutations." International Journal of Hematology **100**(1): 96-104.
123. Tobaben, S., P. Thakur, R. Fernández-Chacón, T. C. Südhof, J. Rettig and B. Stahl (2001). "A Trimeric Protein Complex Functions as a Synaptic Chaperone Machine." Neuron **31**(6): 987-999.
124. Tobaben, S., F. Varoqueaux, N. Brose, B. Stahl and G. Meyer (2003). "A Brain-specific Isoform of Small Glutamine-rich Tetratricopeptide Repeat-containing Protein Binds to Hsc70 and the Cysteine String Protein." Journal of Biological Chemistry **278**(40): 38376-38383.
125. Trotta, A. P., E. F. Need, L. A. Selth, S. Chopra, C. B. Pinnock, D. A. Leach, G. A. Coetzee, L. M. Butler, W. D. Tilley and G. Buchanan (2013). "Knockdown of the cochaperone SGTA results in the suppression of androgen and PI3K/Akt signaling and inhibition of prostate cancer cell proliferation." International Journal of Cancer **133**(12): 2812-2823.
126. Walczak, C. P., M. S. Ravindran, T. Inoue and B. Tsai (2014). "A Cytosolic Chaperone Complexes with Dynamic Membrane J-Proteins and Mobilizes a Nonenveloped Virus out of the Endoplasmic Reticulum." PLoS Pathogens **10**(3): e1004007.
127. Wang, Y., Y. Huang, X. Xu, J. Tang, X. Huang, J. Zhu, J. Liu, X. Miao, Y. Wu, F. Yang, L. Ji and S. He (2014). "Expression of small glutamine-rich TPR-containing protein A (SGTA) in Non-Hodgkin's Lymphomas promotes tumor proliferation and reverses cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR)." Leukemia Research **38**(8): 955-963.

128. Whitesell, L. and S. L. Lindquist (2005). "HSP90 and the chaperoning of cancer." Nature Reviews Cancer **5**: 761.
129. Wilhelm, S. M., C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag and P. A. Trail (2004). "BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis." Cancer Research **64**(19): 7099.
130. Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol **6**(2): 93-106.
131. Winkler, I. G., V. Barbier, R. Wadley, A. C. W. Zannettino, S. Williams and J.-P. Lévesque (2010). "Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches." Blood **116**(3): 375.
132. Winnefeld, M., A. Grewenig, M. Schnölzer, H. Spring, T. A. Knoch, E. C. Gan, J. Rommelaere and C. Cziepluch (2006). "Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest." Experimental Cell Research **312**(13): 2500-2514.
133. Wunderley, L., P. Leznicki, A. Payapilly and S. High (2014). "SGTA regulates the cytosolic quality control of hydrophobic substrates." Journal of Cell Science **127**(21): 4728.
134. Xue, Q., L. Lv, C. Wan, B. Chen, M. Li, T. Ni, Y. Liu, Y. Liu, X. Cong, Y. Zhou, R. Ni and G. Mao (2013). "Expression and clinical role of small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein alpha (SGTA) as a novel cell cycle protein in NSCLC." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **139**(9): 1539-1549.
135. Yang, J., J. Wang, K. Chen, G. Guo, R. Xi, P. B. Rothman, D. Whitten, L. Zhang, S. Huang and J.-L. Chen (2013). "eIF4B Phosphorylation by Pim Kinases Plays a Critical Role in Cellular Transformation by  $\text{Abl}$ ;  $\text{Oncogenes}$ ." Cancer Research **73**(15): 4898.
136. Yang, X., L. Cheng, M. Li, H. Shi, H. Ren, Z. Ding, F. Liu, Y. Wang and C. Cheng (2014). "High Expression of SGTA in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Correlates With Proliferation and Poor Prognosis." Journal of Cellular Biochemistry **115**(1): 141-150.
137. Yang, X., S. Liu, S. Kharbanda and R. M. Stone (2012). "AKT1 induces caspase-mediated cleavage of the CDK inhibitor p27Kip1 during cell cycle progression in leukemia cells transformed by FLT3-ITD." Leukemia Research **36**(2): 205-211.
138. Yin, T. and L. Li (2006). "The stem cell niches in bone." Journal of Clinical Investigation **116**(5): 1195-1201.
139. Yosef, R., N. Pilpel, N. Papisov, H. Gal, Y. Ovadya, E. Vadai, S. Miller, Z. Porat, S. Ben-Dor and V. Krizhanovsky (2017). "p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling." The EMBO Journal **36**(15): 2280-2295.
140. Zhang, Q. Y., Q. S. Wei, Xd Fau - Yin, R. H. Yin, Qs Fau - Mi, F. F. Mi, Rh Fau - Yuan, L. Yuan, Ff Fau - Chen and L. Chen (2017). "[Sorafenib in combination with chemotherapy as first-line therapy for FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia]." (0253-2727 (Print)).

141. Zhang, S., S. Fukuda, Y. Lee, G. Hangoc, S. Cooper, R. Spolski, W. J. Leonard and H. E. Broxmeyer (2000). "Essential Role of Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)5a but Not Stat5b for Flt3-Dependent Signaling." The Journal of Experimental Medicine **192**(5): 719-728.
142. Zhu, T., Z. Ji, C. Xu, Z. Peng, L. Gu, R. Zhang and Y. Liu (2014). "Expression and prognostic role of SGTA in human breast carcinoma correlates with tumor cell proliferation." Journal of Molecular Histology **45**(6): 665-677.

## 11. DANKSAGUNG

Als erstes würde ich mich gerne bei Prof. Dr. Robert Oostendorp bedanken, welcher mir damals das Projekt vorstellte und mich mit seiner Begeisterung für die Forschung ansteckte. Er vertraute mir dieses herausfordernde Projekt an und hatte als mein Doktorvater stets ein offenes Ohr für mich.

Ebenfalls möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Dr. Rouzanna Istvánffy, welche ohne Einschränkung jederzeit für mich da war bedanken, ohne sie wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Natürlich danke ich ebenfalls dem gesamten Team der Forschungsgruppen Oostendorp und Götze, unter anderem Prof. Dr. Katharina Götze, Dr. rer. nat. Anne-Kathrin Garz, Charlotta Pagel und noch vielen anderen für die schöne und lehrreiche Zusammenarbeit.

Zuallerletzt geht mein grösster Dank an meine Familie, welche mich stets unterstützt hat.