

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Untersuchungen zur Rolle der Rezeptortyrosinkinasen FLT3, DDR1 und DDR2
in der akuten myeloischen Leukämie**

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



vorgelegt von
Verena Weth
aus Schweinfurt

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Torsten Haferlach

Priv.-Doz. Dr. Irmela Jeremias

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2015

Eidesstattliche Versicherung

Weth, Verena

.....
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Untersuchungen zur Rolle der Rezeptortyrosinkinasen FTL3, DDR1 und DDR2
in der akuten myeloischen Leukämie“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 16.12.2014

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift Doktorand/Doktorandin

Für Waltraud

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute myeloische Leukämie	1
1.2	Pathogenese der AML	3
1.3	Rezeptortyrosinkinasen	3
1.3.1	FLT3	5
1.3.2	DDR1 und DDR2	8
1.4	NPM1	11
1.5	NPM1 und FLT3 in der AML mit normalem Karyotyp	13
2	Zielsetzung der Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Laboraausstattung	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
3.1.3	Chemikalien	18
3.1.4	Puffer und Lösungen	20
3.1.5	Kits	22
3.1.6	Plasmide	23
3.1.7	Oligonukleotide	25
3.1.8	Enzyme	29
3.1.9	Antikörper	29
3.1.10	Bakterienstämme	31
3.1.11	Zelllinien	31
3.1.12	Medien und Zusätze	32
3.1.13	Inhibitoren und Zytostatika	34
3.1.14	Software & Datenbanken	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Zellbiologische Methoden	35
3.2.1.1	Zellkulturbedingungen	35
3.2.1.2	Mediumwechsel und Subkultivierung von Monolayerkulturen	35
3.2.1.3	Mediumwechsel und Subkultivierung von Suspensionskulturen	35
3.2.1.4	Nachweis von Mykoplasmen	36
3.2.1.5	Kryokonservierung und Lagerung von Zellen	36

3.2.1.6	Auftauen von Zellen	37
3.2.1.7	Trypanblaufärbung und Zellzahlbestimmung	37
3.2.1.8	Transfektion.....	37
3.2.1.9	Bestimmung des Lentivirustiter	40
3.2.1.10	Transduktion.....	40
3.2.1.11	Sortieren der Zellen mittels FACS.....	41
3.2.1.12	Klonierung von Zellen mittels FACS (Einzelzellsortierung).....	42
3.2.1.13	Test auf Lentivirenfreiheit	42
3.2.1.14	Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie	42
3.2.1.15	Proliferationsexperimente	43
3.2.1.16	Kurzzeit-Apoptose Assay	44
3.2.1.17	Apoptose-Test mit Annexin-V und 7-AAD-Färbung	45
3.2.1.18	Hungern und Stimulation der Zellen vor der Zellyse.....	46
3.2.1.19	Adhäsionsverhalten der Zellen bei Anwesenheit von Kollagen	47
3.2.1.20	Dual-Luciferase® Reporter (DLR) Assay System	47
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	48
3.2.2.1	Herstellung von Ganzzelllysaten	48
3.2.2.2	Herstellung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinlysaten.....	49
3.2.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	49
3.2.2.4	Immunpräzipitation.....	49
3.2.2.5	SDS-PAGE (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>).....	50
3.2.2.6	Western Blot.....	51
3.2.2.7	Protein-Detektion.....	51
3.2.2.8	Strippen der Nitrocellulosemembran.....	51
3.2.2.9	Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA)	52
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	52
3.2.3.1	Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen	52
3.2.3.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	52
3.2.3.3	Chemische Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	53
3.2.3.4	Präparation von Plasmid-DNA.....	53
3.2.3.5	Agarosegel-Elektrophorese	54
3.2.3.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	54
3.2.3.7	Restriktionsverdau von DNA	54
3.2.3.8	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren	55
3.2.3.9	Blunting von DNA-Fragmenten und ihre Ligation	56
3.2.3.10	Ligation von DNA-Fragmenten	56

3.2.3.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	56
3.2.3.12	Colony-PCR	58
3.2.3.13	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	59
3.2.3.14	Ortsgerichtete Mutagenese	59
3.2.3.15	Sequenzierung.....	60
3.2.3.16	Lösen von lyophilisierter Plasmid-DNA und von Plasmid-DNA aus Filterpapier	60
3.2.3.17	Isolierung von mRNA aus Zellen.....	60
3.2.3.18	Synthese von komplementärer DNA (cDNA).....	60
3.2.3.19	Schmelzkurvenanalyse	61
3.2.3.20	Fragmentlängenanalyse	61
3.2.4	Erhebung von Genexpressionsdaten.....	62
3.2.4.1	RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) von monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien ..	62
3.2.4.2	Genexpressionsanalyse von <i>NPM1</i> -mutierten AML-Patientenproben mit normalem Karyotyp in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses von <i>FLT3</i>	63
3.2.4.3	Expressionsanalyse von <i>DDR1</i> und <i>DDR2</i> in AML-Patientenproben.....	64
3.2.5	<i>In vivo</i> Arbeiten	64
3.2.5.1	<i>In vivo</i> Modell.....	65
3.2.5.2	Probenvorbereitung und Applikation der Zellen.....	65
3.2.5.3	Isolierung von Zellen aus Knochenmark, Milz und Leber.....	65
3.2.5.4	Nachweis humaner Zellen mittels Durchflusszytometrie	66
3.2.5.5	<i>In vivo</i> Bildgebung	66
3.2.6	Statistik.....	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Untersuchung der funktionellen Interaktion von <i>NPM1</i>- und <i>FLT3</i>-ITD- Mutationen in der AML	67
4.1.1	Etablierung des zellulären Modellsystems.....	67
4.1.1.1	Optimierung des lentiviralen Transduktionsprotokolls.....	67
4.1.1.2	Herstellung transgener OCI-AML3 Zelllinien	69
4.1.2	Überprüfung des zellulären Modellsystems.....	70
4.1.2.1	Bestätigung der <i>NPM1</i> -Mutation A in den OCI-AML3.....	70
4.1.2.2	Nachweis der stabilen FLT3-Proteinexpression	72
4.1.2.3	Konstitutive Aktivierung des FLT3-ITD-Rezeptors	73
4.1.2.4	Aktivierung des STAT5-Signalwegs durch <i>FLT3</i> -ITD-Mutationen	74
4.1.2.5	Keine Veränderung des Immunphänotyps der OCI-AML3 durch die Transduktion..	75
4.1.2.6	Konstantes ITD/WT-Verhältnis in den monoklonalen Zelllinien	76
4.1.3	Charakterisierung der <i>FLT3</i> -ITD im <i>NPM1</i> -mutierten Hintergrund.....	76

4.1.3.1	Keine Wachstumsunterschiede bei Spontanproliferation nach 72 Stunden	76
4.1.3.2	Kompetitiver Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien bei Langzeitproliferation <i>in vitro</i>	78
4.1.3.3	Kompetitiver Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen bei Proliferation <i>in vivo</i>	83
4.1.3.4	Apoptoseverhalten unbehandelter und behandelter OCI-AML3 Zelllinien	86
4.1.3.5	Genexpressionsanalyse in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses.....	87
4.2	Transkriptionelle Regulation des <i>FLT3</i>-Promotors	91
4.2.1	Identifizierung von hämatopoetischen <i>FLT3</i> -Transkriptionsfaktoren.....	91
4.2.2	PAX5 als schwacher Repressor, MYB als starker Aktivator des <i>Flt3</i> -Promotors	91
4.2.3	CEBPA als Regulator des <i>Flt3</i> -Promotors	94
4.3	Funktionelle Charakterisierung von Mutationen in den Rezeptortyrosinkinasen <i>DDR1</i> und <i>DDR2</i> in der AML	97
4.3.1	Stabile Expression wildtypischer und mutierter <i>DDR1</i> - bzw. <i>DDR2</i> -Rezeptoren in Ba/F3	97
4.3.2	Kein onkogenes Zellwachstumspotential <i>DDR</i> -exprimierender Ba/F3	99
4.3.3	Transiente Expression wildtypischer und mutierter <i>DDR1</i> - bzw. <i>DDR2</i> -Rezeptoren in HEK-293T	100
4.3.4	Aktivierungskinetik wildtypischer und mutierter <i>DDR1</i> - bzw. <i>DDR2</i> -Rezeptoren	101
4.3.5	Adhäsionsverhalten von humanen Leukämie-Zelllinien und <i>DDR</i> -exprimierenden Ba/F3	104
4.3.6	Endogene <i>DDR1</i> -Proteinexpression in K-562	106
4.3.7	Herunterregulierte Expression von <i>DDR1</i> und <i>DDR2</i> in der AML	106
4.3.8	Geplante Experimente.....	108
5	Diskussion	109
5.1	Funktionelle Interaktion von <i>NPM1</i>- und <i>FLT3</i>-ITD-Mutationen in der AML.....	109
5.1.1	Aufbau des Zellmodells und Verifizierung der Funktionalität.....	109
5.1.2	Analyse des Proliferationsverhaltens.....	110
5.1.2.1	Proliferationsvorteil <i>FLT3</i> -ITD-exprimierender OCI-AML3 <i>in vitro</i>	110
5.1.2.2	Proliferationsvorteil <i>FLT3</i> -ITD-exprimierender OCI-AML3 <i>in vivo</i>	112
5.1.3	Apoptoseverhalten bei Therapie.....	113
5.1.4	Genexpressionsanalyse in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses.....	114
5.1.5	Alternative Modelle.....	115
5.1.6	Interaktionen von Mutationen bei der Pathogenese der AML	118
5.2	Transkriptionelle Regulation der <i>FLT3</i>-Expression	119

5.3	Funktionelle Charakterisierung von <i>DDR</i>-Mutationen in der AML.....	121
5.3.1	DDR-Expression und <i>DDR</i> -Mutationen in der AML.....	121
5.3.2	Evaluierung des transformierenden Potentials der <i>DDR</i> -Mutationen.....	123
5.3.3	Weitere Charakterisierung der <i>DDR</i> -Mutationen: Zelladhäsion.....	124
5.3.4	Aktivierungskinetik wildtypischer und mutierter <i>DDR</i> -Rezeptoren.....	125
6	Ausblick.....	128
7	Zusammenfassung	130
8	Abstract.....	132
9	Verzeichnisse.....	133
9.1	Literaturverzeichnis	133
9.2	Abbildungsverzeichnis	150
9.3	Tabellenverzeichnis	152
9.4	Abkürzungsverzeichnis	153
10	Danksagung.....	163

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Leukämie ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der hämatopoetische Vorläuferzellen aufgrund einer malignen Transformation ihre Fähigkeit zur Ausreifung in funktionsfähige Blutzellen (Differenzierung) verloren haben. Dadurch kommt es zur unkontrollierten, klonalen Expansion dieser nicht funktionsfähigen, unreifen Vorläuferzellen, den Blasten. Als Folge akkumulieren die Blasten vor allem im Knochenmark, aber auch im Blut und den lymphatischen Organen. Dadurch wird die physiologische Blutbildung von Erythrozyten, Thrombozyten und funktionstüchtigen, reifen Leukozyten im Knochenmark verdrängt. Infolge der Knochenmarkinsuffizienz leiden die Patienten an Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie, was zu Störungen der Sauerstoffversorgung, der Blutgerinnung und der Immunabwehr führt [1].

Eine akute myeloische Leukämie (AML) liegt vor, wenn die entarteten Zellen den myeloischen Zellreihen entstammen und mindestens 20% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark nachgewiesen werden können [2]. Akute Leukämien entwickeln sich kurzfristig, innerhalb weniger Wochen und enden ohne sofortige Therapie binnen kurzer Zeit tödlich [1]. Von den akuten Leukämien unterscheidet man chronische Leukämien, die schleichend verlaufen und über Monate bis Jahre relativ symptomarm verlaufen können [3]. Außerdem kann neben der Myelopoese auch die Lymphopoese betroffen sein. Dann spricht man von einer lymphatischen Leukämie [4].

Nach einer Prognose des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. zufolge werden für das Jahr 2014 in Deutschland 12.100 Leukämie-Neuerkrankungen erwartet. Das entspricht 2,4% aller Krebsneuerkrankungen. Circa ein Viertel aller Leukämieerkrankungen entfällt dabei auf die AML. Nur die chronische lymphatische Leukämie (CLL) zeigt mit 34-40% einen größeren Anteil [5]. Unter den akuten Leukämien ist die AML die häufigste Form im Erwachsenenalter. Ihre Inzidenz nimmt mit steigendem Alter zu [6]. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 67 Jahren [7].

Die AML ist sowohl genetisch als auch klinisch eine sehr heterogene Erkrankung [8]. Deshalb stützt sich die Diagnose und die Einteilung der AML heute auf das Zusammenspiel mehrerer Diagnoseverfahren. Anhand der zytomorphologischen und zytochemischen Beurteilung von Blut- und Knochenmarkausstrichen sowie der Immunphänotypisierung der Zellen lässt sich über den Reifegrad der Blasten und ihre Linienzugehörigkeit urteilen. Basierend auf der Zytomorphologie und Zytochemie teilt die FAB- (*French-American-British*-) Klassifizierung die AML in die Subtypen M0-M7 ein [9-11]. Die WHO (*World Health Organization*) bezieht zur Klassifizierung neben Ergebnissen aus morphologischen, zytochemischen und immunologischen Verfahren vor allem Befunde zytogenetischer Untersuchungen (Chromosomenanalyse und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) ein und berücksichtigt somatische Mutationen aus molekulargenetischen Analysen sowie klinische Merkmale. Die WHO teilt myeloische Neoplasien und akute Leukämien in acht Hauptgruppen ein, darunter die Gruppe der „akuten myeloischen Leukämie und verwandte Neoplasien“ [2].

Neben prognostischen Kriterien wie Alter und Leukozytenzahl [12], stellt der Karyotyp der leukämischen Zellen den wichtigsten prognostischen Parameter hinsichtlich Therapieerfolg und Überleben der Patienten dar [13-16]. Anhand von zytogenetischen und molekulargenetischen Markern lassen sich gemäß des *European LeukemiaNet* (ELN) vier prognostische Risikogruppen bilden, die sich hinsichtlich ihres Überlebens deutlich voneinander unterscheiden: „günstig“, „intermediär-I“, „intermediär-II“ und „ungünstig“ (siehe Tabelle 1) [12]. So zeigen Patienten der günstigen Gruppe ausgehend von der Diagnosestellung ein Zehn-Jahres-Überleben von 68-71%,

während in der ungünstigen Gruppe nach zehn Jahren nur noch 2-11% der Patienten leben [17]. Die prognostisch günstige Risikogruppe enthält neben den *core binding factor* (CBF) Leukämien (t(8;21), inv(16), t(16;16)) auch die akute Promyelozytenleukämie (APL) mit der Translokation t(15;17). Dahingegen finden sich in der ungünstigen Risikogruppe vor allem unbalancierte zytogenetische Aberrationen und komplexe Karyotypen [12, 18].

Tabelle 1: Prognostische Risikogruppen nach der ELN-Klassifikation. Anhand der Zytogenetik und Molekulargenetik unterscheidet die ELN-Klassifikation vier prognostische Gruppen [12].

Prognostische Risikogruppe	Charakteristika
Günstig	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> -Mutation ohne <i>FLT3</i> -ITD (normaler Karyotyp) <i>CEBPA</i> -Mutation (normaler Karyotyp)
Intermediär-I	<i>NPM1</i> -Mutation mit <i>FLT3</i> -ITD (normaler Karyotyp) <i>NPM1</i> -Wildtyp mit <i>FLT3</i> -ITD (normaler Karyotyp) <i>NPM1</i> -Wildtyp ohne <i>FLT3</i> -ITD (normaler Karyotyp)
Intermediär-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> zytogenetische Aberrationen, die weder als günstig noch als ungünstig klassifiziert sind
Ungünstig	inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> -Rearrangement -5 oder del(5q); -7; abnl(17p); komplexer Karyotyp

abnl: abnormal, del: Deletion, inv: Inversion, ITD: *internal tandem duplication*, t: Translokation, v: variabel

Das Erreichen einer kompletten Remission (weniger als 5% Blasten im Knochenmark) nach der Induktionstherapie ist für den Therapieerfolg entscheidend. Die Induktionstherapie bezeichnet die erste Behandlungsphase. Zyto- sowie molekularbiologische Veränderungen beeinflussen das Therapieansprechen der Patienten und nehmen dadurch Einfluss auf die Wahl der Therapie [12]. Während Patienten der günstigen Gruppe gut auf die Standard-Chemotherapie ansprechen¹, sollten Patienten der ungünstigen Gruppe aufgrund der hohen Rezidivrate nach Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen werden [12].

Obwohl heute bereits mehr als 50 rekurrente Chromosomenaberrationen in der AML bekannt sind [19, 20], weist etwa die Hälfte aller AML-Patienten einen normalen Karyotyp auf [16, 21, 22]. AML-Patienten mit normalem Karyotyp (NK-AML) werden überwiegend der intermediären Gruppe zugeordnet [12], welche hinsichtlich des molekulargenetischen Profils und des klinischen Verlaufs eine sehr heterogene Gruppe ist [23]. In dieser großen Gruppe von AML-Patienten mit normalem Karyotyp ist man auf Genmutationen als prognostische Marker angewiesen. Eine Vielzahl an molekulargenetischen Aberrationen ist bisher in der AML bekannt, jedoch ist nur von wenigen die prognostische Bedeutung definiert. Als prognostisch relevante molekulare Mutationen in der AML mit normalem Karyotyp haben vor allem Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase *FLT3*², im

¹ Erreichen der Blasten-Clearance (<5% Blasten) an Tag 16 nach Therapiebeginn

² *fibroblast-macrophage stimulating factor receptor (FMS)-related tyrosine kinase 3*

nukleolären Phosphoprotein NPM1³, im Transkriptionsfaktor CEBPA⁴ [24, 25] und partielle Tandemduplikationen in der Histon-Methyltransferase MLL⁵ in der Routinediagnostik Einzug gehalten. Während sich *NPM1*- und *CEBPA*-Mutationen als prognostisch günstig erwiesen haben [26, 27], ist die häufigste Mutation des *FLT3*-Gens, eine *internal tandem duplication* (ITD), prognostisch ungünstig [28]. *FLT3* und *NPM1* stellen die am häufigsten mutierten Gene in der AML dar [29].

1.2 Pathogenese der AML

In den letzten 15 Jahren gelangen entscheidende Fortschritte bei der Aufklärung der Pathogenese der AML durch die Identifikation zahlreicher rekurrenter chromosomaler Veränderungen und Genmutationen sowie abweichender Genexpressionslevel [14, 30-33]. Es wurden unter anderem Mutationen in Genen entdeckt, die bei der Regulierung der DNA-Methylierung eine Rolle spielen (*DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*) [29, 34]. 44% aller AML-Patienten zeigen Mutationen in diesen Genen [29]. Aufgrund der raschen Weiterentwicklung neuer Sequenzieretechniken (*Next Generation Sequencing*) erweitert sich das Spektrum molekularer Mutationen noch immer.

Zweifelsfrei benötigt es zur Entstehung einer akuten Leukämie mehr als ein singuläres genetisches Ereignis. Dies konnte in diversen Mausmodellen gezeigt werden [35-38]. Man geht deshalb vom „2-Hit“-Modell der Leukämogenese aus. Dieses besagt, dass mindestens zwei genetische Alterationen zusammenspielen müssen, um eine Leukämie hervorzurufen. Dabei muss eine aktivierende Mutation im Rezeptortyrosinkinase-Signalweg (z.B. *RAS*, *FLT3*, *c-KIT*) den hämatopoetischen Vorläuferzellen einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil verschaffen (Klasse I Mutationen). Gleichzeitig muss eine andere Mutation oder eine Genfusion einen hämatopoetischen Transkriptionsfaktor betreffen (z.B. *PML/RARA*, *AML1/ETO*, *CEBPA*; Klasse II Mutationen) und die Differenzierung bzw. die Apoptose der hämatopoetischen Vorläuferzellen unterbinden [39, 40]. Rezeptortyrosinkinasen spielen somit eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AML.

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) sind Enzyme aus der Familie der Proteinkinasen [41], die den reversiblen Übertrag des energiereichen γ -Phosphats von Adenosintriphosphat (ATP) an die Hydroxylgruppe von Tyrosinen ihrer Substratproteine katalysieren und diese aktivieren [42]. RTKs übertragen Signale ins Zellinnere und regulieren dadurch eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Stoffwechsel, Migration und Zellzykluskontrolle [43].

Es sind 58 humane RTKs bekannt [44]. Etwas mehr als die Hälfte davon ist aufgrund genetischer Veränderungen an der Entstehung maligner Tumore beteiligt [45]. Vor allem sind RTKs der Klasse III häufig in hämatologischen Tumoren mutiert. Zum Beispiel sind Punktmutationen im *KIT*- und im *CSF1R*-Gen in der AML, chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) und im myelodysplastischen Syndrom (MDS) beschrieben. In der AML treten außerdem Deletionen in *KIT* auf. Punktmutationen und Insertionen von *FLT3* kommen in der AML und im MDS vor [46-48].

³ Nukleophosmin

⁴ *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*

⁵ *mixed lineage leukemia*

RTKs sind transmembranöse Rezeptoren [45] mit ähnlichem Aufbau. Extrazellulär besitzen die RTKs eine Ligandbindedomäne. Ihrer transmembranösen (TM-) Domäne, die die Membran einmal durchspannt und sie darin verankert, folgen intrazellulär eine juxtamembranöse (JM-) Domäne, die Tyrosinkinasedomäne (TKD) und ein C-terminaler Bereich [49]. Anhand des Aufbaus der extrazellulären Domäne [50] und der Sequenz der Kinase-Domäne lassen sich die RTKs in 20 Unterfamilien einteilen [44]. Die für diese Arbeit relevanten RTKs gehören zur Klasse III (FLT3) [51] oder zur Klasse XIII (DDR1, DDR2) [46] der Rezeptortyrosinkinasen. Diese beiden Klassen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Das Besondere am Aufbau der Klasse III der RTKs sind die fünf Immunoglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen der extrazellulären Domäne sowie die zytoplasmatische TKD, die durch ein Insert geteilt ist [52]. Bei den DDRs (*discoidin domain receptors*) besteht der extrazelluläre Bereich aus einer N-terminalen Discoidin-Domäne, gefolgt von einer Discoidin-ähnlichen Domäne. Der TM-Domäne schließt sich eine ungewöhnlich lange intrazelluläre JM-Domäne an. DDRs haben neben einer intrazellulären auch eine extrazelluläre JM-Domäne. Der intrazellulären JM-Domäne folgt eine Kinasedomäne und schließlich ein sehr kurzes C-terminales Ende [53].

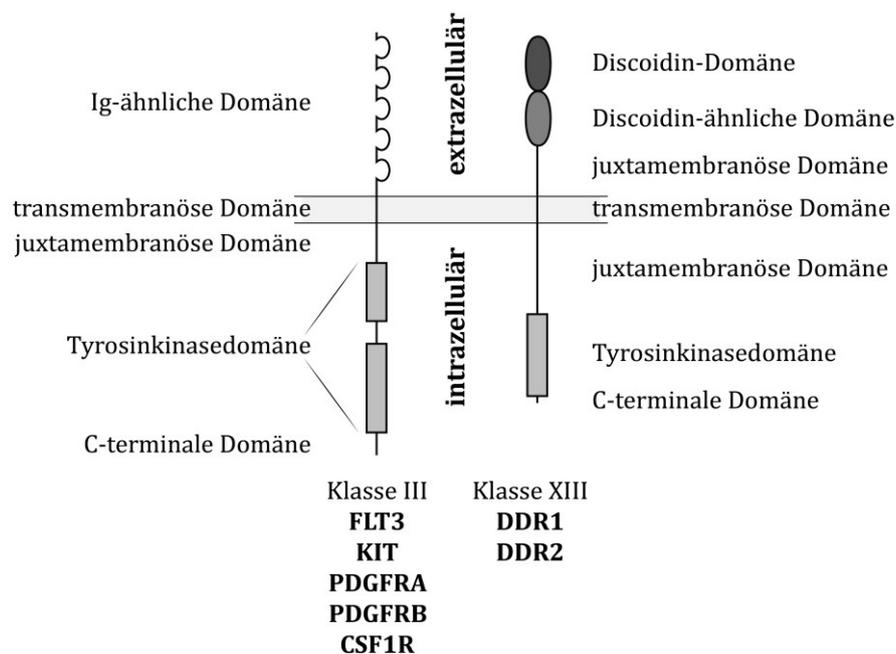


Abbildung 1: Aufbau der Klasse III und Klasse XIII der Rezeptortyrosinkinasen. Dargestellt sind jeweils Rezeptormonomere. Zur Klasse III gehören neben FLT3 auch KIT, PDGFRA, PDGFRB und CSF1R [44]. Zur Klasse XIII gehören ausschließlich DDR1 und DDR2 [46]. CSF1R: *colony stimulating factor 1 receptor*; DDR1/2: *discoidin domain receptor tyrosine kinase 1/2*; FLT3: *FMS-related tyrosine kinase 3*; KIT: Stammzellfaktor-Rezeptor; PDGFRA/B: *platelet-derived growth factor receptor alpha/beta*

Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität von RTKs streng reguliert. In Abwesenheit ihres spezifischen Liganden liegen RTKs in einer inaktiven Konformation, in den meisten Fällen als Monomere, in der Membran lokalisiert vor [54]. Erst nach Ligandbindung kommt es zur Dimerisierung der Rezeptormoleküle [55] und anschließender Transphosphorylierung von Tyrosinen am zytoplasmatischen Teil des Rezeptors [54]. Infolge dessen erlangt der Rezeptor seine aktive Konformation und kann seine enzymatische Aktivität ausführen. Die Rekrutierung und gezielte Bindung von zytoplasmatischen Signalproteinen an phosphorylierte Tyrosine, als Teil spezifischer Erkennungsmotive am Rezeptor, setzt schließlich die Signaltransduktion in Gang [54]. Nach der

Aktivierung werden die Ligand-Rezeptor-Komplexe endozytotisch internalisiert. Sie werden dann entweder proteolytisch abgebaut oder wieder zurück an die Zelloberfläche gebracht (recycelt) [56]. Die Kinasedomäne der RTKs ist hochkonserviert [57] und weist drei charakteristische Strukturen auf: die Aktivierungsschleife, die ATP-Bindetasche und die katalytisch aktive Kinaseschleife. Im inaktiven Zustand blockieren die Aktivierungsschleife und die JM-Domäne sterisch die ATP-Bindetasche. Erst durch die Phosphorylierung des Tyrosins in der Aktivierungsschleife im aktiven Zustand erlangt die Kinase ihre katalytisch aktive Konformation [54].

1.3.1 FLT3

Der FLT3-Rezeptor wird hauptsächlich auf hämatopoetischen Stammzellen sowie frühen myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen exprimiert [58, 59] und ist bei der Proliferation, Differenzierung und Überleben dieser Zellen von Bedeutung [51, 59-61]. Mit zunehmender Differenzierung der Zellen geht die FLT3-Expression verloren [59]. AML-Blasten zeigen häufig eine FLT3-Überexpression [58, 62]. FLT3 ist an der malignen Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen zu AML-Blasten in verschiedener Weise beteiligt. Zum einen spielt die autokrine Stimulierung von FLT3 durch seinen Liganden eine Rolle [63]. Der FLT3-Ligand (FL), ein Wachstumsfaktor [64], und der FLT3-Rezeptor werden häufig zusammen auf leukämischen Zellen exprimiert [63]. Da FL nachgewiesenermaßen anti-apoptotische, überlebensfördernde und pro-proliferative Effekte auf primäre AML-Zellen ausübt, spielt die autokrine FLT3-Aktivierung durch den FL eine gewisse, wenn auch keine ursächliche Rolle in der Entstehung von akuten Leukämien [65]. Eine bedeutendere Rolle spielt die Überexpression des FLT3-Rezeptors auf leukämischen Blasten. Bei 75-100% aller AML- und ALL-Patienten zeigen Blasten hohe FLT3-Expressionslevel [62, 66, 67]. Eine im Vergleich zu normalem Knochenmark erhöhte FLT3-Expression konnte sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene bei AML-Patienten und akuten Leukämien generell nachgewiesen werden [62]. Zudem wurde eine signifikante Korrelation zwischen der *FLT3*-Expression und dem Anteil myeloischer Blasten sowie der Leukozytenzahl gezeigt [68]. Die Überexpression des FLT3-Rezeptors auf leukämischen Blasten kann deren Überleben und Proliferation erhöhen. Die größte Rolle bei der malignen Transformation durch FLT3 spielen jedoch aktivierende Mutationen im *FLT3*-Gen. Man unterscheidet zwei Arten aktivierender Mutationen: Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinasedomäne (*FLT3*-TKD-Mutationen; *FLT3*-TKDs) und *internal tandem duplications* (*FLT3*-ITDs) in der JM-Domäne [69]. Etwa 7% der AML-Patienten weisen eine *FLT3*-TKD-Mutation auf [70-72]. Am häufigsten ist die Asparaginsäure an Codonposition 835 gegen ein Tyrosin ausgetauscht [72, 73]. *FLT3*-TKDs stören die Autoinhibition der Kinase [74] und führen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors [75].

Die Mehrheit der *FLT3*-Mutationen stellen die *FLT3*-ITD-Mutationen, auch *FLT3*-Längenmutationen (LM) genannt, dar. *FLT3*-ITDs treten bei 20-25% der AML-Patienten auf [28, 39, 71, 76-78]. Das macht sie zur zweithäufigsten Mutation in der adulten AML [79]. In der Gruppe der AML-Patienten mit normalem Karyotyp liegt die Häufigkeit von *FLT3*-ITD-Mutationen mit bis zu 38% noch höher [80]. *FLT3*-ITDs entstehen durch die Duplikation eines Fragmentes vor allem der JM-Domäne, das unter Aufrechterhaltung des Leserahmens und unter Beibehaltung der ursprünglichen Orientierung in die Originalsequenz integriert wird [81]. Die Länge des duplizierten Fragmentes variiert zwischen drei und mehr als 400 Basenpaaren [77]. Zur Aufrechterhaltung des Leserahmens werden in manchen Fällen zusätzliche Nukleotide eingefügt [77]. Abbildung 2 stellt beispielhaft verschiedene *FLT3*-ITDs dar.

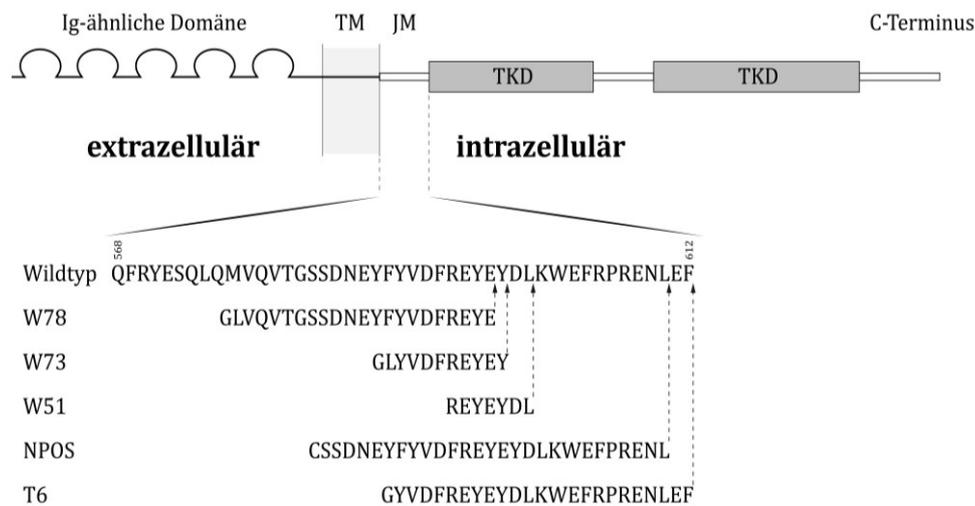


Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung verschiedener FLT3-ITDs. Der FLT3-Rezeptor ist schematisch dargestellt. Die Aminosäuresequenz der juxtamembranösen (JM-) Domäne und die Lokalisation verschiedener FLT3-ITDs sind eingezeichnet. Abbildung nach Kelly *et al.* [37]. Ig: Immunoglobulin; TKD: Tyrosinkinasedomäne; TM: transmembranöse Domäne

Der JM-Domäne kommt im inaktiven Zustand des FLT3-Rezeptors eine autoinhibitorische Funktion zu, welche durch die von der FLT3-ITD hervorgerufenen konformativen Veränderung der JM-Domäne gestört wird [69]. Da FLT3 dann auch in Abwesenheit seines Liganden seine katalytisch aktive Konformation einnimmt [69], resultiert daraus die konstitutive Aktivierung des Rezeptors [82]. Die Konsequenz hieraus ist die konstitutive Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) und AKT [83-85], die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Differenzierung, Proliferation und Überleben spielen [85, 86]. In FLT3-Wildtyp-(FLT3-WT)-Zellen wird durch FL-Bindung an den Rezeptor nur MAPK und AKT aktiviert [84, 87]. Nur in Zellen, die eine FLT3-ITD exprimieren, nicht aber in mit FL stimulierten FLT3-WT-Zellen, findet eine Phosphorylierung von STAT5 statt [88]. Der Grund hierfür bleibt nach wie vor umstritten. Während manche Studien von einer Januskinase-vermittelten STAT5-Aktivierung sprechen [89, 90], berichtet eine andere Studie, dass STAT5 ein direktes Ziel der FLT3-ITD darstellt und direkt von der mutierten Kinase phosphoryliert wird [83]. Der STAT5-Signalweg ist jedenfalls für das transformierende Potential der FLT3-ITD essentiell [91]. Phosphoryliertes STAT5 bildet Dimere und wandert in den Nukleus, wo es die Transkription der anti-apoptischen Proteine Bcl-xL und Pim1 sowie die pro-proliferativen Proteine Cyclin D1 und c-Myc einleitet [92]. Verschiedene Zelllinien zeigen infolge der Aktivierung von STAT5 durch FLT3-ITD-Mutationen Ligand-unabhängige Zellproliferation [84, 85, 87]. Für die STAT5-Aktivierung, das transformierende Potential aktivierender FLT3-ITD-Mutationen und die FL-vermittelte Aktivierung des FLT3-Wildtyp-Rezeptors wurden Arginin 595 [93], sowie die Tyrosine an Position 589 und 591 (Y589, Y591) [94] als kritische Aminosäuren identifiziert.

Klinisch sind FLT3-ITD-Mutationen mit einer schlechten Prognose assoziiert [28, 95]. Nur 30-40% der NK-AML-Patienten mit FLT3-ITD können geheilt werden [96]. Bei diesen Patienten finden sich zum Diagnosezeitpunkt erhöhte Leukozytenzahlen und ein hoher prozentualer Blastenanteil im peripheren Blut und im Knochenmark [95]. Dies sind Faktoren, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Erwachsene NK-AML-Patienten (<60 Jahre) mit einer FLT3-ITD zeigen im Vergleich zu Patienten mit FLT3-WT ein kürzeres Gesamt- [80, 95] und Rezidiv-freies Überleben [80] sowie eine kürzere Remissionsdauer [95] was mit einer höheren Rezidivrate bei FLT3-ITD-positiven Patienten einhergeht [97, 98].

Nicht nur das Vorkommen einer *FLT3*-ITD *per se*, sondern besonders das Allelverhältnis von *FLT3*-ITD und *FLT3*-WT ist von prognostischer Bedeutung [71]. Die *FLT3*-ITD-Last wird dabei als das Verhältnis von mutiertem Allel zu wildtypischem Allel angegeben [71, 99]. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fragmentlängenanalyse [71]. Es wurde mehrfach gezeigt, dass AML-Patienten ein heterogenes Allelverhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT aufweisen. Das Spektrum reicht dabei von einem geringen Anteil an mutiertem Allel bis zum Verlust des Wildtyp-Allels [71, 77, 100]. Verschiedene Allelverhältnisse von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT sind in Abbildung 3 dargestellt.

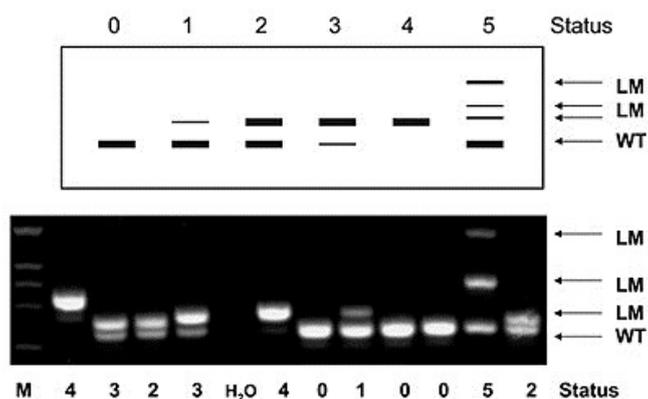


Abbildung 3: Darstellung verschiedener Allelverhältnisse von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT. Die Analyse von amplifizierten *FLT3*-Fragmenten in einer Arbeit von Schnittger *et al.* zeigte auf Agarosegelen unterschiedliche Bandenintensitäten von *FLT3*-WT und *FLT3*-ITD [100]. 0: nur *FLT3*-WT; 1: *FLT3*-ITD-Subklon in einer sonst *FLT3*-ITD-negativen Blastenpopulation; 2: gleiche Menge an wildtypischem und mutiertem *FLT3*-Allel; 3: Verlust des Wildtyps in einem Subklon; 4: kompletter *FLT3*-WT-Verlust; 5: zwei unterschiedliche *FLT3*-ITDs in unterschiedlichen Klonen. LM: Längenmutation; WT: Wildtyp; M: Marker

Patienten mit komplettem Verlust des *FLT3*-WT-Allels oder mit hoher *FLT3*-ITD-Last haben ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben sowie eine höhere Rezidiv-Wahrscheinlichkeit als Patienten, die nur Träger des Wildtyp-Allels sind oder die ein niedriges Verhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT aufweisen [28, 71, 101]. Die Prognose der Patienten wird also mit ansteigendem Verhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT schlechter. Des Weiteren haben Patienten mit einem hohen Verhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT höhere Leukozytenwerte und Blastenzahlen im peripheren Blut [71]. Der teilweise oder vollständige Verlust des Wildtyp-Allels (Verlust der Heterozygotie) tritt zum Zeitpunkt der Diagnose bei 6% bis einem Drittel der AML-Patienten mit einer *FLT3*-ITD auf [28, 100, 102]. Er ist die Folge einer erworbenen uniparentalen Disomie, die entweder durch die somatische Rekombination homologer Chromosomen nach Erwerb einer *FLT3*-ITD oder durch den Verlust des Chromosoms 13 mit wildtypischem *FLT3*-Allel und anschließender Duplikation des homologen Chromosoms mit *FLT3*-ITD entsteht [103, 104]. Im ersten Fall kommt es zum teilweisen, im zweiten Fall zum vollständigen Verlust des *FLT3*-Wildtyp-Allels. Zudem ist die AML eine klonale Erkrankung, bei der mehr als die Hälfte neben einem Gründerklon mindestens einen Subklon aufweisen [29]. Alle Blasten enthalten gemeinsame somatische Mutationen, die den klonalen Ursprung der Erkrankung widerspiegeln (Gründerklon). Subpopulationen, in denen zusätzliche Mutationen vorhanden sind, werden als Subklone definiert [105, 106]. Diese Tatsache nimmt ebenfalls Einfluss auf das Verhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT, je nachdem in welchem Klon die Mutation vorkommt. Darüber hinaus kann sich der Mutationsstatus einer *FLT3*-ITD zwischen Diagnose und Rezidiv ändern [100]. Gelegentlich zeigen Patienten mit *FLT3*-WT bei Erstdiagnose im Rezidiv eine *FLT3*-ITD. Patienten mit einer *FLT3*-ITD zum Zeitpunkt der Diagnosestellung können zusätzliche oder andere *FLT3*-ITDs entwickeln oder haben im Rezidiv ihre *FLT3*-ITD verloren [100,

107-109]. Nicht selten haben *FLT3*-ITD positive Patienten mehr als eine *FLT3*-ITD (16,5-23%) [71, 101, 102]. Regelmäßig beobachtet wird ein sich änderndes Allelverhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT im Krankheitsverlauf [100]. Generell ist die *FLT3*-ITD-Last im Rezidiv eher höher als bei Diagnose [100, 109]. All diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass *FLT3*-ITD-Mutationen sekundäre (nicht initiale) genetische Ereignisse sind, die dem Klon, in dem sie vorkommen, einen Proliferationsvorteil geben [100, 108].

Aufgrund des häufigen Vorkommens von aktivierenden *FLT3*-Mutationen und ihrer wichtigen Rolle in der Pathogenese der AML, stellt *FLT3* ein bedeutendes Therapieziel in der AML dar. *FLT3*-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) werden zur gezielten Inhibition einer onkogenen *FLT3*-Kinase und deren Signalübertragung in präklinischen und klinischen Studien getestet [110]. Die *FLT3*-TKIs bewirken eine Reduktion der Blasten [111], aber nur bei wenigen Patienten konnte eine komplette oder dauerhafte Remission bei alleiniger Therapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor erzielt werden [112-114]. Sie werden daher in Kombination mit anderen Substanzen, z.B. konventioneller Chemotherapie untersucht [115-119]. AC220 ist derzeit der vielversprechendste *FLT3*-Inhibitor in klinischer Testung [111, 120].

1.3.2 DDR1 und DDR2

Wie *FLT3* sind auch *DDR*s bei der Proliferation, dem Überleben und der Differenzierung von Zellen (*DDR1*: neuronale Differenzierung; *DDR2*: osteogene Differenzierung) von Bedeutung [121]. Zudem spielen *DDR*s eine wichtige Rolle bei der Migration, Zelladhäsion, Matrixremodellierung [121, 122] und der Gewebekomöostase sowie –regeneration [123]. Generell ist die *DDR1*-Expression hauptsächlich in Epithelzellen zu finden [124]. Eine *DDR2*-Expression findet man hingegen in Bindegewebszellen, die dem Mesoderm entstammen [124, 125]. Die Untersuchung der biologischen Funktion der *DDR*s hat ergeben, dass *DDR*s bei der embryonalen Entwicklung eine bedeutende Rolle spielen. *DDR1* ist unter anderem wesentlich für die Brustdrüsenentwicklung [126], während *DDR2* vor allem das Wachstum der (Röhren-) Knochen reguliert [127]. Eine seltene Wachstumsstörung beim Menschen wird durch *DDR2*-Mutationen verursacht. Auf verschiedene Weise führen diese Mutationen zum Ausbleiben der Kollagen-induzierten Rezeptoraktivierung, was schließlich gravierende Skelettveränderungen hervorruft [128, 129]. Dies unterstreicht die wichtige Aufgabe von *DDR2* in der Skelettentwicklung des Menschen. Des Weiteren wurden *DDR*s bisher mit Arteriosklerose [130-133], Nierenerkrankungen [134-136], Lungenfibrose [137], Leberfibrose [138], Arthritis [139-143] und verschiedenen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht [121]. Erste Hinweise deuten außerdem auf eine Involvierung der *DDR*s bei hämatologischen Tumoren hin [144-146].

*DDR*s unterscheiden sich in vier wesentlichen Punkten von anderen RTKs. Dies macht *DDR*s einzigartig unter den RTKs.

(1) *DDR1* und *DDR2* sind Rezeptoren mit Discoidin-Domäne. Die Discoidin-Domäne trägt ihren Namen aufgrund ihrer Homologie zu dem Protein Discoidin I, einem Lektin des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* [147]. Während die extrazelluläre Domäne der meisten RTKs weit verbreitete Strukturmodule wie Immunoglobulin-ähnlichen Domänen, Fibronektindomänen oder zysteinreiche Domänen trägt, haben *DDR*s mit der Discoidin-Domäne und Discoidin-ähnlichen Domäne eine einzigartige extrazelluläre Struktur [43].

(2) DDR1 und DDR2 sind zwei eng miteinander verwandte Nicht-Integrin-Kollagenrezeptoren [148]. Als Liganden für RTKs fungieren in der Regel lösliche peptidähnliche Wachstumsfaktoren. DDRs hingegen werden von Kollagen aktiviert [148, 149]. Vor dieser Erkenntnis galten Integrine als die einzigen Zelloberflächenrezeptoren, die durch Binden von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) Signale in die Zellen übermitteln können [53]. Kollagen ist der Hauptbestandteil der ECM des Bindegewebes [150]. In Wirbeltieren sind 28 Typen von Kollagen beschrieben (I-XXVIII), die in Familien organisiert sind (z.B. fibrilläre Kollagene, netzbildende Kollagene). Kollagene sind die am häufigsten vorkommenden Proteine in Säugetieren. Sie sind Strukturproteine der ECM und tragen zusammen mit anderen ECM-Bausteinen zu den mechanischen Eigenschaften, dem Aufbau und der Form der Gewebe bei. Dabei sind manche Kollagentypen gewebespezifisch [151]. DDR1 und DDR2 binden jeweils nur bestimmte Kollagene. Dabei erkennen sie verschiedene aber definierte Aminosäuremotive der Kollagene [152, 153]. Während beide von den fibrillären Kollagenen I, II, III und V aktiviert werden [148, 149], wird der DDR1-Rezeptor zusätzlich vom netzbildenden Kollagen IV aktiviert [149]. Außerdem dient Kollagen VIII als Ligand für den DDR1-Rezeptor [154], aber nicht für den DDR2-Rezeptor. Hingegen bindet der DDR2-Rezeptor im Vergleich zum DDR1-Rezeptor bevorzugt Kollagen II [155] und X [156]. Die Kollagenbindestellen der DDRs sind in ihrer Discoidin-Domäne lokalisiert [157, 158].

(3) Das Prinzip der Ligand-induzierten Rezeptordimerisierung trifft nicht auf DDR1 und DDR2 zu [122]. Im Gegenteil, die Ligandbindung erfordert eine vorherige Rezeptordimerisierung [158]. DDRs formen also Ligand-unabhängig stabile Dimere, die bereits vor Bindung des Liganden an der Zelloberfläche vorliegen [122]. Die TM-Domäne der DDRs ist eine Schlüsselregion für die Dimerisierung. Von ihr geht dabei starkes Selbstassoziationspotential aus [122, 159].

(4) Wie bei anderen RTKs kommt es auch bei den DDRs erst nach Ligandbindung zur Autophosphorylierung der Rezeptoren. Der Unterschied zu anderen RTKs besteht hier in der langsamen und langanhaltenden Rezeptorphosphorylierung. Typischerweise sind RTKs binnen Sekunden bis Minuten aktiviert (phosphoryliert). Maximale DDR-Rezeptoraktivierung mit Kollagen ist oftmals erst nach Stunden erreicht [148, 149].

Die Signalwege, über die DDRs agieren, sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Bekannt ist, dass DDR1 und DDR2 in vielfältiger Weise den MAPK-Signalweg aktivieren [160-168]. Die vom DDR1-Rezeptor ausgehende Signalübertragung kann außerdem über die Signalwege PI3K/AKT [164, 169], NF- κ B (*nuclear factor-kappaB*) [170] und Notch1 [171] erfolgen. Das biologische Ergebnis ist dabei jedoch stark vom zellulären Kontext abhängig. Zudem kann es auch vom Kollagentyp beeinflusst werden, der den Rezeptor aktiviert [164, 166, 172]. Im Vergleich zum DDR1-Rezeptor sind beim DDR2-Rezeptor bisher nur wenige validierte bzw. potentielle Adaptorproteine und intrazelluläre Signalmoleküle bekannt (Shc (*Src homology 2 domain containing*), Src (*sarcoma*) [173]; SHP-2 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*), Nck1 (*non-catalytic region of tyrosine kinase adapter protein 1*), Lyn (eine Kinase der Src-Familie), SHIP-2 (*SH2 (Src homology 2)-domain-containing inositol phosphatase 2*), PLCL2 (*phospholipase C-like 2*) und PIK3C2A (*phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 α*) [174]. Der DDR1-Rezeptor zeigt ein großes Spektrum an Interaktionspartnern, die meist über SH2-, SH3- oder PTB-Domänen an phosphorylierte Tyrosine im cytoplasmatischen Bereich des Rezeptors binden. Dazu gehören unter anderem Adaptorproteine (Crk2, Nck1/2), das Docking-Protein Shc1, Guanosintriphosphat-Austauschfaktoren (PLC- γ 1, Vav1/2), Src-Kinasen (Yes, Lyn, Fyn, c-Src), die C-terminale Src Kinase Csk, STATs (STAT1a/b, STAT3, STAT5b), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K; p85 a/b, p110 a/b/d) und Phosphatasen (SHIP-1/2, SHP-2) [175].

Die Aktivierung der DDRs erfolgt unabhängig von $\beta 1$ -Integrinen [176]. Mitglieder der $\beta 1$ -Familie der Integrine ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$) erkennen Kollagen [177]. DDR1 kann jedoch in positiver und negativer Weise die Signaltransduktion von kollagenbindenden $\beta 1$ -Integrinen abhängig vom zellulären Hintergrund beeinflussen [53] (siehe Abbildung 4). Während in MDCK-Zellen DDR1 der von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin hervorgerufenen Zellspreitung [178] und Zellmigration [179, 180] entgegenwirkt, kooperiert DDR1 mit $\alpha 2\beta 1$ -Integrin beim Zell-Scattering von Bauchspeicheldrüsenkrebszellen [166] und bei der Selbsterneuerung von embryonalen Mausstammzellen durch die Regulierung des Zellzyklus über Bmi-1 [169]. Im Gegensatz zur Inhibition der Zellmigration in MDCK-Zellen, fördert DDR1 die Zellmigration über alternative Wege in anderen Zellen wie Megakaryozyten [160] und Brustepithelzellen [181].

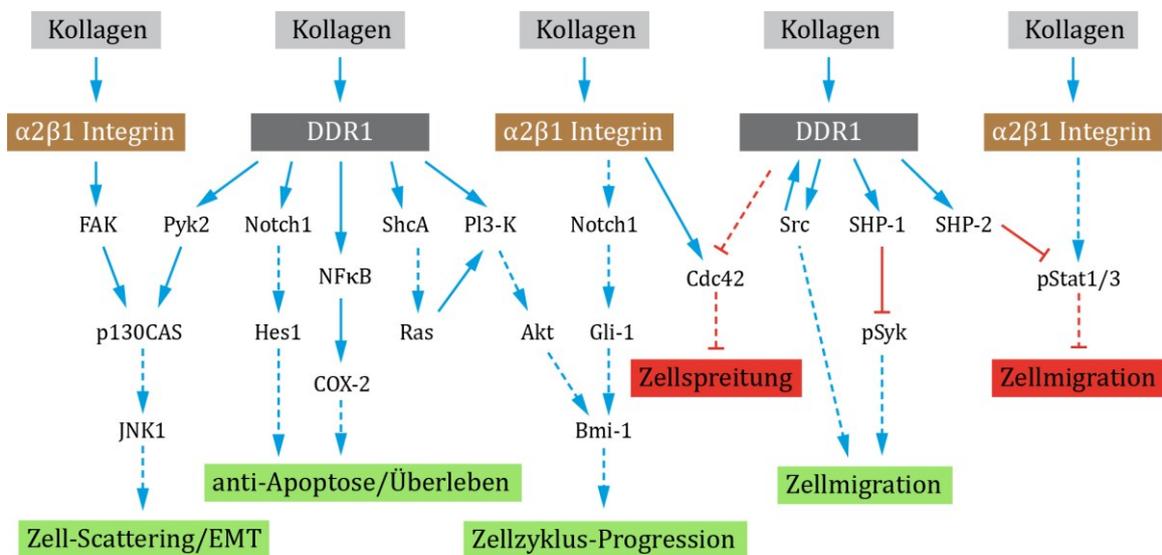


Abbildung 4: Interaktion von DDR1 und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin bei der intrazellulären Signaltransduktion nach Aktivierung durch Kollagen. Durchgezogene Linien zeigen direkte, gestrichelte Linien indirekte Interaktionen. Durch DDR1-Aktivierung begünstigte zelluläre Auswirkungen sind grün dargestellt. Prozesse, die durch DDR1-Aktivierung unterdrückt werden sind rot. Abbildung nach Leitinger [53]. EMT: epithelial-mesenchymale Transition

1.4 NPM1

Nukleophosmin (NPM1) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein [182], das zwischen dem Nukleus und Zytoplasma verkehrt [183], jedoch hauptsächlich in der granulären Region des Nukleolus lokalisiert ist [184, 185]. Unter den nukleolären Proteinen ist NPM1 eines der am häufigsten vorkommenden Proteine [186]. Das *NPM1*-Gen kodiert für drei alternativ gespleißte Isoformen [187]. Die vorherrschende Isoform ist Isoform 1 [188]. Sie besitzt zahlreiche funktionelle Domänen [189] und ist in Abbildung 5 dargestellt.

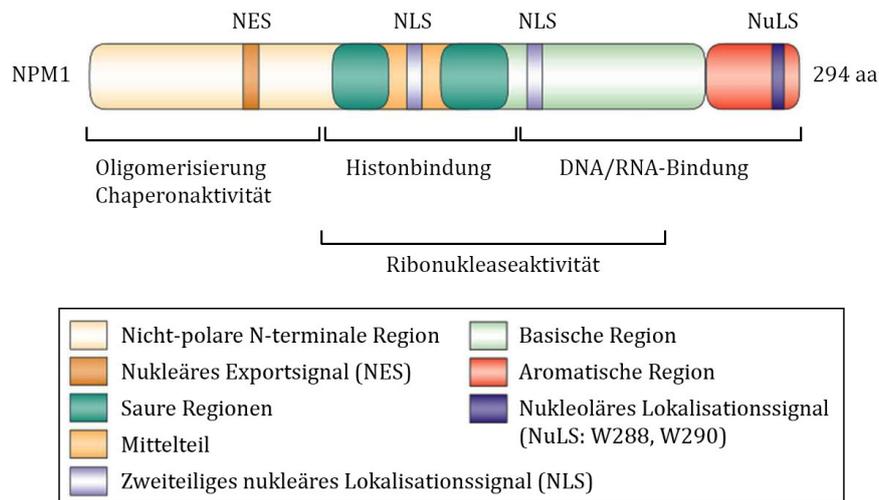


Abbildung 5: Aufbau und funktionelle Domänen des wildtypischen NPM1. Abbildung nach Grisendi *et al.* [190].

Der N-Terminus enthält eine hydrophobe Region, die an der Oligomerisierung (der Großteil des NPM1 liegt als Oligomer vor [191]) und Chaperonaktivität von NPM1 beteiligt ist [189, 190]. Für den richtigen Aufbau von Ribosomen im Nukleolus sind die nicht-polare N-terminale Region [189] sowie der multimere Zustand von NPM1 [192] ausschlaggebend. Der Mittelteil enthält zwei Regionen mit sauren Aminosäuren, die für die Histonbindung entscheidend sind [193]. Der Bereich zwischen den beiden sauren Regionen übt Ribonukleaseaktivität aus. Auch die C-terminale Domäne ist an der Ribonukleaseaktivität beteiligt, ebenso wie an der Bindung von Nukleinsäuren durch ihre basischen Regionen [189, 190]. Dem folgt ein kurzer Bereich mit aromatischen Aminosäuren, der zwei Tryptophane (W288, W290) enthält, die für die nukleoläre Lokalisation von NPM1 von Bedeutung sind [194]. Phosphorylierungsstellen regulieren die Verbindung mit dem Zentrosom [195] und subnukleären Kompartimenten [196, 197]. Außerdem enthält die N-terminale Domäne ein Leucinreiches nukleäres Exportsignal (NES) [198, 199] und der Mittelteil ein zweiteiliges nukleäres Lokalisationssignal (NLS) [189].

NPM1 pendelt kontinuierlich zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma hin und her (Shuttling) [183]. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt in hohem Maße der nukleäre Import von wildtypischem NPM1 gegenüber dem nukleären Export [187]. Das NLS-Signal lenkt NPM1 vom Zytoplasma ins Nukleoplasma [187]. Von dort aus gelangt es durch seine nukleoläre Bindedomäne, die Tryptophane W288 und W290, zum Nukleolus [194]. Der nukleäre Export von NPM1 geschieht unter Hilfe von CRM1 [200] (auch Exportin 1 genannt), einem Exportrezeptor für Proteine mit Leucinreichen NES-Motiven [201]. Da die Interaktion mit CRM1 nur schwach ist [202], ist der Großteil des NPM1 im Nukleolus lokalisiert [184]. Dieser nukleo-zytoplasmatische Verkehr ist streng reguliert, da viele wichtige Funktionen von ihm abhängen [198, 199].

NPM1 ist ein multifunktionelles Protein. Es spielt eine Schlüsselfunktion bei der Biogenese der Ribosomen. Seine nukleo-zytoplasmatische Shuttleeigenschaft [183] und seine Fähigkeit Nukleinsäuren zu binden [203, 204], ermöglichen den Transport ribosomaler Untereinheiten in Form von rRNA vom Nukleus ins Zytoplasma [205]. Zudem trägt seine Ribonukleaseaktivität zur Prozessierung der pre-rRNA bei [206] und seine Chaperonfähigkeiten verhindern die Proteinaggregation während des Ribosomenaufbaus im Nukleolus [207]. Hierdurch scheint NPM1 eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese und somit im Zellwachstum und der Proliferation zu übernehmen [187]. So stoppt zum Beispiel der Verlust von *NPM1* oder die Inhibierung des NPM1-Shuttling die Proteintranslation und führt zum Zellzyklusarrest [199]. Des Weiteren ist NPM1 an der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beteiligt, indem es zur DNA-Reparatur beiträgt [208, 209] und während der Mitose die Zentrosomduplikation reguliert [210]. NPM1 scheint dabei vor Zentrosom-Hyperamplifikation zu schützen, da die Inaktivierung von *Npm1* zur uneingeschränkten Zentrosomduplikation und zu genomischer Instabilität führt [211, 212]. Schließlich interagiert NPM1 mit den Tumorsuppressoren p53 und ARF und nimmt Einfluss auf Zellproliferation und Apoptose [213]. p53 verhindert das Überleben von Zellen mit irreparablen genetischen Defekten [214]. Deshalb sind p53-Level streng reguliert und steigen nur bei zellulärem Stress [214, 215]. Unter zellulärem Stress (z.B. UV-Strahlung) wird p53 von NPM1 stabilisiert und aktiviert [214, 216]. Die Aufgabe von ARF (*alternate reading frame* Protein des INK4a/ARF Lokus) liegt im Zellzyklusarrest [217]. NPM1 stabilisiert ARF im Nukleolus und schützt es vor dem Abbau [218, 219].

Zwischen 45,7% und 63,8% aller erwachsenen AML-Patienten mit normalem Karyotyp bzw. 25-35% aller AML-Patienten weisen eine Mutation im *NPM1*-Gen auf [26, 220-225]. Dies macht *NPM1*-Mutationen zu den häufigsten Mutationen bei *de novo* AML im Erwachsenenalter [187, 221]. Da NPM1 aufgrund der Mutation überwiegend im Zytoplasma vorkommt, spricht man bei einer AML mit *NPM1*-Mutation von „*NPM*-cytoplasmic positive (*NPMc+*) AML“ [187, 221]. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung *NPM1c+* verwendet. Falini *et al.* haben *NPM1*-Mutationen zum ersten Mal 2005 beschrieben [221]. Heute sind mehr als 50 verschiedene *NPM1*-Mutationen bekannt [226], die fast ausschließlich in Exon 12 vorkommen [26, 220, 222-225, 227, 228] und mit nur wenigen Ausnahmen AML-spezifisch sind [187, 221, 229-231]. Sie kommen durchweg heterozygot vor, d.h. ein Wildtyp-Allel bleibt immer erhalten [187]. Bei Patienten mit einer *NPM1*-Mutation tragen alle leukämischen Zellen die Mutation [232]. Die häufigste Mutation, die 75-80% der *NPM1c+* AML-Fälle ausmacht, ist eine Duplikation von vier Nukleotiden (TCTG) an Position 956-959 der Referenzsequenz⁶ [187]. Sie wird als Mutation A bezeichnet [221]. Mutation B bzw. D wird in circa 10% bzw. 5% der *NPM1c+* AML-Fälle gefunden. Die anderen Mutationen kommen sehr selten vor [187]. Die häufigsten *NPM1*-Mutationen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Die häufigsten *NPM1*-Mutationen. Die durch die Mutation eingefügten Nukleotide sind rot markiert. Die Tryptophane W288 und W290 in der wildtypischen Aminosäuresequenz sind blau hervorgehoben. Als Konsequenz der hier dargestellten Mutationen sind die letzten sieben Aminosäuren der Wildtypsequenz durch elf andere Aminosäuren ausgetauscht, inklusive der beiden Tryptophane. Tabelle modifiziert nach Falini *et al.* [187, 221].

	DNA-Sequenz	Aminosäuresequenz
Wildtyp	GATCTCTG.....GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	286-DL W Q W RKSL
Mutation A	GATCTCTG TCTG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	286-DLCLAVEEVSLRK
Mutation B	GATCTCTG CATG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	286-DLCMAVEEVSLRK
Mutation D	GATCTCTG CCTG GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	286-DLCLAVEEVSLRK

⁶ GenBank Accession Number NM_002520

NPM1-Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserahmens (Frameshift) in der C-terminalen Region von *NPM1* [221] und rufen dort zwei Veränderungen hervor, die die zytoplasmatische Lokalisation von *NPM1c+* begründen. Durch die Mutation entsteht ein zusätzliches Leucin-reiches NES-Motiv, das den nukleären Export von *NPM1c+* verstärkt und gleichzeitig geht ein (W290) oder gehen beide Tryptophane (W288, W290) verloren [233], die normalerweise für die nukleoläre Lokalisation verantwortlich sind [194, 233]. Diese zwei Veränderungen stören das *NPM1*-Shuttling [233] und beeinträchtigen somit die Funktionen von wildtypischem *NPM1* erheblich. Folglich dominiert der nukleäre Export und *NPM1c+* akkumuliert im Zytoplasma [233].

Im Vergleich zur *FLT3*-ITD sind *NPM1*-Mutationen stabile Mutationen [223]. Der Verlust einer *NPM1*-Mutation zwischen der Diagnosestellung und einem Rezidiv ist selten [223, 234-236]. Ebenso kommt der Erwerb einer *NPM1*-Mutation im Rezidiv bei Vorliegen von ausschließlich *NPM1*-Wildtyp zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht vor [223, 234, 237]. *NPM1*-Mutationen sind eng mit normalem Karyotyp [221, 225] und *de novo* AML assoziiert [221]. NK-AML-Patienten mit einer *NPM1*-Mutation sprechen gut auf die Induktionstherapie an [26, 221, 238]. Sie zeigen nach der Induktionstherapie sowohl eine signifikant höhere Blasten-Clearance [238] als auch eine höhere komplette Remissionsrate als Patienten ohne *NPM1*-Mutation [221-223, 238]. *NPM1*-Mutationen treten häufig gemeinsam mit einer *FLT3*-ITD auf [26, 221-225], aber selten zusammen mit anderen Mutationen [222] und schließen sich mit den wesentlichen Chromosomenanomalien gegenseitig aus [221, 225]. Die Blasten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl ist bei (NK-) AML-Patienten mit *NPM1*-Mutation höher als bei Patienten mit wildtypischem *NPM1* [26, 224]. Die Blastenzahl steigt bei gleichzeitigem Auftreten einer *FLT3*-ITD [26, 224]. NK-AML-Patienten mit einer *NPM1*-Mutation, aber ohne *FLT3*-ITD, haben eine günstige Prognose [26, 222, 224, 225] und eine 5-Jahres-Überlebenschance von zirka 60% [26].

1.5 *NPM1* und *FLT3* in der AML mit normalem Karyotyp

In der NK-AML sind *NPM1*-Mutationen sehr häufig mit *FLT3*-ITD-Mutationen assoziiert. Etwa 41% der NK-AML-Patienten mit einer *NPM1*-Mutation haben auch eine *FLT3*-ITD [26, 222]. Dies legt eine Interaktion der beiden Mutationen hinsichtlich klinischer Merkmale, Therapieansprechen und Überleben nahe. Mit *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen treffen bei der NK-AML aus prognostischer Sicht zwei gegensätzliche Mutationen aufeinander [239], denn eine *NPM1*-Mutation ist mit einer guten, eine *FLT3*-ITD hingegen mit einer schlechten Prognose assoziiert [26, 28, 95, 222, 224, 225]. So weisen NK-AML-Patienten mit einer *NPM1*-Mutation nur in Abwesenheit einer *FLT3*-ITD ein besseres Gesamtüberleben [26, 101, 222, 224], ein besseres Ereignis-, Krankheits- oder Rezidiv-freies Überleben [26, 222, 224] und eine geringe Rezidivrate [101, 224] auf. Diese Parameter verschlechtern sich bei gleichzeitigem Auftreten einer *FLT3*-ITD [26, 101, 222, 224]. Ebenso sprechen Patienten mit *NPM1*- aber ohne *FLT3*-ITD-Mutation besser auf die Induktionstherapie an [26].

Da außerdem das Allelverhältnis von *FLT3*-ITD und *FLT3*-WT von prognostischer Relevanz ist [71], haben Schneider *et al.* aus unserer Arbeitsgruppe den Einfluss der *FLT3*-ITD-Last auf das Gesamtüberleben (OS; *overall survival*) und das Rezidiv-freie Überleben (RFS; *relapse-free survival*) von NK-AML-Patienten mit bzw. ohne *NPM1*-Mutation untersucht (siehe Abbildung 6). Dabei haben sie bestätigt, dass der positive prognostische Effekt einer *NPM1*-Mutation bezüglich des OS und RFS nur bei Patienten ohne *FLT3*-ITD-Mutation besteht und dass dieser positive Effekt bei gleichzeitigem Auftreten einer *FLT3*-ITD verloren geht. Denn mit zunehmendem Allelverhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT nimmt das OS und RFS bei Patienten mit einer *NPM1*-Mutation ab. So wird sowohl das OS

als auch das RFS bei Patienten mit einer *NPM1*-Mutation signifikant von der *FLT3*-ITD-Last beeinflusst. In Patienten mit wildtypischem *NPM1* nimmt die *FLT3*-ITD keinen Einfluss auf diese Parameter und alle Patienten zeigen ein ähnlich schlechtes OS sowie RFS wie Patienten mit beiden Mutationen [240]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit das Zusammenspiel von *FLT3*-ITD und *NPM1*-Mutationen bei der Entstehung der AML untersucht.

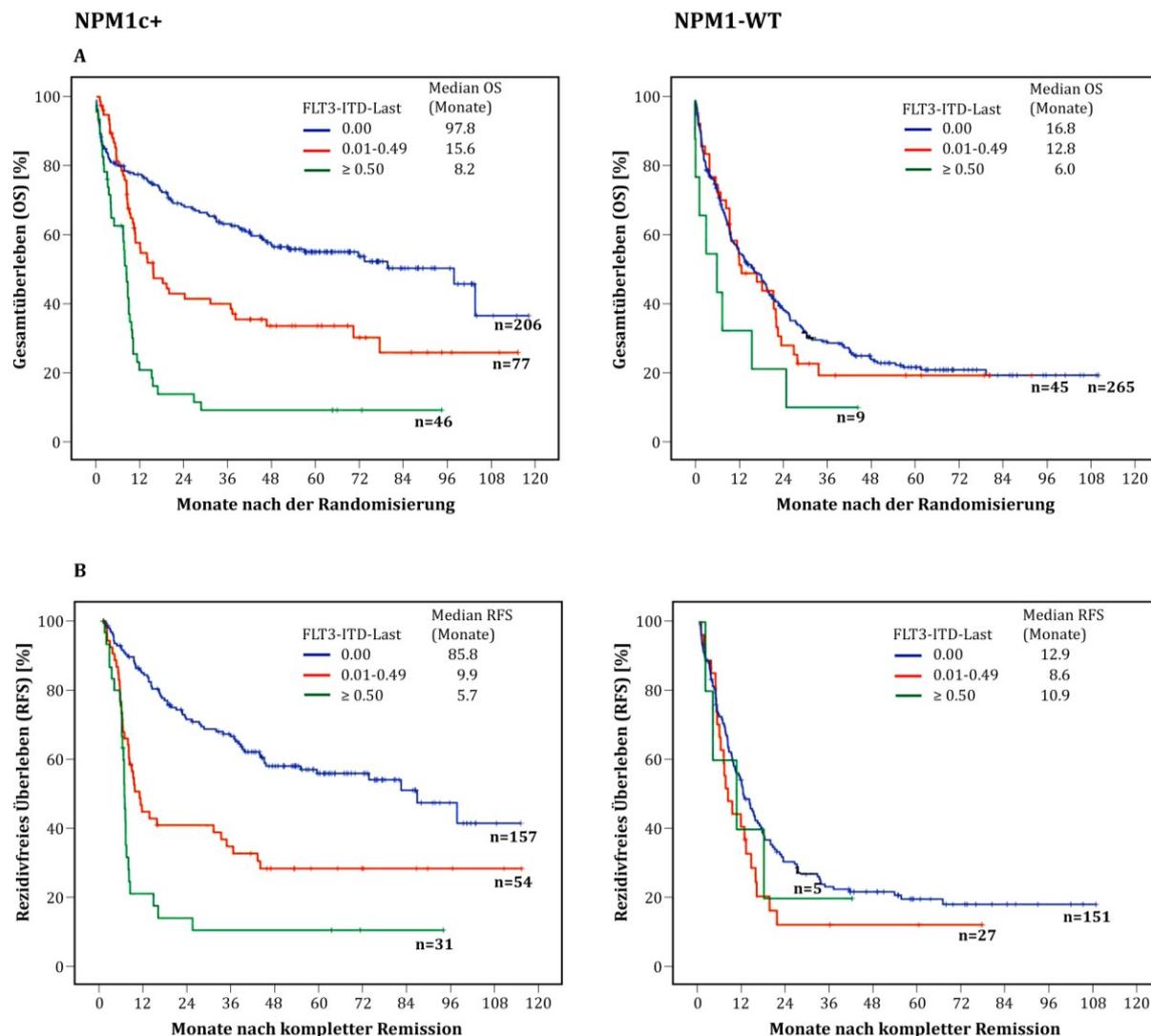


Abbildung 6: Einfluss der *FLT3*-ITD-Last auf das Gesamtüberleben (A) und das Rezidiv-freie Überleben (B) bei NK-AML-Patienten mit mutiertem bzw. wildtypischem *NPM1*. Die Berechnung des Allelverhältnisses von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT erfolgte mit einer kleinen Abweichung wie unter 3.2.3.20 beschrieben. Der unter 3.2.3.20 errechnete Quotient (ITD/WT) wurde hier durch [(ITD/WT)+1] geteilt um standardisierte Werte zwischen 0 und 1 zu erhalten. Der Wert 0 entspricht dem ausschließlichen Vorliegen von *FLT3*-WT, Werte zwischen 0,01 und 0,49 einer niedrigen *FLT3*-ITD-Last und Werte $\geq 0,5$ einer hohen *FLT3*-ITD-Last in leukämischen Blasten. Der Wert 1 würde dem vollständigen Wildtypverlust entsprechen. Abbildung nach Schneider *et al.* [240].

2 Zielsetzung der Arbeit

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist genetisch eine außerordentlich heterogene Erkrankung. Das Spektrum molekularer Mutationen in der AML vergrößert sich weiterhin durch den Einsatz moderner Sequenzierverfahren. Die auftretenden molekulargenetischen sowie zytogenetischen Veränderungen bestimmen den Therapieerfolg und das Überleben eines Patienten maßgeblich. Die prognostische Bedeutung und die Rolle in der Pathogenese der AML sind jedoch für viele molekulargenetische Aberrationen noch ungeklärt. Bekannt hingegen ist, dass Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. FLT3 eine zentrale Rolle in der AML spielen. Sie sind häufig von aktivierenden Mutationen betroffen, die für die Entstehung der Erkrankung aber alleine nicht ausreichen. *In vivo* wird zum Beispiel erst bei gleichzeitigem Auftreten eines mutierten hämatopoetischen Transkriptionsfaktors ein AML-Phänotyp herbeigeführt. Die mit am häufigsten gemeinsam auftretenden Mutationen in der AML sind *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen, was eine Interaktion dieser Mutationen vermuten lässt. Eine gleichzeitig auftretende ITD im *FLT3*-Gen verschlechtert die gute Prognose eines *NPM1*-mutierten (*NPM1c+*) Patienten. Dies untermauert die Hypothese eines pathogenen Zusammenwirkens beider Genmutationen in der AML. Da die funktionelle Interaktion und Kollaboration von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen noch weitestgehend unbekannt ist, war ein Ziel dieser Arbeit ein zellbasiertes Modell zu etablieren, das die relevanten Genotypen (*NPM1c+/FLT3*-ITD; *NPM1c+/FLT3*-WT) modelliert und es erlaubt, die funktionelle Interaktion der *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen zu untersuchen. Da nicht nur das Auftreten einer *FLT3*-ITD an sich, sondern vor allem das Allelverhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-Wildtyp (ITD/WT) die gute Prognose von *NPM1*-mutierten Patienten negativ beeinflusst, wurden außerdem Zelllinien mit unterschiedlichen ITD/WT-Verhältnissen generiert. Nach Bestätigung der Funktionalität des Zellmodells wurden *in vitro* und *in vivo* insbesondere das Proliferationsverhalten von *NPM1c+/FLT3*-ITD-Zellen im Vergleich zu *NPM1c+/FLT3*-WT-Zellen analysiert.

Es ist bekannt, dass neben aktivierenden Mutationen auch hohe *FLT3*-WT-Expressionslevel zur Autoaktivierung der Kinase führen und die Prognose der Patienten verschlechtern. Mit Hilfe des Zellmodells war, im Vergleich zu Zellen mit physiologischer *FLT3*-WT-Expression, ein schwacher Wachstumsvorteil der Zellen zu sehen, die den *FLT3*-WT-Rezeptor überexprimierten. Eine mögliche Ursache hoher *FLT3*-Expressionlevel könnte in der transkriptionellen Regulation von *FLT3* liegen. Es wurde deshalb im zweiten Teil dieser Arbeit mit der Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *FLT3* begonnen.

Des Weiteren wurde in unserer klinischen Kooperationsgruppe bei der Exomsequenzierung von Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie eine zuvor nicht beschriebene Mutation in der Rezeptortyrosinkinase *DDR2* identifiziert. Um die Frage zu klären, ob diese Mutation, sowie weitere in der Literatur bei AML-Patienten beschriebene *DDR1*- und *DDR2*-Mutationen einen transformierenden Phänotyp aufweisen, wurden im dritten Teil dieser Arbeit Zelllinien generiert, die die gefundenen Mutationen exprimieren. Mit der funktionellen Charakterisierung der *DDR1*- und *DDR2*-Mutationen wurde begonnen.

Ergebnisse aus diesen Projekten sollen zum besseren Verständnis des leukämischen Phänotyps der AML beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborausstattung

Tabelle 3: Verwendete Laborausstattung

Gerätebezeichnung	Hersteller
Abzug	Prutcher Laboratory Systems (Neudörfel, AUT)
accu-jet® pro Pipettierhelfer	BRAND (Wertheim)
Analysenwaage 2001 MP2	Sartorius (Göttingen)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Blockthermostat BT 1302	HLC Heap Labor Consult (Bovenden)
CO ₂ -Inkubator CB 210; CO ₂ Unitherm 170	BINDER (Tuttlingen); UniEquip (Planegg)
Dewar Transportgefäß	KGW-Isotherm (Karlsruhe)
Expositionskassetten Hypercassette™	Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK)
FACSAria™ IIIu Cell Sorter	Becton Dickinson (Heidelberg)
FACSCalibur™	Becton Dickinson (Heidelberg)
FACSVantage™ SE	Becton Dickinson (Heidelberg)
Flüssigstickstofftank	Messer Griesheim (Krefeld)
Gefrierbehälter Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gefrierschränke (-20°C)	AEG (Nürnberg); Bosch (Stuttgart); Liebherr (Biberach an der Riss)
Gefrierschrank HERAfreeze™ (-80°)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Geldokumentationssystem E-BOX VX2	VILBER LOURMAT (Eberhardzell)
Gelelektrophoresesystem Mini S; Mini L	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Glaswaren	DURAN Group (Wertheim/Main)
Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer)	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Hybridisierungsinubator 7601	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Inkubationsschüttler Excella® E25; Innova® 44	Eppendorf (Hamburg)
Inversmikroskop ID03	Carl Zeiss (Jena)
Kämme für Gelelektrophoresesystem	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Kryohandschuhe	Cryogenic Workwear (Milton Keynes, GBR)
Kühlschränke (4°C)	Bosch (Stuttgart); Liebherr (Biberach an der Riss); privileg (Stuttgart)
Kühlzentrifuge Rotanta 46 RC; 460 R	Hettich (Tuttlingen)
Laminar-Flow Werkbänke	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl-Genkingen)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments (Schwabach)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl-Genkingen)
Mikrobiologischer Brutschrank	Heraeus (Osterode)
Mikroskop Axiostar; Axiovert 25; Axiovert 200 M	Carl Zeiss (Jena)
Mikrotiterplatten-Photometer/ELISA-Reader Sunrise™	Tecan Austria (Grödig, AUT)
Mikrowelle	Siemens (München)
Mikrozentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)

Mikrozentrifuge 5417C (Kühlzentrifuge)	Eppendorf (Hamburg)
Netzteil PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories (München)
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems (Pforzheim)
Pipetten	Gilson (Middleton, WI, USA)
Präzisionswaage 440-45	Kern & Sohn (Balingen)
Probenkämme für SDS-PAGE	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Proteingelelektrophoresesystem XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Rollenmischer RM 5	Karl Hecht (Sondheim/Rhön)
Röntgenfilmentwicklungsmaschine OPTIMAX	Protec (Oberstenfeld)
Rotationsmischgerät	Kisker Biotech (Steinfurt)
Schüttler KS 250 basic; KS 260 basic	IKA®-Werke (Staufen)
Schutzbrillen	UVEX ARBEITSSCHUTZ (Fürth)
Semidry-Blotter	H. Hölzel Laborgeräte (Wörth/Hörlkofen)
Spektralphotometer Nanodrop 1000	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Thermocycler peqSTAR 96 Universal Gradient	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
UV Transilluminator	LTF Labortechnik (Wasserburg/Bodensee)
Vi-CELL™ XR	Beckman Coulter (Krefeld)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wasserbad Modell 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Wasserstrahlpumpe	BRAND (Wertheim)
Wippschüttler Shaker DRS-12	neoLab (Heidelberg)
Zentrifuge 3K30; Labofuge 400	Sigma Laborzentrifugen (Osterode am Harz); Heraeus (Osterode)
Zentrifuge EBA 12	Hettich (Tuttlingen)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (100K)	Millipore (Carrigtwohill, IRL)
Blottingpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Einwegschutzhandschuhe	Semperit (Wien, AUT)
Einwegskalpell	FEATHER (Osaka, JPN)
Filterspitzen	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Gel-Kassetten	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Gewebekulturflaschen	SARSTEDT (Nümbrecht)
Gewebekulturplatte (6 Well)	SARSTEDT (Nümbrecht)
Gewebekulturplatte (96 Well)	SARSTEDT (Nümbrecht)
Kanülen	Henke-Sass, Wolf (Tuttlingen)
Kryoröhrchen	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Roskilde, DNK)
Küchentücher	WEPA Hygieneprodukte (Arnsberg-Müschede)
Küvetten	SARSTEDT (Nümbrecht)
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Menasha, WI, USA)

Partikelfiltrierende Halbmaske X-plore 1730 V (FFP3 NR D)	Dräger (Lübeck)
PCR SoftTubes (0,2 ml)	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Petrischalen	SARSTEDT (Nümbrecht); Corning Incorporated (Corning, NY, USA)
Pipettenspitzen	Gilson (Villiers-le-Bel, FRA)
Pipettenspitzen MultiFlex™	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
QIAshredder	QIAGEN (Hilden)
Reagiergefäß (1,5 ml)	SARSTEDT (Nümbrecht)
Rundbodenröhrchen Polystyren (5 ml; 14 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Safe-Lock Tubes (2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten	Corning Incorporated (Corning, NY, USA); Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Spritze (1 ml; 5 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Sterilfilter Stericup Vakuum-Filtrationssystem (0,22 µm)	Millipore (Billerica, MA, USA)
Steriflip® Filter (0,45 µm)	Millipore (Billerica, MA, USA)
Vi-CELL® Sample Vials	Beckman Coulter (Krefeld)
Wägebapier	MACHEREY-NAGEL (Düren)
Zell-Filtersieb (40 µM; 70 µM)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zellschaber	SARSTEDT (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen Polypropylen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen Polystyren (15 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
24 Well Multischalen	Thermo Fisher Scientific (Roskilde, DNK)
48 Well Multischalen	Thermo Fisher Scientific (Roskilde, DNK)
96 Well Multiwellplatte (weiß)	Corning Incorporated (Corning, NY, USA)

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
100 bp DNA Leiter	Agarosegel-Elektrophorese	Promega (Madison, WI, USA)
1 kb DNA Leiter	Agarosegel-Elektrophorese	Promega (Madison, WI, USA)
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung 30% (Rotiphorese® Gel 30)	SDS-PAGE	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose	Agarosegel-Elektrophorese	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Albumin Fraction V (pH 7,0) (bovines Serumalbumin (BSA))	Puffer und Lösungen	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	SDS-PAGE	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Aprotinin	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories (München)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Farbstoffkonzentrat)	Bradford-Test	Bio-Rad Laboratories (München)
Blue/Orange Loading Dye 6 X	Agarosegel-Elektrophorese	Promega (Madison, WI, USA)

Bovines Serumalbumin (BSA)	Restriktionsverdau	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Bromphenolblau	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Coulter Clenz® Cleaning Reagent	Zellzahlbestimmung	Beckman Coulter (Krefeld)
Coulter Isoton® II Diluent	Zellzahlbestimmung	Beckman Coulter (Krefeld)
Dextrose	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Kryokonservierung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Essigsäure	Puffer und Lösungen	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Desinfektion	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Agarosegel-Elektrophorese	Fluka (Buchs, Schweiz)
Gelatine	Puffer und Lösungen	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Puffer und Lösungen	Merck (Darmstadt)
HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure)	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Blau-Weiß-Screening (Mutagenese)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumchlorid	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lipofectamine® 2000	Transfektion	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Lysepuffer (Reverse Transcriptase Assay, chemiluminescent)	Test auf Lentivirenfreiheit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Magnesiumchlorid	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Mangan(II)-chlorid	Puffer und Lösungen	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol	Puffer und Lösungen	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Protein-Detektion	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Puffer und Lösungen	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumfluorid	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumorthovanadat (OV)	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natronlauge	Puffer und Lösungen	AppliChem (Darmstadt)
Paraformaldehyd (PFA) (10%; wässrige Lösung)	Inaktivierung von Lentiviren	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)
peqGold Protein-Marker VI	Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE	Peqlab (Erlangen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Protein-Detektion	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
Polybren	Transduktion	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ponceau S	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2-Propanol	Präparation von Plasmid-DNA	Carl Roth (Karlsruhe)/ AppliChem (Darmstadt)
Propidiumiodid	Durchflusszytometrie	Fluka (Buchs, CH)
Protein A-Agarose	Immunpräzipitation	Roche (Indianapolis, IN, USA)
Salzsäure	Puffer und Lösungen	Merck (Darmstadt)
SYBR Safe DNA gel stain	Agarosegel-Elektrophorese	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SDS-PAGE	Fluka (Buchs, Schweiz)
Tetranatriumpyrophosphat	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Titriplex® III	Puffer und Lösungen	Merck (Darmstadt)
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris)	Puffer und Lösungen	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton™ X-100	Puffer und Lösungen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TRIzol®	Isolierung von RNA aus Zellen (RNA-Seq)	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Trypanblau	Zellzahlbestimmung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TurboFect Transfection Reagent	Transfektion	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Tween 20	Puffer und Lösungen	Carl Roth (Karlsruhe)
X-Gal	Blau-Weiß-Screening (Mutagenese)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
Calciumchlorid	2M CaCl ₂	Transfektion
dNTP Set (100 mM)	gebrauchsfertig von Invitrogen™ Life Technologies	PCR
dNTP Mix (10mM)	Gebrauchsfertig von FINNZYMES (Espoo, FIN)	PCR
Dulbecco's Phosphat- gepufferte Salzlösung (PBS) mit Ca und Mg	gebrauchsfertig von PAN-Biotech (Aidenbach)	Zellkultur
Dulbecco's Phosphat- gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca und Mg	gebrauchsfertig von PAN-Biotech (Aidenbach)	Zellkultur
EDTA (0,5M) pH 8,0	14,6 g EDTA 100 ml Aquadest pH mit Essigsäure/Natronlauge eingestellt	Dephosphorylierung
Elektrophoresepuffer (10x) pH 8,3	151,4 g Tris 720,65 g Glycerin 50 g Natriumdodecylsulfat ad 5 l Aquadest	SDS-PAGE
G-Net	1 l Net 2,5 g Gelatine unter Rühren aufkochen	Protein-Detektion

HBS Puffer	5,950 g HEPES (50 mM) 0,447 g KCl (12 mM) 1,081 g Dextrose (12 mM) 8,181 g NaCl (280 mM) 0,107 g Na ₂ HPO ₄ (1,5 mM) ad 500 ml Aquadest steril filtrieren	Transfektion
KCM (5x)	5 ml KCl (3M) 4,5 ml CaCl ₂ (1M) 7,5 ml MgCl ₂ (1M)	Transformation
MgCl ₂ (25 mM; 50 mM)	gebrauchsfertig von PEQLAB Biotechnologie (Erlangen); gebrauchsfertig von Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	PCR
Lämmli-Puffer (2x)	187,5 mM Tris 6% SDS 30% Glycerin Spatel Spitze Bromphenolblau	SDS-PAGE; Immunpräzipitation
Lysepuffer	25 ml HEPES (1M, pH 7,5) 15 ml NaCl (5M) 2,5 ml EGTA (200 mM) 100 ml Glycerol (50%) 5 ml Triton® X-100 2,1 g NaF 2,23 g Na ₄ P ₂ O ₇ ·x10H ₂ O ad 500 ml Aquadest vor der Zelllyse Zugabe von: 10 µl Aprotinin 20 µl PMSF 20 µl Natriumorthovanadat (OV) zu je 2 ml Lysepuffer	Zelllyse
Net (10x) pH 7,7	438,3 g Natriumchlorid 93,6 g Na ₂ EDTA (Titriplex® III) 302,85 g Tris 25 g Triton® X-100 ad 5 l Aquadest pH mit Salzsäure eingestellt	Protein-Detektion
Ponceau-Lösung	0,5 g Ponceau S 1 ml Eisessig ad 100 ml Aquadest	Protein-Detektion
Pursept®-A Xpress	gebrauchsfertig von Merz Hygiene (Frankfurt am Main)	Flächendesinfektion
Restriktionspuffer NEBuffer 1, 2, 3, 4, EcoRI (10x)	gebrauchsfertig von New England Biolabs (Frankfurt am Main)	Restriktionsverdau
Rinderserumalbumin	5 g BSA 100 ml TBST Spatel Spitze Natriumazid	Protein-Detektion
Stripping Puffer pH 6,7	70 ml 2-Mercaptoethanol 7,56 g Tris 20 g Natriumdodecylsulfat ad 1 l Aquadest	Strippen der Nitrocellulosemembran

T4 DNA Ligasepuffer (10x)	gebrauchsfertig von New England Biolabs (Frankfurt am Main)	Ligation
TAE-Puffer (10x) pH 8,0	242,3 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100% 18,61 g EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex® III) ad 5 l Aquadest	Agarosegel-Elektrophorese
TB-Puffer	0,298 g HEPES 0,275 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 2,33 g KCl 0,875 g MnCl ₂ x 2 H ₂ O ad 125 ml Aquadest	Herstellung kompetenter Bakterien
TBS-Puffer (10x) pH 8,0	60,57 g Tris 438,30 g Natriumchlorid ad 5 l Aquadest	Protein-Detektion
TBST	100 ml TBS-Puffer (10x) 900 ml Aquadest 1 % Tween 20	Protein-Detektion
Transblot ohne Methanol	72,75 g Tris 36,63 g Glycerin 0,475 g Natriumdodecylsulfat ad 1 l Aquadest	Western-Blot
Transblot mit Methanol	80 ml Transblot ohne Methanol 200 ml Methanol 720 ml Aquadest	Western-Blot
Tris (10 mM) pH 8,0	121.14 mg Tris in 8 ml Aquadest gelöst pH mit HCl und NaOH eingestellt auf 10 ml mit Aquadest aufgefüllt	Transfektion
Tris-HCl Puffer 1,5 mol/l pH 6,8	908,55 g Tris ad 5 l Aquadest pH mit Salzsäure eingestellt	SDS-PAGE
Tris-HCl Puffer 1,5 mol/l pH 8,8	908,55 g Tris ad 5 l Aquadest pH mit Salzsäure eingestellt	SDS-PAGE
10x PCR Puffer ohne MgCl ₂	gebrauchsfertig von Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	PCR
10x Reaktionspuffer Cloned <i>Pfu</i> DNA polymerase	gebrauchsfertig von Stratagene (La Jolla, CA, USA)	PCR
10x Reaktionspuffer komplett	gebrauchsfertig von PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)	PCR

3.1.5 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits

Bezeichnung	Anwendung	Herkunft
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Dual-Luciferase-Reporter-Assay	Promega (Madison, WI, USA)
EndoFree Plamid Maxi Kit	Plasmid-Maxipräparation	QIAGEN (Hilden)
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Synthese von cDNA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Nachweis von Mykoplasmen	Lonza (Basel, CHE)
PathScan® Phospho-FLT3 (panTyr) Sandwich ELISA Kit	Sandwich ELISA	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	Apoptosedetektion	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix mit HF Puffer	PCR	FINNZYMES (Espoo, FIN)
QIAquick Gel Extraction Kit	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	QIAGEN (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	QIAGEN (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmid-Minipräparation	QIAGEN (Hilden)
Qproteome Nuclear Protein Kit	Nukleäre Proteinlysate	QIAGEN (Hilden)
Quick Blunting™ Kit	Blunting von DNA-Fragmenten	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Mutagenese	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
RNase-Free DNase Set	DNA-Verdau	QIAGEN (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Isolierung von mRNA	QIAGEN (Hilden)

3.1.6 Plasmide

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Größe	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
pMSCV-IRES-EYFP (MIY)	6,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	R. Keith Humphries, (Vancouver, CAN)
MIY FLT3-WT	9,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
MIY FLT3-NPOS	9,5 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pGEM®-T Easy	3,0 kb	Klonierung von PCR-Produkten	Ampicillin	Promega (Madison, WI, USA)
pGEM®-T Easy FLT3-WT	6,0 kb	Klonierung von PCR-Produkten	Ampicillin	AG Spiekermann
pGEM®-T Easy FLT3-NPOS	6,1 kb	Klonierung von PCR-Produkten	Ampicillin	AG Spiekermann
pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP (pCDH)	7,3 kb	Lentiviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Irmela Jeremias (München)
pCDH FLT3-WT	10,3 kb	Lentiviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
pCDH FLT3-NPOS	10,4 kb	Lentiviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
pMD2.G	5,8 kb	Verpackungsplasmid	Ampicillin	Irmela Jeremias (München)
pMDLg/pRRE	8,9 kb	Verpackungsplasmid	Ampicillin	Irmela Jeremias (München)
pRSV-Rev	4,2 kb	Verpackungsplasmid	Ampicillin	Irmela Jeremias (München)

pCMV6-Entry DDR1	7,5 kb	Expressionsvektor	Kanamycin	OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)
pCMV6-Entry DDR2	7,4 kb	Expressionsvektor	Kanamycin	OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)
MIY DDR1-WT	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
MIY DDR1 A766V	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
MIY DDR1 K618A	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
MIY DDR2-WT	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
MIY DDR2 G222R	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
MIY DDR2 M291I	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
MIY DDR2 D854N	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
MIY DDR2 K608E	9,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA3.1/Zeo ⁽⁺⁾ (pcDNA3.1)	5,0 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	Stefan Lichtenthaler (München)
pcDNA3.1 DDR1-WT (Isoform a)	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pcDNA3.1 DDR1 A766V	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pcDNA3.1 DDR1 K618A	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pcDNA3.1 DDR2-WT	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pcDNA3.1 DDR2 G222R	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pcDNA3.1 DDR2 M291I	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pcDNA3.1 DDR2 D854N	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pcDNA3.1 DDR2 K608E	7,7 kb	Expressionsvektor; Zeocin-Selektion	Ampicillin; Zeocin	diese Arbeit
pGL3-Basic	4,8 kb	Luciferase-Reportervektor; Expressionsvektor	Ampicillin	Daniel Sinnett (Montréal, CA)
pGL3-Promotor	5,0 kb	Luciferase-Reportervektor; Expressionsvektor	Ampicillin	Daniel Sinnett (Montréal, CA)

pRL-CMV	4,1 kb	Luciferase-Reportervektor; Expressionsvektor	Ampicillin	Daniel Sinnett (Montréal, CA)
pGL3-Flt3 (-901) Promotor	5,7 kb	Luciferase-Reportervektor; Expressionvektor	Ampicillin	Dawn Sijin Nin (Singapore)
pCMV6-Entry	4,9 kb	Expressionsvektor	Kanamycin	diese Arbeit
pCMV6-Entry-Pax-5	6,0 kb	Expressionvektor	Kanamycin	OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)
pCMV6-Entry-cMyb (TV1) (Transkriptionsvariante 1)	7,2 kb	Expressionvektor	Kanamycin	OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)
pCMV6-Entry-cMyb (TV2) (Transkriptionsvariante 2)	6,8 kb	Expressionvektor	Kanamycin	OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)
pcDNA3	5,0 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA3-C/EBPA-WT	6,1 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA3-C/EBPA-A932C	6,1 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann
pcDNA3-C/EBPA-P30	5,9 kb	Expressionsvektor	Ampicillin	AG Spiekermann

3.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Schmelztemperatur T _m [°C]	Verwendung
pFLT3-2	AAGACCTCGGGTGTGCGTTG		Sequenzierung FLT3
pFLT3-3	ACGCCCTGGTCTGCATATC		Sequenzierung FLT3
pFLT3-4	CGGGCTCACCTGGGAATTAG		Sequenzierung FLT3
pFLT3-5	TTTGCAATCATAAGCACCAGC		Sequenzierung FLT3
pFLT3-6	ATACAATTCCCTTGGCACATC		Sequenzierung FLT3
pFLT3-7	AACAGGAGTCTCAATCCAGG		Sequenzierung FLT3
pFLT3-8	CAGCATGCCTGGTTCAAGAG		Sequenzierung FLT3
pFLT3-9	AGGCATCTACACCATTAAGAG		Sequenzierung FLT3
FLT3_2Sequ_8.2.05	GCTGGTCGATGCCCCAGGG		Sequenzierung FLT3

FLT3_3Sequ_8.2.05	GAGAGCGTTCCAGAGCCGATC		Sequenzierung FLT3
FLT3_4Sequ_8.2.05	GCTGTTTCATGTGAACCATGG		Sequenzierung FLT3
FLT3_5Sequ_8.2.05	GCCTACCCACCAATCAGATG		Sequenzierung FLT3
FLT3_6Sequ_8.2.05	CCCAACTGCACAGAAGAGAT		Sequenzierung FLT3
FLT3_7Sequ_8.2.05	CTCATTCTATGCAACAATTGG		Sequenzierung FLT3
FLT3_8Sequ_8.2.05	GCTCTGAAAGAGAGGCACTC		Sequenzierung FLT3
FLT3_9Sequ_8.2.05	CCTGGTTCAAGAGAAGTTCAG		Sequenzierung FLT3
FLT3_10Sequ_8.2.05	GGATTGGCTCGAGATATCATG		Sequenzierung FLT3
FLT3_11Sequ_8.2.05	GCAATCCTGCTGGGCTTTTGA		Sequenzierung FLT3
FW Xbal MIYFLT3	ATTCTAGACGGAATTCGT	49	PCR FLT3
RV BamHI MIYFLT3	ATGGATCCGAGGTTAACT	52	PCR FLT3
FW Xbal FLT3	TGCTCTAGAATGCCGGCGTTGGCGC	72	PCR FLT3
REV NotI FLT3	ATAGTTTAGCGGCCGCCGAATCTTC GACCTGAGCCTGCG	82	PCR FLT3
FLT3_539fwd_GGC>GAC	AAAAATGGAAAACCAGGACGCCCT GGTCTGCATAT	74	Mutagenese FLT3
FLT3_539rev_GGC>GAC	ATATGCAGACCAGGGCGTCTGGTT TTCCATTTTT	74	Mutagenese FLT3
154 Npm 718 fw MH	GGACCTAGTTCTGTAGAAGAC		Sequenzierung NPM1
153 Npm 166 rev MH	CTGCTTCAACAATGTGCAACTC		Sequenzierung NPM1
NPM1_fwd_318(1633)	AGGGCCAGTGCATATTAGTGGACA	65	Sequenzierung NPM1
NPM1_rev_461	TTCTGTGGAACCTTGCTACCACCT	65	Sequenzierung NPM1
DDR1 562 fwd	AGGGATGGACTCCTGTCTTACACT	65	Sequenzierung DDR1
DDR1 1405 fwd	ACTATCCTCATCAACAACCGCCCA	65	Sequenzierung DDR1
DDR1 2231 fwd	AAATCGCAGACTTTGGCATGAGCC	65	Sequenzierung DDR1
DDR1 654 rev	ATGTCCGTCATAGGTGGAGTCGTT	65	Sequenzierung DDR1
DDR1 784 rev	TGTGGTTGCTCCATCCCACATAGT	65	Sequenzierung DDR1
DDR2 134 fwd	ACATCACAGCTTCCAGTCAGTGGT	65	Sequenzierung DDR2
DDR2 924 fwd	TGAAGCCAGTGAGTGGGAACCTAA	65	Sequenzierung DDR2
DDR2 1319 fwd	AAATGACAGTCAGCCTTCCCTGC	65	Sequenzierung DDR2

DDR2 1833 fwd	AGCAGATGCCAACAAAGAATGCCAG	65	Sequenzierung DDR2
DDR2 529 rev	ACACATTCATGGAGTGGTCGGTGA	65	Sequenzierung DDR2
DDR EcoRI PCR fwd	CCGGAATTCTCGACTGGATCCGGTA CCGAG	76	PCR DDR1; PCR DDR2
DDR XhoI PCR rev	CCGCTCGAGTTAAACCTTATCGTCG TCATC	72	PCR DDR1; PCR DDR2
DDR XhoI Mut fwd	CGTACGCGGCCGCTTGAGCAGAAA CTCATC	76	Mutagenese im Tag von DDR1 und DDR2
DDR XhoI Mut rev	GATGAGTTTCTGCTCAAGCGGCCGC GTACG	76	Mutagenese im Tag von DDR1 und DDR2
DDR1 A766V fwd	GCAGGGCCGGGTAGTGTGCCCA	74	Mutagenese DDR1
DDR1 A766V rev	TGGGCAGCACTACCCGGCCCTGC	74	Mutagenese DDR1
DDR1 K618A fwd	CCTTTGCTGGTAGCTGTGCGATCT TACGGCCAGATGC	81	Mutagenese DDR1
DDR1 K618A rev	GCATCTGGCCGTAAGATCGCGACA GCTACCAGCAAAGG	81	Mutagenese DDR1
DDR2 M291I fwd	GGTCCACTGCAACAACATATTTGCT AAAGGTGTGAAG	74	Mutagenese DDR2
DDR2 M291I rev	CTTCACACCTTTAGCAAATATGTTGT TGCAGTGGACC	74	Mutagenese DDR2
DDR2 G222R fwd	GTCTATGATGGAGCTGTTAGATACA GCATGACAGAAG	74	Mutagenese DDR2
DDR2 G222R rev	CTTCTGTCATGCTGTATCTAACAGCT CCATCATAGAC	74	Mutagenese DDR2
DDR2 D854N fwd	CTCCTTCAACAAGGCAACGAGACGC GTACGC	76	Mutagenese DDR2
DDR2 D854N rev	GCGTACGCGTCTCGTTGCCTTGTTG AAGGAG	76	Mutagenese DDR2
DDR2 K608E fwd	GTCCTGGTGGCTGTGGAAATGCTCC GAGCAG	78	Mutagenese DDR2
DDR2 K608E rev	CTGCTCGGAGCATTCCACAGCCAC CAGGAC	78	Mutagenese DDR2
DDR1_A2272G fwd	GGAACCTCTATGCTGGGGACTATTA CCGTGTGCAG	78	Mutagenese DDR1
DDR1_A2272G rev	CTGCACACGGTAATAGTCCCAGCA TAGAGGTTCC	78	Mutagenese DDR1
DDR1 PCR fwd	ATGGGACCAGAGGCCCTGTCATCTT T	69	Colony-PCR DDR1
DDR1 PCR rev	TTCAGCACCCTCCCTCAGGGTCTCT	69	Colony-PCR DDR1
DDR2 PCR fwd	ATGATCCTGATCCCAGA	52	Colony-PCR DDR2
DDR2 PCR rev	TGTTTCCCATGACGGTTC	52	Colony-PCR DDR2
pCMV6-Entry 4897fwd	AACAAAAATTTAACGCGAAT	48	Sequenzierung pCMV6-Entry
pCMV6-Entry 832fwd	ATCAACGGGACTTTCCAAAA	54	Sequenzierung pCMV6-Entry
pCMV6-Entry 1671fwd	CCTGTCCTTCTGATTTTAAA	52	Sequenzierung pCMV6-Entry

pCMV6-Entry 2531fwd	AGCAGATTACGCGCAGAAAA	56	Sequenzierung pCMV6-Entry
pCMV6-Entry 3380fwd	ATTCGGCAAGCAGGCATCGC	63	Sequenzierung pCMV6-Entry
pCMV6-Entry 4236fwd	TCCACACCTGGTTGCTGACT	60	Sequenzierung pCMV6-Entry
Pax-5 587fwd	AGCGCAAGAGAGACGAAGGT	60	Sequenzierung PAX5
Pax-5 669rev	TGAACAAGTCTCCCCGCATC	60	Sequenzierung PAX5
c-Myb (1) 1092fwd	ACCTGAAGAAAGCGCCTCGC	63	Sequenzierung MYB
c-Myb (1) 1682fwd	CTGTGAAAACCTCAAAGGAA	52	Sequenzierung MYB
c-Myb (1) 654rev	GAGCAAAACCCATCAAATGA	54	Sequenzierung MYB
c-Myb (1 2) 585fwd	GGAAGGTTATCTGCAGGAGT	58	Sequenzierung MYB
c-Myb (2) 1288fwd	ACTGTTACAACACCATTTC	52	Sequenzierung MYB
c-Myb (2) 646rev	CCCATCAAATGACTGTTCTT	54	Sequenzierung MYB
CMV-Profor	GGCGGTAGGCGTGTA		Sequenzierung CEBPA
BGHrev	TAGAAGGCACAGTCGAGG		Sequenzierung CEBPA
CEBPA_SEQ_2F	GCTGGGCGGCATCTGCGA		Sequenzierung CEBPA
CEBPA_3R	CGTTGCTGTTCTTGCCACCGACTTCTT		Sequenzierung CEBPA
FLT3 Promote Seq fwd	GGTTGACATTGAAACCCTGCCTGT	65	Sequenzierung FLT3-Promotor
FLT3 Promote Seq rev	TGGGATCTTTGAGGCCCTGAGAAAG	67	Sequenzierung FLT3-Promotor
pGL3 Seq fwd	GCCAGAACATTTCTCTATCG	56	Sequenzierung pGL3
pRL Seq 467 rev	CCAAGTAGGAAAGTCCCGTA	58	Sequenzierung pRL-CMV
pRL Seq fwd	CTTTTGCTCACATTGCTCGA	58	Sequenzierung pRL-CMV
FLT3 Promote fwd PCR	GTAAGGGAAGAACCAGAACTGG	62	Colony-PCR FLT3-Promotor
FLT3 Promote rev PCR	GAGAAGTTGCACTGGCTCCG	63	Colony-PCR FLT3-Promotor

3.1.8 Enzyme

Tabelle 10: Verwendete Enzyme

Enzym	Anwendung	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase, <i>Calf Intestinal</i> (CIP)	Dephosphorylierung	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>PfuTurbo</i> [®] DNA-Polymerase	PCR	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Restriktionsenzyme	Restriktionsverdau	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4 DNA Ligase	Ligation	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	PCR	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen); Invitrogen [™] Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

3.1.9 Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB)

Primärantikörper	Assay	Wirt	Verdünnung	Sonstiges	Hersteller
Anti-β-Actin (AC-15) (A1978)	WB	Maus	1:20000	monoklonal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-β-Actin (AC-15) (A5441)	WB	Maus	1:5000 1:10000	monoklonal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Akt (#9272)	WB	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
C/EBP α (14AA) (sc-61 X)	WB	Kaninchen	1:200	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
c-Myb (C-19) (sc-517)	WB	Kaninchen	1:200	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
DDR1 (C-20) (sc-532)	WB	Kaninchen	1:200	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
DDR2 (#12133)	WB	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Flt-3/Flk-2 (S-18) (sc-480)	WB	Kaninchen	1:500	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
GAPDH (6C5) (sc-32233)	WB	Maus	1:200 1:800	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Pax-5 (A-11) (sc-13146)	WB	Maus	1:200	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) (#9107)	WB	Maus	1:2000	monoklonal	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-Akt (Ser473) #9271	WB	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® (#4370)	WB	Kaninchen	1:2000	monoklonal	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
p-Stat5a/b (Tyr 694) (sc-101806)	WB	Kaninchen	1:200	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
p-Tyr (PY99) (sc-7020)	WB	Maus	1:200	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Stat5 (C-17) (sc-835)	WB	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti- α -Tubulin (DM1A) (T6199)	WB	Maus	1:2000 1:40000	monoklonal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
APC Mouse Anti-Human CD45 (BD555485)	F	Maus	1:20	monoklonal	BD Biosciences, Pharmingen (San Diego, CA, USA)
APC Mouse IgG1, κ Isotypkontrolle (BD555751)	F	Maus	1:20	monoklonal	BD Biosciences, Pharmingen (San Diego, CA, USA)
CD135-PE (IM2234U)	F	Maus	1:10	monoklonal	Beckman Coulter (Marseille, F)
IgG1-FITC/IgG1-PE Isotypkontrolle (A07794)	F	Maus	1:10	monoklonal	Beckman Coulter (Marseille, F)
PE anti-human CD167a (DDR1) (51D6) (334006)	F	Maus	1:5	monoklonal	Biolegend (San Diego, CA, USA)
PE Mouse IgG3, κ Isotypkontrolle (MG3-35) (401320)	F	Maus	1:20	monoklonal	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Rabbit Anti-CD167b/DDR2, Alexa Fluor 647 konjugiert (bs-4194R-A647)	F	Kaninchen	1:100	polyklonal	Bioss (Woburn, MA, USA)
Rabbit IgG Isotypkontrolle, A647 konjugiert (bs-0295P-A647)	F	Kaninchen	1:100	polyklonal	Bioss (Woburn, MA, USA)
Rabbit Anti-CD167b/DDR2, PE konjugiert (bs-4194R-PE)	F	Kaninchen	1:100	polyklonal	Bioss (Woburn, MA, USA)

Rabbit IgG Isotypkontrolle, PE-Cy7 konjugiert (bs-0295P-PE-Cy7)	F	Kaninchen	1:100	polyklonal	Bioss (Woburn, MA, USA)
Human DDR2 (#290804) (MAB25381)	F	Maus	1:20	monoklonal	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Mouse IgG _{2B} Isotypkontrolle (#133303) (MAB0041)	F	Maus	1:20	monoklonal	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB)

Sekundär-antikörper	Assay	Wirt	Verdünnung	Hersteller
goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)	WB	Ziege	1:5000	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase (A0545)	WB	Ziege	1:20000	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Goat F(ab') ₂ Anti-mouse IgG-Allophycocyanin (F0101B)	F	Ziege	1:20	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

3.1.10 Bakterienstämme

Tabelle 13: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
DH5α	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
XL10-Gold	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

3.1.11 Zelllinien

Die Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) oder der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville) bezogen. Phoenix Eco wurden von der Firma Orbigen (San Diego, CA, USA) erworben.

Tabelle 14: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Tumor/Gewebe	Morphologie
Ba/F3	murin	pro-B Zellen	Suspension
EOL-1	human	akute myeloische Leukämie	Suspension
HEK-293	human	embryonale Nierenepithelzellen	adhärent
HEK-293T	human	embryonale Nierenepithelzellen	adhärent
HL-60	human	akute myeloische Leukämie	Suspension
Jurkat	human	akute lymphoblastische Leukämie	Suspension
K-562	human	chronische myeloische Leukämie	Suspension
KASUMI-1	human	akute myeloische Leukämie	Suspension
KG-1	human	akute myeloische Leukämie	Suspension

MOLM-13	human	akute myeloische Leukämie	Suspension
MV4-11	human	akute monozytäre Leukämie	Suspension
NB-4	human	akute promyelozytäre Leukämie	Suspension
OCI-AML3	human	akute myeloische Leukämie	Suspension
Phoenix-ECO	human	embryonale Nierenepithelzellen	adhärent
THP-1	human	akute monozytäre Leukämie	Suspension
U937	human	histiozytäres Lymphom	Suspension
WEHI-3B	murin	myelomonozytäre Leukämie	größtenteils adhärent

3.1.12 Medien und Zusätze

Tabelle 15: Verwendete Zusätze für Zell- und Bakterienkultur

Zusatz	Anwendung	Hersteller
Ampicillin	Antibiotikum (Bakterienkultur)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fetales Kälberserum (FKS)	Zusatz für Kulturmedien (Zellkultur)	Sigma-Aldrich (Steinheim); PAN (Aidenbach)
FLT3-Ligand (FL)	Zytokin (rekombinant, human)	Promocell (Heidelberg); Immunotools (Friesoythe)
Gentamicin	Antibiotikum (Zellkultur)	Lonza (Basel, CHE)
Interleukin-3 (IL-3)	Zytokin (rekombinant, murin)	BioSource International (Camarillo, CA, USA); Immunotools (Friesoythe)
Kanamycin	Antibiotikum (Bakterienkultur)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kanamycinsulfat	Antibiotikum (Bakterienkultur)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kollagen, <i>from rat-tail</i> (Typ I)	Ligand	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kollagen, <i>from human fibroblasts</i> (Typ I)	Ligand	Sigma-Aldrich (Steinheim)
LB Agar (Lennox L Agar)	Nährmedium (Bakterienkultur)	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Luria Broth (Miller's LB Broth Base)	Nährmedium (Bakterienkultur)	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Penicillin-Streptomycin	Antibiotika (Zellkultur)	Gibco, Life Technologies (Grand Island, NY, USA)
Zeocin	Antibiotika (Selektion)	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

Tabelle 16: Verwendete Nährmedien für Bakterienkultur

AXI-Platten (Blau-Weiß-Screening, Mutagenese)	LB _{Amp} -Agarplatten 20 µl X-Gal (50 ng/ml) 100 µl IPTG (0,1 M)
LB-Agar	32 g LB Agar ad 1 l Aquadest autoklavieren*

LB-Flüssigmedium	25 g Luria Broth ad 1 l Aquadest autoklavieren*
LB _{Amp} -Agarplatten	LB Agar 100 µg/ml Ampicillin
LB _{Kan} -Agarplatten	LB Agar 25 µg/ml Kanamycin
S.O.C. Medium	gebrauchsfertig von Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

*Das Autoklavieren fand bei 123°C und 2 bar für 20 Minuten statt.

Bei der Herstellung von LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum, wurde das Antibiotikum nach dem Autoklavieren des LB-Agar, aber vor dem Gießen der Platten bei einer maximalen LB-Agar-Temperatur von 50°C zugegeben.

Die Medien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Minimum Essential Medium (MEM) α, Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) GlutaMAX™ und RPMI 1640 Medium wurden von der Firma Gibco, Life Technologies (Paisley, UK) bezogen.

Tabelle 17: Verwendete Kulturmedien für Zellkultur

Zelllinie	Medium	FKS*	Penicillin	Streptomycin	Sonstige Zusätze
Ba/F3	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	10% WEHI-3B konditioniertes Medium
EOL-1	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
HEK-293	DMEM	15%	50 µg/ml	50 µg/ml	
HEK-293T	DMEM	10%	50 µg/ml	50 µg/ml	
HL-60	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
Jurkat	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
K-562	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
KASUMI-1	RPMI 1640 GlutaMAX™	20%	50 U/ml	50 µg/ml	
KG-1	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
MOLM-13	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
MV4-11	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
NB-4	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
OCI-AML3	MEM α	20%	50 U/ml	50 µg/ml	
Phoenix-ECO	DMEM	10%	50 µg/ml	50 µg/ml	
THP-1	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
U937	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	
WEHI-3B	RPMI 1640 GlutaMAX™	10%	50 U/ml	50 µg/ml	

* Das FKS wurde vor Verwendung im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert und dann steril filtriert.

3.1.13 Inhibitoren und Zytostatika

Inhibitoren und Zytostatika wurden in Pulverform oder im lyophilisierten Zustand erworben und nach Herstellerangaben gelöst. Aliquots wurden bei -20°C bzw -80°C aufbewahrt.

Tabelle 18: Verwendete Inhibitoren und Zytostatika

Inhibitor/Zytostatikum	Bemerkung	Bezugsquelle
AC220	FLT3-Inhibitor	SYNthesis med chem (Cambridge, UK) Selleck Chemicals (Houston, TX, USA)
Cytarabin	Zytostatikum	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Daunorubicin	Zytostatikum	Pfizer (Berlin)
Sorafenib	Multikinase-Inhibitor	BioCat (Heidelberg)

3.1.14 Software & Datenbanken

Tabelle 19: Verwendete Software und Datenbanken. Die aufgeführten Softwares und Datenbanken wurden zur Erhebung, Verarbeitung und Darstellung numerischer und graphischer Daten verwendet.

Software/Datenbank	Anwendung	Entwickler
Adobe Illustrator CS6	Erstellung von Grafiken	Adobe Systems (San Jose, CA, USA)
AxioVision 4.8.2.0	Bildaufnahme (Mikroskop-Software)	Carl Zeiss MicroImaging (Jena)
CellQuest 3.3	Durchflusszytometrie	Becton Dickinson (Heidelberg)
E-capt 15.06	Bildaufnahme (Agarosegel-Elektrophorese)	Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, FRA)
EndNote X6	Literaturverwaltung	Thomson Reuters (New York, NY, USA)
FlowJo 7.6.5	Durchflusszytometrie	TreeStar (Ashland, OR, USA)
ImageJ 1.48v	Bildverarbeitung, Bildanalyse	Wayne Rasband/National Institutes of Health (Bethesda, MA, USA)
MatInspector	Suche nach Transkriptionsfaktorbindestellen	Genomatix Software (München)
Microsoft Excel	Tabellenkalkulation	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Microsoft Power Point	Präsentationsprogramm	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Microsoft Word	Textverarbeitung	Microsoft (Redmond, WA, USA)
MultAlin	Multiples Sequenzalignment	Florence Corpet
QuikChange Primer Design	Mutagenese	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
SigmaPlot 12.5	wissenschaftliches Grafikprogramm, Datenanalyse, Statistik	Systat Software (San Jose, CA, USA)
Transfac®	Datenbank für Transkriptionsfaktorbindestellen	BIOBASE Biological Databases (Beverly, BA, USA)
Vector NTI Advance™ 10	Sequenzanalyse	Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Alle lentiviralen Arbeiten wurden bis zur Klärung der Lentivirenfreiheit oder Inaktivierung der Viren unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 2, alle anderen Arbeiten unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

3.2.1.2 Mediumwechsel und Subkultivierung von Monolayerkulturen

3.2.1.2.1 HEK-293, HEK-293T und Phoenix-ECO

HEK-293T und Phoenix-ECO leiten sich von HEK-293, einer humanen embryonalen Nierenepithelzelllinie ab. Die Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Bei HEK-293T und Phoenix-ECO wurde außerdem 10% fetales Kälberserum (FKS), bei HEK-293 15% FKS zugegeben. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen meist 1:4 oder 1:5 verdünnt. Dabei wurde das Zellkulturmedium entfernt und mit frischem Medium der Boden des Kulturgefäßes mehrmals abgespritzt. Dabei lösen sich die adhärenenten HEK-293, HEK-293T sowie Phoenix-ECO Zellen vom Kulturgefäßboden. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension wurde eine Vereinzelnung der Zellen gewährleistet. Meist ein Viertel oder ein Fünftel der Zellsuspension wurde in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium weiterkultiviert.

3.2.1.2.2 WEHI-3B

WEHI-3B ist eine murine myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie, die Interleukin-3 (IL-3) sekretiert. WEHI-3B Zellen wurden in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) GlutaMAX™ Medium mit 10% FKS und 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wachsen zum überwiegenden Teil adhärenent und zum anderen Teil in Suspension. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dazu wurde der Zellüberstand abgenommen und steril filtriert, da dieser bei der Kultivierung von Ba/F3 Zellen als IL-3 Quelle dient. Zum Ablösen der Trypsin-sensitiven WEHI-3B Zellen wurden die Zellen 10 Minuten mit PBS ohne Calcium und Magnesium überdeckt und anschließend mit einem Zellschaber mechanisch vom Kulturgefäßboden abgelöst. Ein Fünftel der Zellsuspension wurde in einem neuen Kulturgefäß mit frischem Medium weiterkultiviert.

3.2.1.3 Mediumwechsel und Subkultivierung von Suspensionskulturen

3.2.1.3.1 Humane Leukämie-Zelllinien

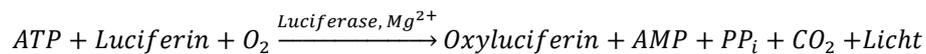
Humane Leukämie-Zelllinien außer OCI-AML3 wurden in RPMI 1640 GlutaMAX™ unter Zugabe von 10-20% FKS und 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. OCI-AML3 wurden in Minimum Essential Medium (MEM) α unter Zugabe von 20% FKS und 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zelllinien wurden zumeist entsprechend den empfohlenen Angaben der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) subkultiviert.

3.2.1.3.2 Ba/F3

Ba/F3 ist eine IL-3 abhängige, murine pro-B Zelllinie, die in RPMI 1640 GlutaMAX™ mit 10% FKS, 10% WEHI-3B konditioniertem Medium und 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin kultiviert wurde. Alle zwei bis drei Tage wurden die Ba/F3 Zellen gesplittet. Eine Zelldichte von 2,0-2,5 x 10⁶ pro Milliliter in der laufenden Kultur wurde wenn möglich nicht überschritten.

3.2.1.4 Nachweis von Mykoplasmen

Zellkulturen sind häufig mit Mykoplasmen kontaminiert. Deshalb wurden sie vor dem Einfrieren, nach dem Auftauen, sowie in regelmäßigen Abständen während des Kultivierens auf eine Mykoplasmeninfektion hin getestet. Mykoplasmen sind sehr kleine, sich selbst vermehrende Prokaryoten, die lichtmikroskopisch aufgrund ihrer Größe nur sehr schwer nachweisbar sind. Zur Untersuchung auf Mykoplasmen wurde das MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit verwendet. Das biochemische Messprinzip dieses Kits beruht auf mykoplasmatischen Enzymen, welche nach Lyse der lebenden Mykoplasmen mit dem MycoAlert® Substrat reagieren und die Umsetzung von ADP zu ATP katalysieren. Durch Messung des ATP-Levels jeweils vor und nach der Zugabe des Substrats kann ein Verhältniswert berechnet werden, der auf die An- bzw. Abwesenheit von Mykoplasmen schließen lässt. ATP-Level können über die folgende Biolumineszenz-Reaktion bestimmt werden, weil die emittierte Lichtintensität sich linear zur ATP-Konzentration verhält. Das Emissionslicht wird mit einem Luminometer gemessen.



1 ml der Zellsuspension, beziehungsweise des Zellüberstandes bei adhärent wachsenden Zelllinien wurde für fünf Minuten bei 200 rcf zentrifugiert. MycoAlert™ Reagenz und Substrat wurden 15 Minuten vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Für die Lyse wurden 25 µl des Überstandes in eine weiße 96 Well Multiwellplatte pipettiert und 25 µl des Reagenz zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die erste Messung (Messung A) in einem Luminometer. Anschließend wurden 25 µl Substrat zugegeben, für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die zweite Messung (Messung B) durchgeführt. Die Zellkultur ist frei von Mykoplasmen, wenn der Quotient Messung B/Messung A kleiner eins ist. Versuche wurden ausschließlich mit Zellkulturen durchgeführt, die frei von Mykoplasmen waren. Mit Mykoplasmen kontaminierte Zellkulturen wurden sofort entsorgt.

3.2.1.5 Kryokonservierung und Lagerung von Zellen

Um Zellen für spätere Versuche aufzubewahren, können diese bei -80°C für kurze Zeit oder in flüssigem Stickstoff über längere Zeit (mehrere Jahre) gelagert werden. Dazu wurden je nach Zelllinie zwischen 2 x 10⁶ und 8 x 10⁶ Zellen bei 300 rcf für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml Einfriermedium, bestehend entweder aus 70% Kulturmedium, 20% FKS und 10% DMSO oder aus 90% FKS und 10% DMSO resuspendiert, in ein Kryoröhrchen transferiert und in einem Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren. Das im Einfrierbehälter enthaltene Isopropanol gewährleistet eine konstante Kühlungsrate von 1°C pro Minute. Nach 24 Stunden wurden die Zellen an ihren Lagerplatz bei -80°C oder in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.1.6 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zum Auftauen im Kryoröhrchen für circa zwei Minuten in einem 37°C Wasserbad vollständig aufgetaut. Die Zellsuspension, die das zytotoxische DMSO enthält, wurde umgehend in 10 ml Kulturmedium verdünnt. Nach Zentrifugation bei 300 rcf für fünf Minuten wurde der Überstand verworfen, gegebenenfalls ein zweites Mal gewaschen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen dann in eine Kulturflasche (adhärente Zellen, Ba/F3) oder eine 24 oder 48 Well Multischale (humane Leukämie-Zelllinien) überführt. Von der Multischale aus wurden die humanen Leukämie-Zelllinien dann expandiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen vor dem Ansetzen eines Experimentes mindestens drei Tage in Kultur gehalten.

3.2.1.7 Trypanblaufärbung und Zellzahlbestimmung

Zur Untersuchung der Vitalität der Zellen wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Der Farbstoff Trypanblau kann durch die perforierte Zellmembran toter Zellen in das Zellinnere eindringen und diese dunkelblau anfärben. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen im Lichtmikroskop farblos. Die Lebendzellzahl wurde mittels Hämozytometer oder Vi-CELL™ XR bestimmt.

3.2.1.7.1 Hämozytometer

Es wurden 2 µl Zellsuspension (ggf. in entsprechender Verdünnung) mit 18 µl Trypanblau gemischt. Von dieser Mischung wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer gefüllt und die lebenden Zellen in vier Großquadraten gezählt. Mit nachfolgender Formel wurde anschließend die Lebendzellzahl pro Milliliter berechnet:

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte lebende Zellen}}{4} * \text{Vorverdünnungsfaktor} * 10^4$$

3.2.1.7.2 Vi-CELL™ XR

Das Vi-CELL™ XR ist ein Gerät, das die Trypanblaufärbung und Zellzahlbestimmung nach Zugabe der Zellsuspension (ggf. in entsprechender Verdünnung) in ein Vi-CELL® Sample Vial automatisch durchführt. Das Gerät ermittelt sowohl die Viabilität der Zellen als auch die Lebendzellzahl pro Milliliter.

3.2.1.8 Transfektion

3.2.1.8.1 Transiente Transfektion von HEK-293T und Phoenix-ECO zur Herstellung von Retrovirus-haltigem Überstand und von Ganzzelllysaten

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA in eine Wirtszelle eingeschleust. Die transiente Transfektion der Verpackungszelllinie Phoenix-ECO diente zum einen der Herstellung von Retrovirus-haltigem Überstand, welcher zur stabilen Transduktion von Ba/F3 Zellen verwendet wurde und zum anderen, wie auch die Transfektion von HEK-293T, dem Nachweis der Proteinexpression. Es wurde nach der Calciumphosphatmethode transfiziert. Hierzu wurden am Vortag der Transfektion (nachmittags) $5,2-6,5 \times 10^6$ Zellen in einer 10 cm Kulturschale in Kulturmedium ausgesät. Vier bis acht Stunden vor der Transfektion wurde ein Mediaumaustausch vollzogen. Für die Transfektion wurden 13 µg Plasmid-DNA mit autoklaviertem Aquadest auf 450 µl aufgefüllt, 50 µl einer 2 M CaCl₂-Lösung zugegeben und gemischt. Diese Mischung wurde anschließend tröpfchenweise zu 500 µl 2x phosphathaltigem HBS-Puffer pipettiert und gemischt. Nach einer Inkubation von drei bis vier

Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit den entstandenen DNA-Calciumphosphat-Präzipitaten tröpfchenweise auf die Zellen verteilt, die Kulturschale leicht geschwenkt um das Präzipitat gleichmäßig zu verteilen und für 16 Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Die Zellen nehmen in dieser Zeit die DNA über einen endozytotischen Mechanismus auf. Dann wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für einen weiteren Tag inkubiert. Wurde mittels Phoenix-ECO Zellen Retrovirus-haltiger Überstand produziert, wurde dieser abgenommen und steril filtriert. Der Retrovirus-haltige Überstand wurde entweder direkt zur stabilen Transduktion von Ba/F3 verwendet oder bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Wurden HEK-293T oder Phoenix-ECO Zellen zum Nachweis der Proteinexpression transfiziert, wurde der Überstand verworfen und die Zellen zur Herstellung von Ganzzelllysaten verwendet. Kamen Vektoren mit Fluoreszenzmarkern zum Einsatz, wurde vor der Zellyse bzw. Abnahme des Überstandes die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M überprüft. Zur Proteinexpression muss die gewünschte cDNA in einem eukaryotischen Expressionsvektor vorliegen. Für die stabile Transduktion von Ba/F3 mittels retroviralem Gentransfer wurde die cDNA über den retroviralen Expressionsvektor pMSCV-IRES-EYFP-Vektor vermittelt.

3.2.1.8.2 Transiente Transfektion von HEK-293T zur Herstellung von Lentivirus-haltigem Überstand

5 x 10⁵ HEK-293T Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in einer 75 cm² Gewebekulturflasche ausgesät. Die Zellen sollten am Folgetag zu 50-80% konfluent sein. Unmittelbar vor der Transfektion fand ein Mediaumaustausch statt. Zur Transfektion wurde das Transfektionsreagenz TurboFect verwendet, welches ebenso wie das serumfreie DMEM-Medium vor der Transfektion auf Raumtemperatur erwärmt wurde. 12 µl Turbofect wurden mit lentiviralen Verpackungsplasmiden (2,5 µg pRSV-Rev; 5 µg pMDLg/pRRE; 1,25 µg pMD2.G) sowie 2,5 µg des Transfervektors (pCDH), der die Ziel-cDNA enthält, gemischt, mit serumfreiem DMEM auf 1 ml aufgefüllt und erneut gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung tröpfchenweise zu den HEK-293T Zellen gegeben, die Gewebekulturflasche leicht geschwenkt und bei 37°C in einem CO₂-Inkubator für 72 Stunden inkubiert. Dann wurde der Lentivirus-haltige Überstand abgenommen und zehn Minuten bei 95 rcf zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Anschließend wurde der Lentivirus-haltige Überstand mittels eines Steriflip® Filters steril gefiltert und durch Ultrafiltration (maximal 15 ml Überstand pro Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, 100K) bei 2000 rcf für 23 Minuten auf circa 250 µl Filtrat konzentriert. Das aufkonzentrierte, Lentivirus-haltige Filtrat wurde sofort zur stabilen Transfektion von OCI-AML3 Zellen verwendet. Für die stabile Transduktion von OCI-AML3 Zellen mittels lentiviralem Gentransfer wurde die cDNA über den lentiviralen Expressionsvektor pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP-Vektor vermittelt.

3.2.1.8.3 Transiente Transfektion von HEK-293T für den Dual-Luciferase® Reporter Assay

Die Zellen wurden mit dem Vi-CELL™ XR gezählt, einmal für fünf Minuten bei 290 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einem entsprechenden Volumen DMEM unter Zugabe von 10% FKS resuspendiert, so dass eine Zellkonzentration von 600 Zellen pro Mikroliter vorlag. Mit einer erneuten Zellzählung mittels Vi-CELL™ XR wurde die Zellkonzentration überprüft. Für jeweils vier Replikate wurden die folgenden Ansätze in einem 1,5 ml Reagiergefäß hergestellt und mit Tris (10 mM, pH 8) auf 10 µl aufgefüllt. Die eingesetzte DNA wurde zuvor entsprechend vorverdünnt und die Konzentration im Nanodrop 1000 ermittelt.

Vektor	Negativ-kontrolle	Positiv-kontrolle	Probe 2:1	Probe 1:1	Probe 1:2
pGL3-Basic	133 ng				
pGL3-Promotor		133 ng			
pGL3-Flt3 (-901) Promotor			133 ng	133 ng	133 ng
pCMV6-Entry oder pcDNA3 mit Transkriptionsfaktor			66,5 ng	133 ng	266 ng
pRL-CMV	1,33 ng	1,33 ng	1,33 ng	1,33 ng	1,33 ng
pCMV6-Entry oder pcDNA3	266 ng	266 ng	199,5 ng	133 ng	

Jeder Ansatz wurde anschließend mit 90 µl serumfreiem DMEM Medium und 100 µl einer Lipofectamine®-Lösung gemischt. Das Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 wurde zuvor mit serumfreiem DMEM Medium 1:49 in einem Polystyren-Zentrifugenröhrchen verdünnt, gut gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann bei Raumtemperatur für 20-30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 425 µl der Zellsuspension zum Transfektionsansatz gegeben, mit Hilfe einer Pipette gut durchmischt und in insgesamt vier Wells einer weißen 96 Well Multiwellplatte je 150 µl überführt. Die Platte wurde dann für 24 Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert.

3.2.1.8.4 *Transiente Transfektion von HEK-293T im 6 Well*

Zum Expressionsnachweis der Transkriptionsfaktoren im Rahmen des Dual-Luciferase® Reporter Assays wurde die unter 3.2.1.8.3 beschriebene Transfektion „upgescaled“, um ausreichend Material zur Lysatherstellung zu erzeugen. Dabei wurden $1,5 \times 10^6$ HEK-293T Zellen in 2 ml DMEM mit 10% FKS aber ohne Antibiotika pro 6 Well ausgesät und über Nacht im CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium durch 2 ml frisches DMEM mit 10% FKS ersetzt. 4 µg DNA wurden in 250 µl serumfreiem DMEM verdünnt und gemischt. Die eingesetzte DNA wurde zuvor entsprechend vorverdünnt und die Konzentration im Nanodrop 1000 ermittelt. Die Zusammensetzung der DNA war wie folgt:

Vektor	Negativ-kontrolle	Positiv-kontrolle	Probe 2:1	Probe 1:1	Probe 1:2
pGL3-Basic	1330 ng				
pGL3-Promotor		1330 ng			
pGL3-Flt3 (-901) Promotor			1330 ng	1330 ng	1330 ng
pCMV6-Entry oder pcDNA3 mit Transkriptionsfaktor			665 ng	1330 ng	2660 ng
pRL-CMV	13,3 ng	13,3 ng	13,3 ng	13,3 ng	13,3 ng
pCMV6-Entry oder pcDNA3	2660 ng	2660 ng	1995 ng	1330 ng	

Lipofectamine® 2000 wurde 1:25 in serumfreiem DMEM verdünnt und die Mischung für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde dann mit 260 µl des verdünnten Lipofectamine® 2000 gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl der Mischung zu den Zellen gegeben und durch Kippen der Platte mit dem Medium vermengt. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen entsprechend 3.2.2.1 lysiert.

3.2.1.8.5 Stabile Transfektion von HEK-293

Zur Herstellung von HEK-293, die stabil den Wildtyp- oder einen mutierten DDR1- bzw. DDR2-Rezeptor exprimieren, wurden HEK-293 Zellen zunächst wie unter 3.2.1.8.1 beschrieben, transfiziert. Die cDNA von wildtypischem und mutiertem DDR1- bzw. DDR2-Rezeptor wurde über den Vektor pcDNA3.1/Zeo⁽⁺⁾ vermittelt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde mit einer Antibiotikaselektion begonnen, um ausschließlich das Wachstum der Zellen zu gewährleisten, die die cDNA erfolgreich in ihr Genom integriert haben. Zur Selektion wurde über einen Zeitraum von drei Wochen alle drei Tage frisches Kulturmedium mit 200 µg/ml Zeocin zu den Zellen gegeben.

3.2.1.9 Bestimmung des Lentivirustiter

Zur Bestimmung des Lentivirustiter wurden zunächst 4×10^5 HEK-293T Zellen in 2 ml Kulturmedium in einer 6 Well Gewebekulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium entfernt und frisches DMEM mit 10% FKS mit 8 µg/ml Polybren gemischt. In einer Verdünnungsreihe wurde je 1 ml der DMEM/Polybren Mischung und 10, 5 oder 2 µl Virus zu den am Vortag ausgesäten Zellen geben. Außerdem wurde stellvertretend in einem 6 Well die Zellzahl zum Infektionszeitpunkt mittels Vi-CELL™ XR bestimmt. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Virus-haltigem Medium in einem CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Virus-haltige Medium durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden schließlich durch Auf- und Abpipettieren vom Wellboden gelöst, in ein Rundbodenröhrchen überführt und im FACS der Anteil GFP-positiver Zellen bestimmt. Aus dem prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen (F), der Zellzahl zum Infektionszeitpunkt (Z) und dem Verdünnungsfaktor (V) wurde der Virustiter (T; [TU/ml]) über $T = (F \cdot Z) / V$ berechnet.

3.2.1.10 Transduktion

3.2.1.10.1 Stabile Transduktion von Ba/F3

Die stabile Transduktion von Ba/F3 Zellen mit Retrovirus-haltigem Überstand erfolgte mittels Spintransduktion. Dazu wurden $1,5 \times 10^6$ Ba/F3 Zellen in insgesamt 3 ml Kulturmedium aufgenommen und mit 6 µl Polybren-Lösung (Endkonzentration 8 µg/ml) versetzt. Nach Zugabe von 3 ml Retrovirus-haltigem Überstand wurde der Ansatz gemischt und auf zwei 6 Wells einer Gewebekulturplatte gleichmäßig aufgeteilt. Dann wurde die Platte bei 1240 rcf für 90 Minuten bei 30°C zentrifugiert und anschließend bei 37°C für 2,5 Stunden in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Schließlich wurden 3 ml frisches Kulturmedium zugegeben. Bis zur Sortierung der Zellen im FACSVantage™ SE zwei bis drei Tage später wurden die Zellen expandiert.

3.2.1.10.2 Stabile Transduktion von humanen OCI-AML3

Zur stabilen Integration von Transgenen in das Genom der OCI-AML3 Zellen wurde ein lentivirales Transduktionssystem der sogenannten dritten Generation verwendet. Die bei der Virusproduktion (3.2.1.8.2) verwendeten Verpackungsplasmide (pRSV-Rev, pMDLg/pRRE, pMD2.G) vermitteln die Information für die Bildung der Viruspartikel, nicht aber für das Verpacken ihrer RNA in die Viruspartikel, welche zur Weitergabe dieser Information nötig wäre. Nur die ausgehend vom Transfervektor (pCDH) gebildete RNA enthält diese Verpackungssignale, wird in die Viruspartikel verpackt und bei Infektion der Zielzelle in deren Genom integriert.

Damit sich die Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, wurden 29-44 Stunden vor der Transduktion $0,5 \times 10^6$ OCI-AML3 Zellen pro Milliliter

ausgesät. Am Tag der Transduktion wurde die Zellzahl mittels Hämozytometer bestimmt und die OCI-AML3 Zellen mit Kulturmedium auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt. Die Zellen wurden dann mit Polybren in einer Endkonzentration von $8 \mu\text{g/ml}$ gemischt. $75 \mu\text{l}$ des Zell-Polybren-Gemisches wurden in eine 96 Well Platte überführt und $25 \mu\text{l}$ aufkonzentriertes Lentivirus-haltiges Filtrat zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C in einem CO_2 -Inkubator inkubiert und am folgenden Tag gewaschen. Zum Waschen wurden die Zellen zunächst durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Wellboden gelöst und in ein $1,5 \text{ ml}$ Reagiergefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 110 rcf für zehn Minuten wurden $80 \mu\text{l}$ des Überstandes vorsichtig mit der Pipette abgenommen und 1 ml Kulturmedium zugegeben, um das Volumen für die erneute Zentrifugation bei 110 rcf für fünf Minuten zu erhöhen. $900 \mu\text{l}$ des Überstandes wurden vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in den verbleibenden $100 \mu\text{l}$ resuspendiert und in ein unbenutztes Well der 96 Well Platte überführt. Bis zur Sortierung der Zellen (FACSAria™IIIu Cell Sorter) an Tag fünf nach der Transduktion wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

3.2.1.11 Sortieren der Zellen mittels FACS

3.2.1.11.1 Sortierung retroviral transduzierter Zellen

Zur Fluoreszenz-Sortierung mit Hilfe des FACSVantage™ SE und der Software CellQuest 3.3 wurden die Zellen zunächst in ein Rundbodenröhrchn überführt, einmal in PBS gewaschen (Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 rcf) und in 1 ml PBS unter Zusatz von $1 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid, zur Markierung toter Zellen, resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Rundbodenröhrchen, welches $1\text{-}1,5 \text{ ml}$ Kulturmedium enthielt, sortiert. Zur Eliminierung des FACS-Puffers wurden die Zellen bei 300 rcf für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einer adäquaten Menge an frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden für eine Woche in einer Gewebekulturplatte bzw. -flasche bei 37°C inkubiert und expandiert bevor sie erneut sortiert wurden. Es wurde nur mit Zellpopulationen gearbeitet, die $>95\%$ fluoreszierende Zellen enthielten. Die Sortierung retroviral transduzierter Zellen geschah in Zusammenarbeit mit dem Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München.

3.2.1.11.2 Sortierung lentiviral transduzierter Zellen

Die Sortierung lentiviral transduzierter Zellen wurde am BD FACSAriaIII Cell Sorter in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. I. Jeremias (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 260 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 3 ml Kulturmedium, zusätzlich versetzt mit $100 \mu\text{g/ml}$ Gentamicin, resuspendiert. Anschließend wurden die GFP-positiven Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen in das sowohl 1 ml FKS als auch 1 ml mit $100 \mu\text{g/ml}$ Gentamicin versetztes Kulturmedium vorgelegt waren, sortiert. Das Volumen sortierter Zellen wurde zum anschließenden Zentrifugieren ggf. mit Medium aufgefüllt. Die sortierten Zellen wurden fünf Minuten bei 260 rcf zentrifugiert, der Überstand abgekippt, 5 ml Medium zugegeben, die Zellen erneut für fünf Minuten bei 260 rcf zentrifugiert, der Überstand wieder abgekippt und die Zellen in einem adäquaten Volumen Kulturmedium, das zusätzlich $100 \mu\text{g/ml}$ Gentamicin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in $100\text{-}200 \mu\text{l}$ Aliquots in 96 Well Kulturplatten verteilt. Die Zellen wurden expandiert und zehn Tage nach der ersten Sortierung erneut sortiert. Dazu wurden 4×10^6 Zellen (Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer) fünf Minuten bei 235 rcf zentrifugiert und in 3 ml Kulturmedium, zusätzlich versetzt mit $100 \mu\text{g/ml}$ Gentamicin,

aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben sortiert. Dann wurden sie für fünf Minuten bei 235 rcf zentrifugiert, der Überstand abgekippt, 5 ml mit 100 µg/ml Gentamicin versetztes Kulturmedium zugegeben, erneut für fünf Minuten bei 235 rcf zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 2 ml Kulturmedium, das zusätzlich 100 µg/ml Gentamicin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 1 ml in zwei 48 Wells einer Multiwellplatte überführt. Die Zellen wurden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator expandiert. Es wurde nur mit Zellpopulationen gearbeitet, die >95% fluoreszierende Zellen enthielten.

3.2.1.12 Klonierung von Zellen mittels FACS (Einzelzellsortierung)

Um Zelllinien ausgehend von einer einzelnen Zelle zu generieren (Klonierung von Zellen), kann im FACS der Flüssigkeitsstrom so eingestellt werden, dass ein Tropfen je nur eine Zelle enthält. Der Tropfen mit der Zelle kann dann so abgelenkt werden, dass je eine Zelle in ein Well einer Multiwellplatte gelangt. Dazu wurden pro 96 Well 200 µl Kulturmedium vorgelegt und bei 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden am darauffolgenden Tag in ein Rundbodenröhrchen überführt, bei 300 rcf für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in PBS resuspendiert und erneut bei 300 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen in 1 ml PBS unter Zusatz von 1 µg/ml Propidiumiodid resuspendiert. Mit dem FACSVantage SE wurde dann je eine Zelle in ein mit Medium vorgelegtes 96 Well sortiert und anschließend bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert und expandiert. Das Sortieren wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München durchgeführt.

3.2.1.13 Test auf Lentivirenfreiheit

Die lentiviral transfizierten OCI-AML3 Zellen wurden im Anschluss an die Expansion nach der ersten und zweiten Sortierung auf Virenfreiheit überprüft. Dazu wurde 1 ml Zellsuspension für fünf Minuten bei 140 rcf zentrifugiert. 150 µl zellfreier Überstand wurden mit 50 µl Lysepuffer von Roche Diagnostics (Mannheim) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben von Prof. Eberle vom Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl Virologie einem HIV-Suchtest (HIV-1/-2-Antikörper- und p24 Antigentest) unterzogen. Diese Untersuchung ist möglich, da das bei der lentiviralen Transfektion verwendete System auf HIV-1 basiert. Nur virenfreie Proben wurden dann in den S1 Laborbereich überführt. Bis zur Klärung der Virenfreiheit wurden die lentiviral transfizierten Zellen im S2 Laborbereich und unter S2 Bedingungen kultiviert.

Zellen, die vor Klärung der Virenfreiheit im S1 Laborbereich auf den Transduktionserfolg untersucht wurden, wurden zuvor für zehn Minuten mit 1% PFA behandelt. Dies führt nach Information des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl Virologie zur Inaktivierung der Viren. Nach Lifson *et al.* sind 0,5% w/v PFA ausreichend [241].

3.2.1.14 Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie

Die Expression membrangebundener Rezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Diese wurden ggf. abzentrifugiert oder ein bis zwei Mal mit PBS gewaschen (300 rcf, fünf Minuten) und der komplette Überstand entfernt. Die Zellen wurden insgesamt in 100-200 µl PBS aufgenommen, der spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper (1-20 µl)

zugegeben, gemischt und die Zellen dann mit dem Antikörper für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein bis zwei Mal mit PBS gewaschen (300 rcf, fünf Minuten) und das Zellpellet schließlich in 150-500 µl PBS resuspendiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit dem FACS Calibur. Um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurde in einem zweiten Ansatz äquivalent mit der Isotypkontrolle des zugehörigen Antikörpers verfahren. Bei der Auswertung wurden entsprechend des *Forward Scatter/Side Scatter*-Profils nur lebende Zellen berücksichtigt. Die Fluoreszenzintensität gibt die Expressionsstärke wieder und wurde mit der Software FlowJo ausgewertet. Sie wurde als *median fluorescence intensity* (MFI) angegeben und über folgende Formel quantifiziert: $MFI\text{-Ratio} = MFI_{\text{Probe}}/MFI_{\text{Isotypkontrolle}}$.

Bei Verwendung eines Primär- und Sekundäranitkörpers zur Färbung von membranständigen Rezeptoren wurde wie folgt vorgegangen. 3×10^6 Zellen wurden abzentrifugiert (300 rcf, fünf Minuten) und einmal mit PBS gewaschen. Der komplette Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert. Dann wurden 5 µl des Primäranitkörpers zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (fünf Minuten bei 250 rcf) wurde wieder der komplette Überstand entfernt, das Zellpellet in 200 µl PBS aufgenommen und 10 µl des Sekundäranitkörpers zugegeben. Nach wiederholter 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln und drei Waschschritten mit PBS (fünf Minuten bei 250 rcf) wurde das Zellpellet in 400 µl PBS resuspendiert und die Fluoreszenzmessung im FACS wie oben durchgeführt. Auch hier wurde äquivalent mit einer Isotypkontrolle verfahren.

Die Oberflächenmarker der hergestellten transgenen OCI-AML3 Zellen, sowie der nativen OCI-AML3 wurden durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurden die Marker CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD24, CD30, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41, CD42, CD45, CD45RA, CD51, CD56, CD64, CD65, CD68, CD79a, CD87, CD117 und CD235a untersucht. Es wurde eine Zellsuspension in PBS mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 100 µl hergestellt und ins Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München übergeben. Dort wurden die Färbungen entsprechend den Routinefärbungen durchgeführt.

3.2.1.15 Proliferationsexperimente

Proliferationsexperimente wurden durchgeführt, um das Zellwachstum nach einem bestimmten Zeitraum bzw. nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen festzustellen.

3.2.1.15.1 Kurzzeitproliferation

Für Kurzzeitproliferationen mit Ba/F3 Zellen wurden 4×10^4 Zellen pro Milliliter Kulturmedium ohne WEHI-3B konditioniertem Medium ausgesät. Nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C in einem CO₂-Inkubator wurde mit dem Vi-CELL™ XR die Lebendzellzahl pro Milliliter bestimmt.

Für die Kurzzeitproliferation von OCI-AML3 Zellen wurden 2×10^5 Zellen pro Milliliter Kulturmedium (0,3-20% FKS) in einer 48 Well Multischale ausgesät und nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C in einem CO₂-Inkubator die Lebendzellzahl pro Milliliter mit dem Vi-CELL™ XR bestimmt.

Um WEHI-3B konditioniertes Medium oder FKS zu entfernen, wurden die Zellen vor dem Aussäen zweimal mit PBS gewaschen (300 rcf, fünf Minuten). Je nach Fragestellung wurde den Zellen außerdem eine definierte Menge an Zytokin oder Kollagen zugesetzt.

Zum Erstellen einer Wachstumskurve der OCI-AML3 Zellen wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter Kulturmedium in einer Gewebekulturflasche ausgesät und in einem CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde jeweils ein Aliquot entnommen und mit dem Vi-CELL™ XR die Lebendzellzahl pro Milliliter bestimmt.

3.2.1.15.2 Langzeitproliferation

Für Langzeitproliferationen mit Ba/F3 Zellen wurden 3×10^5 Zellen pro Milliliter Kulturmedium ohne WEHI-3B konditioniertem Medium ausgesät. Die Zellen wurden zuvor zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen (Zentrifugation bei 300 rcf für fünf Minuten). Zu einem Ansatz (I) wurde zudem 0,1% WEHI-3B konditioniertes Medium gegeben, zu einem anderen Ansatz (II) ebenfalls 0,1% WEHI-3B konditioniertes Medium sowie 10 µg/ml Kollagen und zu einem weiteren Ansatz (III) wurden 10 ng/ml IL-3 gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator zunächst drei Tage inkubiert und täglich die Lebendzellzahl pro Milliliter mit dem Vi-CELL™ XR bestimmt. Dann wurde den Ansätzen I und II 3×10^6 Zellen entnommen, die Zellen zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und in 10 ml Kulturmedium ohne WEHI-3B konditioniertem Medium aufgenommen. Ansatz II wurde zusätzlich mit 10 µg/ml Kollagen versetzt. Alle drei Ansätze wurden weitere sechs Tage bei 37°C inkubiert und die Lebendzellzahl pro Milliliter mit dem Vi-CELL™ XR bestimmt. Ansatz III wurde bei Überschreiten einer Zelldichte von 2×10^6 pro Milliliter gesplittet.

Native OCI-AML3 wurden für Langzeitproliferationen mit je einer Linie der generierten transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien in unterschiedlichen Verhältnissen (1:10, 1:1, 10:1, 30:1, 50:1) gemischt. Alle Zellen wurden zuvor auf eine einheitliche Konzentration von entweder 1×10^6 Zellen pro Milliliter oder 5×10^5 Zellen pro Milliliter Kulturmedium eingestellt. Wurden die Zellen zum Mischen auf 1×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt, wurden die Mischungen vor der Inkubation mit Kulturmedium auf eine Endkonzentration von 5×10^5 Zellen pro Milliliter gebracht. Die Zellen wurden über mehrere Wochen bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Sie wurden idealerweise bei einer Zelldichte zwischen $0,5 \times 10^6$ und $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter kultiviert und alle zwei bis drei Tag gesplittet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen beim Splitten sehr gut durchmischt wurden. Einmal wöchentlich wurde der prozentuale Anteil fluoreszierender (transgener) Zellen an der Gesamtmenge der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden über das *Forward Scatter/Side Scatter*-Profil nur die lebenden Zellen berücksichtigt und ausgehend von der lebenden Population der prozentuale Anteil GFP-positiver und GFP-negativer Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten die reinen, ungemischten Zellen. Für eine Fragestellung wurden manche Ansätze außerdem kontinuierlich unter 20 nM AC220, einem FLT3-Inhibitor, kultiviert.

3.2.1.16 Kurzzeit-Apoptose Assay

Um die Apoptose und den Zelltod von Zelllinien nach Inkubation mit Zytostatika und Inhibitoren zu ermitteln, wurden 1×10^5 Zellen pro 100 µl in einer 96 Well Gewebekulturplatte ausgesät. Es wurden Zytostatika und Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen dazugegeben und die Zellen für 48-72 Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Für jede Substanz und Konzentration wurden Duplikate angesetzt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend wurden 90 µl der Probe in ein Rundbodenröhrchen überführt, mit 10 µl PBS unter Zusatz von 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) gemischt und im Dunkeln auf Eis bis zur Analyse des prozentualen Anteils toter

Zellen mittels Durchflusszytometer inkubiert. Aus den ermittelten Werten in Prozent wurde die spezifische Apoptose über folgende Formel berechnet:

$$\text{spezifische Apoptose [\%]} = \frac{\text{Apoptose nach Behandlung [\%]} - \text{Apoptose der Kontrolle [\%]}}{\text{Apoptose der Kontrolle [\%]}} * 100$$

Der Farbstoff Propidiumiodid kann in den Zellkern toter Zellen mit perforierter Zellmembran eindringen und dort in die DNA interkalieren. PI wird durch den Laserstrahl des Durchflusszytometers zur Fluoreszenz gebracht. Außerdem wurde die Viabilität der Zellen über das *Forward Scatter/Side Scatter*-Profil bestimmt. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) korreliert mit der Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*) mit der Granularität der Zelle abhängt. Apoptotische Zellen unterscheiden sich in ihrer Größe und Granularität von viablen Zellen und können aufgrund ihres *Forward Scatter/Side Scatter*-Profils voneinander unterschieden werden. Alle Zytostatika und Inhibitoren waren bei -20°C bzw. -80°C in Aliquots bis zu ihrer Verwendung eingefroren und wurden kurz vor dem Ansetzen des Assays bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Notwendige Vorverdünnungen wurden in Medium oder PBS hergestellt. Zur Minimierung der Toxizität überschritt die DMSO-Konzentration in den Lösemitteln der Substanzen 0,1% nicht.

In einem Versuch in dem eine Dosis-Wirkungskurve von Cytarabin und Daunorubicin erstellt wurde, wurde entsprechend verfahren. Statt 1×10^5 Zellen pro 100 µl in einer 96 Well Gewebekulturplatte wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter in einer 48 Well Multischale ausgesät. Es wurden keine Duplikate angesetzt, der Versuch jedoch in drei (Daunorubicin) bzw. vier (Cytarabin) unabhängigen Ansätzen wiederholt. Es wurden 540-1000 µl der Probe in ein Rundbodenröhrchen überführt und direkt oder nach einmaligem Waschen mit PBS gemessen. Nach dem Waschen wurden die Proben in 300 µl PBS aufgenommen. Die Proben mit Cytarabin wurden außerdem mit 1 µg/ml PI versetzt. Aufgrund der Eigenfluoreszenz von Daunorubicin wurde die spezifische Apoptose bei den Proben mit Daunorubicin nur über das *Forward Scatter/Side Scatter*-Profil bestimmt.

3.2.1.17 Apoptose-Test mit Annexin-V und 7-AAD-Färbung

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Kultur wurde das PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I von Becton Dickinson (Heidelberg) eingesetzt, bei dem apoptotische bzw. tote Zellen mit Phycoerythrin- (PE-) konjugiertem Annexin V und mit 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D) doppelt gefärbt werden. Hierzu wurden in einer 48 Well Multischale 2×10^5 Zellen in einem Milliliter Kulturmedium ausgesät und zunächst 72 Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Nach der 72-stündigen Inkubation wurden die Zellen in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen in kaltem PBS (300 rcf, fünf Minuten) wurden die Zellen in 100 µl 1x Bindepuffer resuspendiert. Für die anschließende Färbung mit Annexin V und 7-AAD wurde entsprechend den Angaben des Färbeprotokolls des Herstellers verfahren. Die Detektion der apoptotischen und toten Zellen erfolgte dann im Durchflusszytometer. Das Testprinzip beruht zum einen auf der Tatsache, dass das normalerweise am inneren Membran-Blatt angelagerte Phosphatidylserin beim Zusammenbruch der Plasmamembran-Asymmetrie in apoptotischen Zellen an das äußere Membran-Blatt umgelagert wird und folglich für Annexin V zugänglich ist. Die Zellmembran ist hierbei noch intakt. Zum anderen kann deshalb der Vitalfarbstoff 7-AAD, der nur eine beschädigte Zellmembran durchdringen kann, keine apoptotischen, sondern nur tote (spätaoptotische) Zellen anfärben. Annexin V dient hingegen als frühaoptotischer Marker und kann über seine PE-Konjugation durchflusszytometrisch (im Fluoreszenzkanal FL-2 des FACS

Calibur™) detektiert werden. 7-AAD wurde im Fluoreszenzkanal FL-3 des FACS Calibur™ detektiert. Zur korrekten Kompensation des Durchflusszytometers wurden vor jeder Messung ungefärbte bzw. einfach gefärbte Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software.

3.2.1.18 Hungern und Stimulation der Zellen vor der Zellyse

Zur Untersuchung phosphorylierter Signalproteine ist es hilfreich, die Zellen vor der Zellyse zu hungern, um den Hintergrund an unspezifisch phosphorylierten Proteinen zu reduzieren.

3.2.1.18.1 Hungern und Stimulation von Ba/F3 und OCI-AML3 mit IL-3 oder FL

6×10^7 Zellen wurden 24 Stunden vor der Lyse zwei Mal mit PBS gewaschen (300 rcf, fünf Minuten) und dann in Hungermedium (Ba/F3: RPMI 1640 GlutaMAX™ mit 0,3% FKS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin; OCI-AML3: MEM α mit 0,3% FKS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) in einer Zelldichte von 2×10^6 pro Milliliter bei 37°C im CO₂-Inkubator kultiviert. Die Hälfte der Zellen wurde direkt lysiert, während die andere Hälfte der Zellen zur spezifischen Aktivierung des Signalproteins für fünf Minuten bei 300 rcf abzentrifugiert, in 500 µl Hungermedium versetzt mit 10 ng/ml IL-3 oder 100 ng/ml FLT3-Ligand resuspendiert und für zehn Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für fünf Minuten bei 300 rcf pelletiert und ebenfalls lysiert.

3.2.1.18.2 Hungern und Stimulation von Zellen mit Kollagen

HEK-293T oder Phoenix-ECO wurden wie in 3.2.1.8.1 beschrieben transfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurde zunächst das Medium durch frisches Kulturmedium ausgewechselt. 16-21 Stunden nach der Transfektion erfolgte dann ein Mediumaustausch. Dabei wurde der Zellüberstand abgenommen, die Zellen zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und 10 ml Hungermedium (DMEM ohne FKS aber unter Zugabe von 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden 10 µg/ml Kollagen zu den Zellen zugegeben und für ein definiertes Zeitintervall bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen.

$2-4 \times 10^7$ Ba/F3 Zellen wurden 24 Stunden vor der Stimulation zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen (Zentrifugation bei 300 rcf für fünf Minuten), dann in 10-40 ml Hungermedium (RPMI 1640 GlutaMAX™ mit 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) aufgenommen und bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Entweder wurden alle Zellen vor der Lyse mit 10 µg/ml Kollagen für ein definiertes Zeitintervall bei 37°C inkubiert oder nur die Hälfte der Zellen, während die andere Hälfte der Zellen direkt (unstimuliert) lysiert wurde.

$2-4 \times 10^7$ humane Leukämie-Zelllinien wurden zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen (Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 rcf), anschließend in 10-20 ml RPMI 1640 GlutaMAX™ bzw. MEM α ohne FKS aber mit 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin aufgenommen und für drei Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Dann wurden 10 µg/ml Kollagen zugegeben, die Zellen erneut bei 37°C für 30-90 Minuten inkubiert und schließlich lysiert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen hatten sich während der Inkubation mit Kollagen dort angeheftet.

Die Zellyse erfolgte jeweils wie in 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.1.19 Adhäsionsverhalten der Zellen bei Anwesenheit von Kollagen

Native und DDR1- oder DDR2-exprimierende Ba/F3 Zellen wurden zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen (Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 rcf). Anschließend wurden 3×10^5 Zellen pro Milliliter Kulturmedium ohne WEHI-3B konditioniertem Medium ausgesät. Zu einem Ansatz (I) wurde zudem 0,1% WEHI-3B konditioniertes Medium gegeben, zu einem anderen Ansatz (II) ebenfalls 0,1% WEHI-3B konditioniertes Medium sowie $10 \mu\text{g/ml}$ Kollagen und zu einem weiteren Ansatz (III) wurden 10 ng/ml IL-3 gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C in einem CO_2 -Inkubator zunächst drei Tage inkubiert. Es wurde täglich eine fotografische Aufnahme der Zellen bei 20-facher Vergrößerung gemacht. Dann wurde den Ansätzen I und II 3×10^6 Zellen entnommen, die Zellen zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und in 10 ml Kulturmedium ohne WEHI-3B konditioniertem Medium aufgenommen. Ansatz II wurde zusätzlich mit $10 \mu\text{g/ml}$ Kollagen versetzt. Alle drei Ansätze wurden weitere sechs Tage bei 37°C inkubiert und ebenfalls täglich eine fotografische Aufnahme der Zellen bei 20-facher Vergrößerung gemacht. Ansatz III wurde bei Überschreiten einer Zelldichte von 2×10^6 pro Milliliter gesplittet.

$0,5 \times 10^6$ OCI-AML3 und HL-60, $0,4 \times 10^6$ MOLM-13, $0,2 \times 10^6$ MV4-11 und THP-1, $0,1 \times 10^6$ K-562 wurden im entsprechenden Kulturmedium ausgesät und ohne oder mit $10 \mu\text{g/ml}$ Kollagen für mehrere Tage in einem CO_2 -Inkubator bei 37°C inkubiert. Täglich wurde eine fotografische Aufnahme der Zellen bei 20-facher Vergrößerung angefertigt.

3.2.1.20 Dual-Luciferase® Reporter (DLR) Assay System

Mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System kann unter anderem die Promotoraktivität gemessen werden. Der Promotor ist dazu an ein *firefly*-Luciferasegen (Reporter) gekoppelt, dessen Expression er reguliert (Abbildung 7A). Die Promotoraktivität ist dabei abhängig von der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. Als Negativkontrolle dient ein Vektor, der zwar das Reportergen, aber keinen Promotor enthält (Abbildung 7B). Die Positivkontrolle besitzt neben dem Reportergen einen konstitutiv aktiven SV40-Promotor (Abbildung 7C). Um die experimentelle Variabilität zu minimieren, wird gleichzeitig ein zweites, unabhängiges Reportersystem ko-transfiziert. Dieses besteht aus einem konstitutiv aktiven CMV-Promotor, der die Expression eines *Renilla*-Luciferasegens reguliert (Abbildung 7D). Die experimentelle Variabilität wird hervorgerufen durch z.B. unterschiedliche Transfektionseffizienz zwischen den Proben. Die Bildung des Quotienten aus beiden Messergebnissen (*firefly*/*Renilla*) resultiert in der Normalisierung der gemessenen Promotoraktivität.

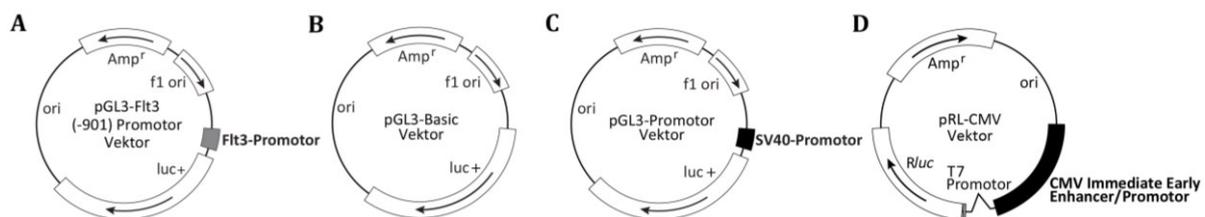


Abbildung 7: Vektorkarten der im Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendeter Vektoren. (A) pGL3-Vektor mit *Flt3*-Promotor (-901 Basen upstream der *Flt3*-Transkriptionsstartstelle [242]); (B) pGL3-Vektor ohne Promotor; (C) pGL3-Vektor mit SV40-Promotor; (D) pRL-CMV-Vektor. Nähere Erläuterungen zu den Vektoren stehen im Text oberhalb dieser Abbildung. Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung der Vektorkarten. Als Vorlage dienten die Vektorkarten des technischen Handbuchs „pGL3 Luciferase Reporter Vectors“ und des technischen Merkblatts „pRL-CMV Vector“ von Promega (Madison, WI, USA). Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase-Gen); f1 ori: phagenbasierter Replikationsursprung (*origin of replication*); ori: Replikationsursprung in *E. coli*; luc+: *firefly*-Luciferasegen; Rluc: *Renilla*-Luciferasegen; CMV: Cytomegalievirus; SV40: Simian-Virus 40

Firefly- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität können in einer Probe sequentiell bestimmt werden, da sie den Umsatz von unterschiedlichen Substraten katalysieren. Dabei wird der Probe zunächst das Substrat für die *firefly*-Luciferase (LAR II) zugegeben und die Enzymaktivität luminometrisch bestimmt. Anschließend wird ein zweites Reagenz (Stop & Glow®) zugegeben, das zum einen diese Reaktion stoppt und zum anderen das Substrat für die *Renilla*-Luciferase enthält. Das bei dieser Reaktion freiwerdende Licht wird ebenfalls luminometrisch, mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Abbildung 8 zeigt die von der *firefly*- und *Renilla*-Luciferase katalysierten Reaktionen.

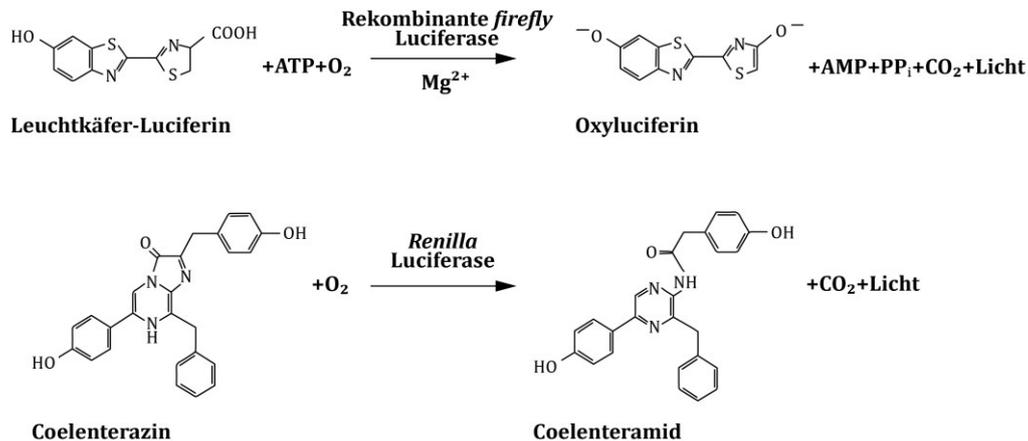


Abbildung 8: Biolumineszierende Reaktionen, katalysiert von der *firefly*- und *Renilla*-Luciferase. Abbildung gemäß dem technischen Handbuch des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems.

Bei der Durchführung des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems wurde entsprechend der im technischen Handbuch des Herstellers (Promega; Madison, WI, USA) angegebenen Protokolle verfahren. Die transfizierten HEK-293T Zellen wurden gemäß den Angaben unter 5.A./5.B. des technischen Handbuchs lysiert. Abweichend wurde statt 15 Minuten, 60 Minuten geschwenkt. Der Dual-Luciferase® Reporter Assay wurde gemäß den Angaben des Protokolls 6.A.-6.C. durchgeführt. Da das Luminometer über zwei Injektoren verfügte, wurden alle unter 6.C. beschriebenen Schritte vom Luminometer automatisiert durchgeführt. So wurden zu den 20 µl Lysat, die sich bereits in einer weißen 96 Well Multiwellplatte befanden, zunächst 100 µl LAR II gegeben. Nach erfolgter Messung wurden 100 µl Stop & Glow® hinzugefügt und die Lumineszenz erneut ermittelt.

Das Luminometer wurde 15 Minuten vor der Messung eingeschaltet. Die Schläuche und die Injektoren des Luminometers wurden vor der Messung zwei Mal mit 1 ml 80% Ethanol, vier Mal mit 1 ml Auqadest und zwei Mal mit 1 ml Luft gewaschen. Dann wurden vier Mal 150 µl der LAR II und Stop & Glow® Reagenzien angesaugt, um die Lösungen in die Schläuche vorzupumpen. Zur Minimierung der Autofluoreszenz wurde die Messung erst fünf Minuten nach Einführen der Platte ins Luminometer gestartet. Nach Beenden der Messung wurde die beschriebene Waschprozedur wiederholt.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Zur Extraktion zellulärer Proteine wurden zwischen 1×10^7 und 6×10^7 Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation bei 4°C, 300 rcf, fünf Minuten) in 200-750 µl eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Waren die Zellen zuvor mit Kollagen stimuliert worden, wurde ausschließlich PBS ohne Calcium und Magnesium verwendet. Anschließend wurde das Lysat in ein vorgekühltes 2 ml

Reagiergefäß überführt und für 30 Minuten bei 4°C auf einem Rotationsmischgerät (15 rpm) inkubiert, um eine vollständige Lyse zu erzielen. Zum Entfernen des Zelldebris wurde das Lysat bei 17000 rcf und 4°C für 30 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein vorgekühltes 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Bis zur Verwendung wurden die Lysate bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.2 Herstellung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinlysaten

Zur Abgrenzung nukleärer Proteine von zytoplasmatischen Proteinen wurde zur Herstellung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinlysaten das Qproteome® Nuclear Protein Kit von QIAGEN (Hilden) verwendet und nach dem Protokoll „*Isolation of Nuclear Proteins from Mammalian Cells*“ des Qproteome® Nuclear Protein Handbuchs verfahren. Von den im Protokoll angegebenen Volumina wurde jeweils ein Vierzigstel eingesetzt. Die vorausgehende Transfektion der Zellen wurde wie unter 3.2.1.8.4 beschrieben, durchgeführt. Es wurden jedoch nur $1,0 \times 10^6$ HEK-293T Zellen ausgesät und stellvertretend das Verhältnis von Promotor zu Transkriptionsfaktor von 1:1 untersucht.

3.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Ganzzelllysate wurde der Bradford-Test angewandt. Der Test beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 an basische und aromatische Gruppen der Proteine, welches das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm erhöht. Die Absorption bei 595 nm kann photometrisch bestimmt werden und korreliert mit der Proteinkonzentration im Lysat. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BioRad-Dye-Reagenz 1:5 und das Lysat 1:10 mit autoklaviertem Aquadest verdünnt. In einer Einmalküvette wurden dann zu 20 µl verdünntem Lysat 980 µl des Reagenz gegeben. Um die absolute Proteinkonzentration bestimmen zu können, wurde außerdem eine BSA-Protein-Standardreihe (200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml) aus je 20 µl BSA-Proteinstandard bzw. Wasser (negative Blindprobe) und 980 µl verdünntem Reagenz hergestellt. Alle Mischungen wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer (BioPhotometer) gemessen. Die absolute Proteinkonzentration ergibt sich durch Abgleich mit der negativen Blindprobe und der Standardreihe.

3.2.2.4 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation bezeichnet die Ausfällung von Protein-Antikörper-Komplexen. Es wurden 700 µg Protein eines Gesamtzelllysates eingesetzt, das Volumen mit Lysepuffer (ohne Aprotinin, PMSF und OV) auf 500 µl aufgefüllt und über Nacht mit 0,2-1,4 µg spezifischem Antikörper auf einem Rotationsmischgerät (15 rpm) bei 4°C inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte, soweit nicht anders angegeben, wurden bei 4°C durchgeführt. Dann wurden 30 µl Protein A-Agarose zur Bindung der gebildeten Komplexe zugegeben und für weitere 5 Stunden auf dem Rotationsmischgerät inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden nach dreimaligem Waschen (Zentrifugation bei 510 rcf für je 2 Minuten) mit je 1 ml Lysepuffer (ohne Aprotinin, PMSF und OV) in 30 µl Lämmli-Puffer aufgenommen und sofort bei 95°C für 5 Minuten aufgeköcht. Die Proteinanalyse erfolgte wie in SDS-PAGE (3.2.2.5), Western Blot (3.2.2.6) und Protein-Detektion (3.2.2.7) beschrieben direkt im Anschluss oder die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2.5 SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient zur elektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemisches nach dem Molekulargewicht der Proteine. Die Proteine werden durch das im Probenpuffer und im Gel enthaltene stark negativ geladene SDS denaturiert und ihre Eigenladung wird überdeckt. Beim Anlegen einer Spannung wandern die linearisierten, negativ geladenen Proteine dann nur noch in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes durch die Acrylamid-Gelmatrix in Richtung Anode. Kleinere Proteine wandern dabei schneller als Größere. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wird ein variierender Acrylamidgehalt des Trenngels von 7,5%, 10%, 12,5% oder 18% eingesetzt, für niedrig molekulare Zielproteine ein höher prozentiges Trenngel. Das Trenngel wurde in eine Gel-Kassette gegossen und mit Wasser überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Wasser abgekippt, das 4%-ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm, der die Geltaschen formt, eingesetzt. Das im Trenn- und Sammelgel enthaltene Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) führen die Polymerisation des Gels herbei. Bei der Herstellung der Gellösungen ist die Reihenfolge in der und das Verhältnis in dem die einzelnen Bestandteile gemischt werden entscheidend. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde es entweder sofort verwendet oder bis zur Verwendung binnen einer Woche im Kühlschrank bei 4°C feucht gehalten.

Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgellösungen:

Trenngel	7,5%	10%	12,5%	18%
autoklaviertes Aquadest	2,85 ml	2,19 ml	1,25 ml	50 µl
Tris-HCl Puffer (pH 8,8)	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Polyacrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	2 ml	2,66 ml	3,33 ml	4,80 ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS (10%)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Sammelgel	4%
autoklaviertes Aquadest	3 ml
Tris-HCl Puffer (pH 6,8)	1,25 ml
Polyacrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	0,65 ml
SDS (10%)	50 µl
APS (10%)	25 µl
TEMED	5 µl

In jede Geltasche wurde die gleiche Menge Proteinlysat (meist 30 µg) geladen. Die LySATproben wurden mit Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt, 1:1 mit Lämmli-Puffer gemischt und fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht. Bei der Beladung des Gels mit einem Immunpräzipitat wurden 10 µl der Probe eingesetzt und vor der Beladung für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht. Nach dem Aufköchen und vor dem Beladen des Gels wurden die Proben kurz zentrifugiert. Ein Molekulargewichtsstandard wurde jeweils in die erste Tasche eines Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Proteingelektrophoresekammer bei 65 mA durchgeführt. Wenn der Lauffrontmarker (Bromphenolblau) das untere Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

3.2.2.6 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden beim Western Blot nach dem Semi-Dry-Blot-Verfahren die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. In den Semi-Dry-Blotter wurden auf drei auf Gelgröße zugeschnittene, in Transblot-Puffer mit Methanol getränkte Blottingpapiere die zugeschnittene Nitrocellulose-Membran, darauf das Gel und dann wieder drei zugeschnittene, in Transblot-Puffer getränkte Blottingpapiere luftblasenfrei gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA für 90 Minuten.

3.2.2.7 Protein-Detektion

Der Nachweis der auf die Nitrocellulose-Membran übertragenen Proteine erfolgt mittels spezifischer Antikörper. Zunächst wurden die Banden des Molekulargewichtsstandards nach dem Blotten mit einem Bleistift markiert. Zur Überprüfung eines erfolgreichen Proteintransfers auf die Nitrocellulose-Membran wurde die Membran nach dem Transfer bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für 1-2 Minuten mit Ponceau-Lösung gefärbt. Der Farbstoff bindet an positiv geladene Aminogruppen der Proteine und kann durch anschließendes Waschen und Blockieren wieder entfernt werden. Das Waschen und Blockieren erfolgte unter Schütteln (150 rpm) bei Raumtemperatur. Gewaschen wurde durch einmaliges, kurzes Schütteln in Aquadest, blockiert dreimal für je 20 Minuten in G-Net, Rinderserumalbumin oder in 5% Milchpulver gelöst in TBST. Das Blockieren der Membran dient dem Absättigen unspezifischer Proteinbindestellen, so dass der Nachweisantikörper dort nicht binden kann. Zum Nachweis des gewünschten Proteins wurde die Membran schließlich bei 4°C auf einem Rollenmischer mit einem spezifischen Primäantikörper in G-Net, Rinderalbuminserum oder 5% Milchpulver gelöst in TBST in entsprechender Verdünnung über Nacht inkubiert. Dann wurde nach dreimaligem Waschen der Membran für je 10 Minuten mit TBST, 60 Minuten unter Schütteln mit einem speziesspezifischen, Meerrettichperoxidase- (HRP-) markierten Sekundäantikörper (Verdünnung meist 1:20000 in G-Net, Rinderalbuminserum oder 5% Milchpulver gelöst in TBST) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließenden drei Waschschritten mit TBST für je 10 Minuten erfolgte die Visualisierung. Der Sekundäantikörper bindet an den konstanten Teil des Primäantikörpers, der wiederum an das Protein gebunden ist und visualisiert mit Hilfe der Peroxidase die spezifische Proteinbindung. Dazu wurde zunächst frisch angesetzte Lösung von Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate auf die Membran gegeben, zwei bis fünf Minuten inkubiert und die Membran in eine Expositionskassette überführt. Dabei katalysiert die Peroxidase dann die Umwandlung des in der Lösung enthaltenen Luminols in ein lumineszierendes Produkt. Die lumineszierenden Signale werden mit einem Hyperfilm detektiert (Exposition bei geschlossener Kassette meist zwischen 1 Sekunde und 3 Minuten) und ggf. mit Hilfe der Software Image J quantifiziert.

3.2.2.8 Strippen der Nitrocellulosemembran

Um dieselbe Nitrocellulose-Membran zur Detektion eines anderen Proteins mit einem anderen Antikörper erneut verwenden zu können, muss der zuvor an die Membran gebundene Antikörper zunächst entfernt werden. Hierzu wurde die Membran mit Stripping-Puffer in einem Hybridisierungskubator für 40 Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal 20 Minuten mit TBST gewaschen und dann dreimal 20 Minuten mit G-Net, Rinderserumalbumin oder 5% Milchpulver gelöst in TBST blockiert. Im Anschluss konnte die Nitrocellulose-Membran mit einem neuen Primäantikörper über Nacht inkubiert werden.

3.2.2.9 Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA)

Der ELISA ist ein quantitativer Immunoassay, der auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Beim Sandwich ELISA kommen zwei antigenspezifische Antikörper zum Einsatz. Der im Überschuss eingesetzte Fängerantikörper, der am Boden einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist, bindet das Antigen. Durch Waschen werden nicht gebundene Substanzen entfernt. Durch Zugabe des Detektionsantikörpers wird dann das Antigen markiert. Wichtig ist, dass Fänger- und Detektionsantikörper spezifisch verschiedene Epitope des nachzuweisenden Antigen binden. Der Detektionsantikörper ist entweder selbst durch ein Enzym markiert oder bindet wie in diesem Fall einen Enzym-gekoppelten Sekundäantikörper. Nach Zugabe des Detektions- und Sekundäantikörpers ist jeweils ein Waschschrift nötig, um überschüssige Antikörper zu entfernen. In jedem Fall kommt es nach Substratzusatz zu einem durch das Enzym katalysierten Substratumsatz, der sich in einer Farbreaktion zeigt. Durch Zugabe einer Stopplösung wird die Enzymreaktion beendet und die bis zu diesem Zeitpunkt gebildete Farbdichte photometrisch gemessen. Die Farbdichte korreliert mit der Antigenkonzentration. Es wurde nach dem Sandwich ELISA Protokoll „C Test Procedure“ des PathScan® Phospho-FLT3 (panTyr) Sandwich ELISA Kit gearbeitet. Zum Einsatz kamen 100 µg Ganzzelllysate, welches mit autoklaviertem Aquadest auf 100 µl aufgefüllt wurde. Die Messung erfolgte mit dem ELISA-Reader Sunrise™ der Firma Tecan Austria (Grödig, AUT).

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen

Bakterien wurden bei 37°C entweder im mikrobiologischen Brutschrank auf LB-Agarplatten oder im Inkubationsschüttler in LB-Flüssigmedium gezüchtet. Die Suspensionskultur ging immer von einer einzelnen Bakterienkolonie aus, die von einer LB-Agarplatte gepickt und zur Infektion des LB-Flüssigmediums verwendet wurde. Die Selektion der Bakterien wurde durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin zum LB-Medium erzielt, da erfolgreich transformierten Bakterien durch Aufnahme des Vektors eine entsprechende Antibiotikaresistenz vermittelt wurde.

3.2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetenz von Bakterien ist die Voraussetzung für ihre Transformierbarkeit und beschreibt ihre Fähigkeit frei im Medium vorliegende DNA (z.B. Plasmidvektoren) aufzunehmen. Bakterien des *Escherichia coli*- (*E. coli*-) Stamms DH5α wurden hierzu zur Expansion auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit 10-12 Kolonien wurden dann 50 ml LB-Medium beimpft und in einer Übernachtskultur bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde zum Animpfen von 200 ml LB-Medium verwendet (OD₆₀₀ von 0,1). Bei Raumtemperatur und 200-250 rpm wurde die Bakterienkultur dann bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für zehn Minuten auf Eis abgekühlt, anschließend 15 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach erneuter zehnmütiger Inkubation auf Eis, Zentrifugation bei 4°C und 1000 g für 15 Minuten und Resuspension des Zellpellets in 20 ml eiskaltem TB-Puffer wurden 1,5 ml DMSO zugegeben und der Ansatz fünf- bis sechsmal invertiert. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in vorgekühlte 1,5 ml Reagiergefäße aliquotiert, unverzüglich in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Nutzung bei -80°C gelagert.

3.2.3.3 Chemische Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

Ein Aliquot kompetenter Bakterien wurde zunächst auf Eis aufgetaut. Es wurde ein 50 µl Ansatz bestehend aus 10 µl Ligationsansatz, 10 µl 5x KCM, 5 µl Wasser und 25 µl kompetenter Bakterien hergestellt. Bei einer ReTransformation bestand der Ansatz zumeist aus 1-3 µl Plasmid-DNA, 10 µl 5x KCM, 12-14 µl Wasser und 25 µl kompetenter Bakterien (Σ 50 µl). Das im KCM enthaltene Calciumchlorid vermittelt *E. coli*-Bakterien durch einen bisher nicht vollständig verstandenen Mechanismus künstliche Kompetenz. Der Ansatz wurde erst 20 Minuten auf Eis und dann zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl LB-Flüssigmedium wurde der Ansatz eine Stunde bei 37°C in einem Thermomixer geschüttelt. Das durch den Vektor aufgenommene Antibiotikaresistenz-Gen wird in dieser Zeit exprimiert und ermöglicht die darauffolgende Selektion erfolgreich transformierter Bakterien. Der Transformationsansatz wurde kurz abzentrifugiert, die Hälfte des Überstandes verworfen, das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert und die Bakteriensuspension zur Selektion auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert. Bei einer ReTransformation wurde oft nur die Hälfte der resuspendierten Bakteriensuspension ausplattiert. Waren über Nacht bei 37°C im Brutschrank Einzelkolonien gewachsen, konnten diese isoliert werden und zur Präparation von Plasmid-DNA weiter expandiert werden.

3.2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die in dieser Arbeit durchgeführte Plasmid-Mini- und Maxipräparation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien. Nach der Lysatklärung durch Filtration erfolgt bei Niedrigsalz-Bedingungen und entsprechendem pH-Wert die selektive Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule. Nach einem Waschschriff, ebenfalls unter Niedrigsalz-Bedingungen, wird die Plasmid-DNA durch einen Hochsalz-Puffer eluiert.

3.2.3.4.1 Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation eignet sich zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA bis 20 µg. Hierzu wurden 2 ml mit 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin versetztem LB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180-225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur in ein 2 ml Reagiergefäß überführt und die Bakterien durch dreiminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 6800 g geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde entsprechend dem Protokoll „*Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge*“ des QIAprep® Miniprep Handbuchs aus dem QIAprep Spin Miniprep Kit verfahren. Die Plasmid-DNA wurde nach Bestimmung ihrer Konzentration und Reinheit im Spektralphotometer (Nanodrop 1000) bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.4.2 Plasmid-Maxipräparation

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA bis 500 µg wurde eine Plasmid-Maxipräparation nach dem Protokoll „*Plasmid or Cosmid DNA Purification using the EndoFree Plasmid Maxi Kit*“ des EndoFree® Plasmid Purification Handbuchs durchgeführt. Von Punkt 2. des Protokolls abweichend, wurden 100 ml selektives LB-Flüssigmedium mit der 2 ml Starterkultur angeimpft. Geschüttelt wurde bei 180-250 rpm. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde in 250-500 µl TE-Puffer oder autoklaviertem Aquadest gelöst, ihre Konzentration und Reinheit im Spektralphotometer (Nanodrop 1000) gemessen und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3.5 Agarosegel-Elektrophorese

Mit der Agarosegel-Elektrophorese können unterschiedlich lange DNA-Fragmente voneinander getrennt werden. Durch Anlegen einer Spannung wird ein elektrisches Feld erzeugt, das die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung Richtung Anode wandern lässt. Da die Siebstruktur der Agarose, deren Porengröße von der Konzentration des Gels abhängt, kürzeren DNA-Fragmenten weniger Widerstand bietet, wandern kleinere DNA-Fragmente schneller als Größere. In dieser Arbeit wurde überwiegend mit 1%-igen Agarosegelen gearbeitet. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die Agarose in mit Ethidiumbromid oder SYBR® Safe versetztem 1x TAE-Puffer (1:10000) in einem Mikrowellengerät aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war, dann kurz abgekühlt und mit Hilfe eines Gelschlittens und Kammes zu einem Gel mit Taschen gegossen. Nach Erhärten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Agarosegel in der Elektrophoresekammer vollständig mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden mit 6-fach-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurde ein Größenmarker aufgetragen, der zur späteren Größenabschätzung der DNA-Fragmente der Probe dient. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer angelegten Spannung von 70-120 V. Das zugegebene Ethidiumbromid oder SYBR® Safe interagiert mit der DNA und macht diese auf einem UV-Transilluminator sichtbar.

3.2.3.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Auf einem UV-Transilluminator wurde die für Folgearbeiten bestimmte Bande aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde das DNA-Fragment aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt. Dazu wurde entsprechend dem Protokoll „*QIAquick Gel Extraction Kit using a Microcentrifuge*“ aus dem QIAquick Spin Handbuch verfahren. Die Eluierung erfolgte mit 30 µl EB-Puffer. Die Konzentration und Reinheit des extrahierten DNA-Fragmentes wurde mittels Spektralphotometer (Nanodrop 1000) bestimmt. Das Produkt wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3.7 Restriktionsverdau von DNA

Mit Hilfe eines Restriktionsverdau werden sowohl die Vektor- als auch die Insertgröße der Plasmid-DNA Konstrukte nach einer Mini- oder Maxipräparation sowie die korrekte Orientierung des Inserts im Vektor überprüft. Mit einem Restriktionsverdau werden auch Vektoren und DNA-Fragmente für eine anschließende Ligation im Rahmen einer Klonierung geschnitten.

Die ersten Ansätze eines Restriktionsverdau in dieser Arbeit enthielten:

- 2-3 µl Plasmid-Mini-DNA oder 0,5-2,7 µg Plasmid-Maxi-DNA
- 2 µl des entsprechenden 10x Restriktionspuffers
- 0,2 µl 100x BSA
- 0,5 µl eines Enzyms mit 20.000 U/ml bzw. 1 µl eines Enzyms mit 10.000 U/ml
- ad 20 µl autoklaviertes Aquadest

Standardmäßig wurde für zwei Stunden bei der im Datenblatt des Restriktionsenzym angegebenem spezifischen Temperatur verdaut.

Die Zusammensetzung des Ansatzes eines Restriktionsverdau wurde optimiert und die Inkubationszeit angepasst. Die Ansätze eines Restriktionsverdau enthielten dann:

- 0,5-3 µg DNA
- 2-5,5 µl des entsprechenden 10x Restriktionspuffers
- das berechnete Volumen [µl] der/des Restriktionsenzyme/s
- gegebenenfalls 0,2-0,55 µl 100x BSA
- 20-55 µl autoklaviertes Aquadest

Das Volumen der/des Restriktionsenzyme/s als auch die Dauer des Verdau wurde über folgenden Zusammenhang bestimmt und dabei so angepasst, dass der im Datenblatt des Restriktionsenzym angegebene Überverdau nicht überschritten wurde. Der Überverdau gibt Aufschluss über die maximale Enzymmenge bei der noch scharfe DNA-Banden im Agarosegel zu sehen sind. Der Verdau erfolgte bei der enzymespezifischen Temperatur entsprechend der Angabe im Datenblatt des Restriktionsenzym. Zur Hitzeinaktivierung der Enzyme wurde der Ansatz anschließend für 20 Minuten auf 65°C erhitzt. Die DNA-Fragmente des Restriktionsverdau wurden dann auf einem 1%-igem Agarosegel aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid oder SYBR® Safe zugesetzt. DNA-Fragmente für eine Klonierung wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt.

$$\text{Überverdau} = V_{\text{Enzym}} * t * \frac{10}{\text{Menge}_{\text{DNA}} * \frac{10}{\text{Aktivität}_{\text{Enzym}}} * \frac{K_{\text{Lambda/Adeno}}}{\text{Länge}_{\text{DNA}}} * \frac{S_{\text{DNA}}}{S_{\text{Lambda/Adeno}}}}$$

V_{Enzym} : Volumen des Restriktionsenzym in µl

t : Zeit in Stunden

$\text{Menge}_{\text{DNA}}$: DNA-Menge in µg

$\text{Aktivität}_{\text{Enzym}}$: Aktivität des Enzyms in U/ml

$K_{\text{Lambda/Adeno}}$: Konstante für Lamda-Phage (48502) oder Konstante für Adenovirus-2 (35937)

$\text{Länge}_{\text{DNA}}$: Länge der zu schneidenden DNA in Basenpaaren

S_{DNA} : Anzahl der Schnittstellen des Enzyms auf der zu schneidenden DNA

$S_{\text{Lambda/Adeno}}$: Anzahl der Schnittstellen des Enzyms auf der Lamda-Phagen- oder Adenovirus-2-DNA

3.2.3.8 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Wird ein Vektor durch Schneiden mit einem einzigen Restriktionsenzym linearisiert, entstehen kompatible Enden, die sich religieren können. Um eine Religation zu vermeiden, wird der linearisierte Vektor an seinen 5' Enden dephosphoryliert. Dazu wurde der Ansatz des Restriktionsverdau nach der Hitzeinaktivierung zunächst 30 Sekunden bei 4°C zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden 6,2 µl CIP-Puffer und 4,65 µl alkalische Phosphatase (CIP) zugegeben und bei 37°C für 30 Minuten und bei 56°C für fünf Minuten inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde schließlich 0,62 µl EDTA (0,5 M, pH 8) hinzugefügt und der Ansatz für 5 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.3.9 Blunting von DNA-Fragmenten und ihre Ligation

Um die Ligation von nicht-kompatiblen, überhängenden Enden zu ermöglichen, müssen universell kompatible, am 5' Ende phosphorylierte, glatte Enden erzeugt werden. Als Exonuklease und Polymerase wurde hierzu die T4 DNA Polymerase und zur Phosphorylierung der 5' Enden die T4 Polynukleotidkinase eingesetzt. Es wurde entsprechend des Blunting Protokolls des Quick Blunting™ Kits verfahren. Für die Ligation wurde eine Standard T4 DNA Ligase verwendet und entsprechend des Ligationsprotokolls der verwendeten T4 DNA Ligase von New England Biolabs (Frankfurt am Main) verfahren. Die Inkubation erfolgte sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 16°C über Nacht.

3.2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde dreimal bzw. fünfmal mehr Fragment als Vektor eingesetzt. Standardmäßig wurden 50 ng Vektor-DNA verwendet. Die Menge des DNA-Fragmentes berechnete sich aus folgender Formel multipliziert mit drei bzw. fünf:

$$Masse_{Fragment} [ng] = 50 [ng] * \frac{Länge_{Fragment} [bp]}{Länge_{Vektor} [bp]}$$

Außerdem enthielt der Ligationsansatz 1 µl T4 DNA Ligase, 2 µl 10x Ligase-Puffer und wurde mit autoklaviertem Aquadest auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt, kurz herunter zentrifugiert und optional bei 45°C für fünf Minuten inkubiert. Ebenso wurde eine Reaktion ohne DNA-Fragment angesetzt (Religationskontrolle). Die Ligation erfolgte dann über Nacht in einem Blockthermostat bei 16°C. Vor der Transformation wurde die Ligase für zehn Minuten bei 65°C inaktiviert. Die Lagerung der Ligationsansätze erfolgte bei -20°C.

3.2.3.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die gezielte Amplifikation eines DNA-Fragmentes, das von zwei Oligonukleotiden (Primern) flankiert ist. Die Primer sind komplementär zur Nukleotidabfolge der DNA. Die PCR ist vielseitig einsetzbar. Je nach Anwendung wurde mit einer unterschiedlichen thermostabilen DNA-Polymerase gearbeitet. Für Standardanwendungen, z.B. zur DNA-Analyse wurde die *Taq* DNA-Polymerase von PEQLAB Biotechnologie (Erlangen) oder Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Für sequenzexakte Anwendungen wie Klonierungen wurde die *PfuTurbo*® DNA-Polymerase von Stratagene (La Jolla, CA, USA) oder die Phusion® DNA-Polymerase von FINNZYMES (Espoo, FIN) mit Korrekturlese-Funktion verwendet.

Je nach Polymerase wurde der entsprechende PCR-Ansatz mit den zugehörigen Reagenzien in einem PCR Soft Tube auf Eis hergestellt. Die Ansätze wurden mittels Vortex gemischt und in den Thermocycler gestellt, in dem die temperaturstabile DNA-Polymerase durch die Anwendung des entsprechenden zyklischen Temperaturprogramms die Amplifikation der DNA bewirkt. Ein Zyklus besteht aus drei Schritten: dem Auftrennen des DNA-Doppelstrangs (Denaturierung), der spezifischen Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA (Primerhybridisierung oder Annealing genannt) und Verlängerung der Primer, bei der die DNA-Polymerase die Stränge mit Nukleotiden auffüllt (Elongation).

Die Standardansätze für die *Taq*, *PfuTurbo*® und Phusion® DNA-Polymerase sind aufgeführt.

DNA [5 ng]	x µl
10x PCR Puffer ohne MgCl ₂ (Invitrogen™)	5 µl
MgCl ₂ [0,5 mM] (Invitrogen™)	6 µl
dNTP Mix [10 mM] (Invitrogen™)	1 µl
Forward Primer [10 pmol]	1 µl
Reverse Primer [10 pmol]	1 µl
Taq DNA-Polymerase [5 U/µl] (Invitrogen™)	0,5 µl
Autoklaviertes Aquadest	ad 50 µl

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	5
Primerhybridisierung	51,9°C*	30 s	
Elongation	72°C	1 kb/min	
Denaturierung	95°C	30 s	25
Primerhybridisierung	57,5°C*	30 s	
Elongation	72°C	1 kb/min	
Terminale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlung	4°	∞	

DNA [10 ng]	x µl
10x Reaktionspuffer komplett (PEQLAB)	2,5 µl
MgCl ₂ [25 mM] (PEQLAB)	0,75 µl
dNTP Mix [10 mM] (FINNZYMES)	0,5 µl
Forward Primer [10 pmol]	0,5 µl
Reverse Primer [10 pmol]	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase [5 U/µl] (PEQLAB)	0,1 µl
Autoklaviertes Aquadest	ad 25 µl

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	30
Primerhybridisierung	42,0-69,7°C*	30 s	
Elongation	72°C	1 kb/min	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°	∞	

DNA [5 ng]	x µl
10x Reaktionspuffer Cloned <i>Pfu</i> DNA polymerase (Stratagene)	5 µl
MgCl ₂ [0,5 mM] (Invitrogen™)	2 µl
dNTP Mix [10 mM] (Invitrogen™)	1 µl
Forward Primer [10 pmol]	1 µl
Reverse Primer [10 pmol]	1 µl
<i>PfuTurbo</i> ® DNA-Polymerase [2,5 U/µl] (Stratagene)	1 µl
Autoklaviertes Aquadest	ad 50 µl

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	5
Primerhybridisierung	51,9C*	30 s	
Elongation	72°C	1 kb/min	
Denaturierung	95°C	30 s	25
Primerhybridisierung	57,5C*	30 s	
Elongation	72°C	1 kb/min	
Terminale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlung	4°	∞	

DNA [10 ng]	x µl
2x Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix mit HF Puffer (FINNZYMES)	25 µl
Forward Primer [10 pmol]	1,25 µl
Reverse Primer [10 pmol]	1,25 µl
Autoklaviertes Aquadest	ad 50 µl

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	2
Primerhybridisierung	63°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Denaturierung	95°C	30 s	2
Primerhybridisierung	61°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Denaturierung	95°C	30 s	2
Primerhybridisierung	59°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Denaturierung	95°C	30 s	30
Primerhybridisierung	58°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°	∞	

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	30-35
Primerhybridisierung	52,6-55,1°C*	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°	∞	

*abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) des verwendeten Primerpaares, meist ca. 5-10°C niedriger als die T_m oder empirisch ermittelt; Die Schmelztemperatur wurde dem Synthesereport der Primer entnommen. Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

3.2.3.12 Colony-PCR

Neben einem Restriktionsverdau ist die Colony-PCR auch eine Möglichkeit, den Erfolg einer Ligation zu überprüfen. Hierzu benötigt man jedoch ein zum Insert komplementäres Primerpaar. Der lange

Inkubationsschritt zu Beginn des Temperaturprogramms (95°C für zehn Minuten) dient dem Aufschluss der Bakterien und Zugänglichmachen der DNA. Für die Colony-PCR wurde zunächst der PCR-Ansatz in einem PCR Soft Tube auf Eis hergestellt. dNTPs waren von FINNZYMES (Espoo, FIN), Puffer, MgCl₂, und *Taq* DNA-Polymerase von PEQLAB Biotechnologie (Erlangen).

10x Reaktionspuffer komplett	2,5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	0,75-1 µl
dNTP Mix [10 mM]	0,5-2 µl
Forward Primer [10 pmol/µl]	0,5 µl
Reverse Primer [10 pmol/µl]	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,1-0,2 µl
Autoklaviertes Aquadest	ad 25 µl

Mit einer Pipettenspitze wurde dann eine Kolonie der LB-Agarplatte mit transformiertem Ligationsprodukt gepickt und die Pipettenspitze mit der Kolonie drei bis vier Mal durch Auf-und-ab-Bewegung in den Ansatz eingetaucht. Die Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert und in den Thermocycler gestellt. Nach Ablauf des Temperaturprogramms wurden die DNA-Fragmente auf einem 1%-igem Agarosegel aufgetrennt. War die PCR erfolgreich, wurde exakt die verwendete Kolonie auch für die Plasmid-Minipräparation verwendet.

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	45 s	35
Primerhybridisierung	54,2-63,2°C*	45 s	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Terminale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlung	4°	∞	

*abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) des verwendeten Primerpaares, ca. 5°C-10°C niedriger als die T_m oder empirisch ermittelt; Die Schmelztemperatur wurde dem Synthesereport der Primer entnommen. Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

3.2.3.13 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 10 kb aus PCR-Ansätzen wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet und nach dem Protokoll „QIAquick PCR Purification Kit using a Microcentrifuge“ des QIAquick Spin Handbuchs verfahren.

3.2.3.14 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese mit dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit ermöglicht das Einfügen von Punktmutationen, den Austausch von Aminosäuren sowie die Deletion oder Insertion von einzelnen oder von mehreren benachbarten Aminosäuren in doppelsträngigen Plasmiden. Zunächst wurden mit Hilfe des webbasierten QuikChange Primer Design Programms (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) ein adäquates Primerpaar, das die gewünschte Mutation enthält, entworfen. Die Synthese des Primerpaares wurde von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) durchgeführt. Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde das Protokoll des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben befolgt. Dabei wurde zunächst mit dem Primerpaar, das die gewünschte Mutation enthält, dem zu mutierenden Plasmid und einer *Proofreading*-Polymerase (*PfuUltra* HF DNA Polymerase) eine PCR durchgeführt.

Nach der PCR erfolgte ein Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI, das spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, aber nicht unmethylierte DNA (wie das PCR-Produkt) schneidet. Da die Plasmid-DNA aus Bakterien gewonnen wurde, die das *dam*-Methylierungssystem besitzen, ist die Plasmid-DNA methyliert und kann von DpnI abgebaut werden. Schließlich wurde das Gemisch in Bakterien (XL-10 Gold) transformiert, welche die PCR-Fragmente zu Plasmiden zusammenligieren und vermehren. Bei der Transformation wurde abweichend vom Protokoll statt NZY⁺ Medium, S.O.C. Medium verwendet. Mittels einer Plasmid-Minipräparation wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt und durch Sequenzieren die gewünschte Mutation im Plasmid verifiziert sowie gleichzeitig Sekundärmutationen ausgeschlossen. Außerdem wurde die Konzentration und Reinheit des extrahierten DNA-Fragmentes mittels Spektralphotometer (Nanodrop 1000) bestimmt und die mutierte Plasmid-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3.15 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Sequenz von jeder der in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-DNA wurde die Plasmid-DNA zusammen mit entsprechenden Sequenzierprimern zur Firma Sequiserve (Vaterstetten) oder zur Firma GATC Biotech (Konstanz) geschickt. Die dort ermittelten Sequenzen wurden auf eventuelle Sequenzabweichungen hin überprüft. Es wurde nur mit Plasmid-DNA gearbeitet, deren Sequenz zu 100% der gewünschten Sequenz entsprach. Auch aufgereinigte PCR Produkte wurden auf diese Art und Weise sequenziert.

3.2.3.16 Lösen von lyophilisierter Plasmid-DNA und von Plasmid-DNA aus Filterpapier

Das Gefäß mit der lyophilisierten Plasmid-DNA wurde zunächst kurz zentrifugiert und dann je nach erwarteter Konzentration in 10-100 µl autoklaviertem Aquadest gelöst und gemischt.

Beim Lösen von Plasmid-DNA aus einem Filterpapier wurde der die DNA enthaltene Bereich des Filterpapiers ausgeschnitten, in ein Reagiergefäß überführt, mit 250 µl autoklaviertem Aquadest benetzt und überdeckt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA Konzentration wurde im Spektralphotometer (Nanodrop 1000) gemessen und die Plasmid-DNA bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3.17 Isolierung von mRNA aus Zellen

Die Isolierung von mRNA aus Zellen erfolgte mit maximal 1×10^7 Zellen nach dem Protokoll „*Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology*“ des RNeasy[®] Mini Handbuchs des RNeasy Mini Kits. Zur Homogenisierung des Lysates wurden QIAshredder Säulen verwendet. Die Konzentration und Reinheit der isolierten mRNA wurde im Spektralphotometer (Nanodrop 1000) gemessen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.3.18 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Bei der Synthese von cDNA dient die aus Zellen gewonnene mRNA als Matrize. Die reverse Transkription der mRNA wurde mit dem Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit nach dem Protokoll „*RT-PCR I. First Strand cDNA Synthesis*“ des beiliegenden Handbuchs durchgeführt. Eingesetzt wurden 4-5 µg RNA und oligo (dT)₁₈ Primer. Der optionale Inkubationsschritt vor Zugabe des RT Puffers und des RevertAid[™] Premium Enzyme Mix wurde durchgeführt. Die Konzentration

und Reinheit der synthetisierten cDNA wurde im Spektralphotometer (Nanodrop 1000) gemessen. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3.19 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse und die ihr vorausgehende *Real-Time*-PCR wurden vom Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München entsprechend der dortigen diagnostischen Routineanalyse für *NPM1*-Mutationen durchgeführt. Die Schmelzkurvenanalyse dient dem Nachweis von Punktmutationen sowie kleinen Insertionen und Deletionen und der Charakterisierung der vorliegenden Allelsituation (wildtypisch, heterozygot, homozygot). An die *Real-Time*-PCR zur Amplifikation und Quantifizierung des gewünschten DNA-Fragmentes (in dieser Arbeit der die *NPM1*-Mutationen umgebende Genbereich von *NPM1* durch Verwendung von *NPM1*-spezifischen Primern) schloss sich die Schmelzkurvenanalyse an. Dabei wird die amplifizierte DNA langsam erhitzt. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen. Folglich können zur Zielsequenz komplementäre, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (Hybridisierungssonden) an die Einzelstränge binden. Um den als Messgröße dienenden Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) der Fluorochrome zu ermöglichen, binden die Hybridisierungssonden nebeneinander auf der Zielsequenz, denn nur bei ausreichender Nähe der Sonden entsteht das Fluoreszenzsignal, das während der Temperaturerhöhung kontinuierlich erfasst wird. Mit weiter zunehmender Temperatur schmelzen die Hybridisierungssonden wieder vom Amplifikat ab und die Singalintensität nimmt ab. Eine Sonde überspannt dabei die potentielle Mutationsstelle. Für die Detektion von *NPM1*-Mutationen kam eine Sonde mit Wildtypsequenz zum Einsatz. Schmelzen bei steigender Temperatur die Hybridisierungssonden wieder von der DNA ab, dissoziieren zuerst die Sonden, die an mutierte DNA-Sequenz gebunden haben, da die Bindungsenergie aufgrund der von der Mutation hervorgerufenen, nicht übereinstimmenden Basenpaare zwischen Sonde und Amplifikat geringer ist als bei Hybridisierungssonden, die an die zu 100% komplementäre Wildtypsequenz gebunden haben. Durch das Abschmelzen der Sonden wird der FRET unterbrochen und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Die Abnahme erfolgt aus eben beschriebenem Grund für perfekt gepaarte Sonden später, also bei höherer Temperatur. Abhängig von der Art des Basenaustauschs und von den benachbarten Basen verursacht eine Punktmutation eine Änderung der Abschmelztemperatur der Sonden von $2\text{-}10^{\circ}\text{C}$. Ausgangsmaterial für die *Real-Time*-PCR und Schmelzkurvenanalyse war mRNA, die aus den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde.

3.2.3.20 Fragmentlängenanalyse

Mit der Fragmentlängenanalyse können Größenunterschiede von DNA-Fragmenten bis auf eine Base genau bestimmt werden. Anwendung findet die Fragmentlängenanalyse deshalb unter anderem in der Diagnostik von bestimmten Mutationen wie zum Beispiel der *FLT3*-ITD. In dieser Arbeit wurde die Fragmentlängenanalyse zur Quantifizierung des Verhältnisses von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT eingesetzt. Dabei wurde der Quotient der Peakflächen (ITD/WT) gebildet. Berechnungsbeispiele finden sich in Abbildung 9. Für die Fragmentlängenanalyse wurde zunächst mRNA aus den transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien isoliert und in cDNA umgeschrieben (3.2.3.18). Die Fragmentlängenanalyse selbst wurde vom Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München nach den diagnostischen Standards zur Identifikation einer *FLT3*-ITD durchgeführt. Dort wurde zunächst ausgehend von der cDNA eine PCR des zu untersuchenden

Genbereichs gemacht. Bei dieser PCR wurde ein fluoreszenzmarkierter Reverse-Primer (in dieser Arbeit Farbstoff 6FAM) zur Markierung der PCR Produkte verwendet. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden anschließend in einem elektrischen Feld mit Hilfe des ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt und mittels eines Lasers detektiert. Ein mitlaufender Größenstandard (mit dem Fluoreszenzfarbstoff ROX markiert) erlaubt den Rückschluss auf die Größe des DNA-Fragmentes. Die Datenanalyse (Größenbestimmung/Quantifizierung) erfolgte mit dem Programm GeneMapper® der Firma Applied Biosystems.

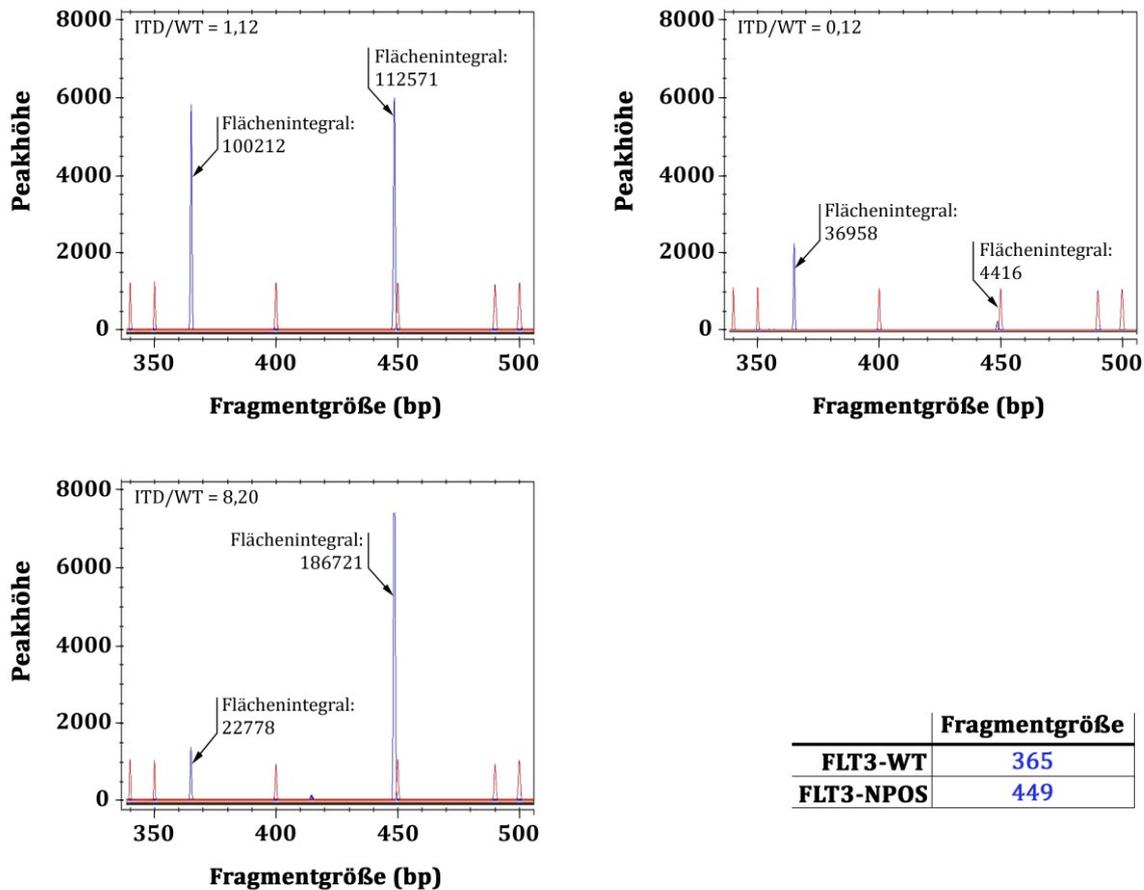


Abbildung 9: Beispiele von Elektropherogrammen von Fragmentlängenanalyse nach FLT3-ITD spezifischer PCR. Die sich ergebenden PCR-Fragmente einer Probe wurden nach ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt. Treten in einer Probe gleichzeitig FLT3-WT und eine FLT3-ITD auf, erhält man für FLT3-WT einen Peak bei 365 bp und für die FLT3-ITD bei 449 bp (blaue Peaks). Das Verhältnis der Flächenintegrale der Peaks (ITD/WT) ergibt das ITD/WT-Verhältnis. Die roten Peaks repräsentieren den Größenstandard.

3.2.4 Erhebung von Genexpressionsdaten

3.2.4.1 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) von monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien

Zum Vergleich der Genexpression von vier OCI-AML3 FLT3-ITD-low mit vier OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien wurde RNA-Seq angewandt. Dazu wurden die entsprechenden Zelllinien aufgetaut und über mehrere Tage in ihrer logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Vi-CELL™ XR bestimmt. Von jeder Zelllinie wurden eine Million Zellen für fünf Minuten bei 300 rcf und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je zwei Milliliter PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 rcf, 20°C für fünf Minuten wurde der komplette

Überstand entfernt und das Zellpellet in einem Milliliter TRIzol® bei Raumtemperatur lysiert. Dabei wurde die Suspension so lange auf- und abpipettiert bis keine Schlieren mehr zu sehen waren und eine homogene Lösung vorlag. Diese wurde in ein 2 ml Safe-Lock Tube überführt und bei -80°C schockgefroren. Die weitere Probenvorbereitung wurde von der Arbeitsgruppe Dr. H. Blum, (Genzentrum München) durchgeführt. Dort wurde die RNA mittels Chloroform isoliert und durch eine Fällung mit Ethanol gereinigt. Die RNA-Qualität wurde im Spektralphotometer, auf einem 1%-igen Agarosegel sowie im Agilent 2100 Bioanalyzer von Agilent Technologies überprüft. Außerdem wurde das ITD/WT-Verhältnis mittels Fragmentlängenanalyse (3.2.3.20) verifiziert. Gemäß des Encore® Complete RNA-Seq Library Systems von NuGEN Technologies wurde aus der RNA cDNA synthetisiert, die cDNA dann fragmentiert und die sogenannte *Library* erstellt. Dabei werden die cDNA-Fragmente mit Barcode-Adaptoren markiert, die später die Zuordnung der Daten zur entsprechenden Probe gewährleisten. Anschließend wurden eine Reinigung sowie eine Ein-Zyklus-PCR durchgeführt. Die cDNA-Ausbeute wurde mit Hilfe des Qubit® Fluorimeters von Life Technologies bestimmt, die Reinheit der cDNA im Agilent 2100 Bioanalyzer von Agilent Technologies. Es wurde nur mit einwandfreier cDNA weitergearbeitet. Die Proben wurden auf 10 nmol/l eingestellt, gemischt, mit Natronlauge denaturiert, was ein Vorliegen von einzelsträngigen *Library*-Molekülen gewährleistet und dann neutralisiert und verdünnt. Die Probe wurde auf die sogenannte *Flow Cell* hybridisiert und schließlich mit dem HiSeq 1500 von Illumina sequenziert.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch Dipl.-Math. Vindi Jurinovic vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die durchschnittliche Anzahl an gelesenen Sequenzfragmenten (*Reads*) in den acht untersuchten Proben war 26,5 Millionen (Spannweite 22,4 - 37,9 Millionen). Die RNA-Seq-Analyse wurde auf einer lokalen Galaxy Installation [243-245] am Genzentrum München durchgeführt. Basen mit einem Qualitätswert kleiner 20 an den Leserändern der Sequenzfragmente wurden eliminiert. Sequenzfragmente, die folglich kürzer als 30 Basen waren, wurden herausgefiltert. Die Positionszuordnung (*Alignment*) zum humanen Referenzgenom (UCSC Version hg19) erfolgte mit TopHat2. Die *Reads* wurden mit der Funktion „*HTSeq count*“ [246] gezählt. Um festzulegen wie Exon-überlappende *Reads* gezählt werden, wurde die Methode „*union*“ ausgewählt. Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde mit dem R-Paket DESeq [247] durchgeführt. Die p-Werte wurden mit der Benjamini-Hochberg-Methode adjustiert. Gene mit einem adjustierten p-Wert von $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3.2.4.2 Genexpressionsanalyse von *NPM1*-mutierten AML-Patientenproben mit normalem Karyotyp in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses von *FLT3*

Die Genexpressionsanalyse wurde in 91 AML-Patientenproben mit normalem Karyotyp und *NPM1*^{c+} Mutation durchgeführt, für die das Verhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT bekannt war. Das ITD/WT-Verhältnis wurde in drei Gruppen kategorisiert: Wildtyp (ITD/WT-Verhältnis gleich 0), low (ITD/WT-Verhältnis zwischen 0,01 und 0,49) und high (ITD/WT-Verhältnis $\geq 0,5$). Die Daten wurden im Rahmen der AMLCG 99 Studie (Patienten mit *de novo* AML, sekundärer AML oder Hochrisiko-MDS; ab 16 Jahren) vom Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München erhoben. Dazu wurden GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays und GeneChip® Human Genome U133A/B Arrays von Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) verwendet. Die hierzu benötigte RNA wurde aus Knochenmark oder peripherem Blut von Patienten vor Therapiebeginn gewonnen [248]. Die Hybridisierung und Bildaufnahme geschah gemäß den Herstellerprotokollen von Affymetrix. Die

Datenauswertung der vorliegenden Analyse wurde von Dipl.-Math. Vindi Jurinovic vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die differentielle Genexpression zwischen verschiedenen Gruppen wurde mit dem R-Paket *limma* [249] untersucht. p-Werte wurden nach der Benjamini-Hochberg Methode adjustiert. Alle Gene mit einem adjustierten p-Wert von $\leq 0,05$ und einem *Fold Change* von $\leq -1,5$ oder $\geq 1,5$ wurden als signifikant angenommen. Zusätzlich zur differentiellen Genexpression wurde die Assoziation zwischen dem kontinuierlichen ITD/WT-Verhältnis und der Genexpression untersucht. Hierfür wurde für jedes Gen der Einfluss des ITD/WT-Verhältnisses auf die Genexpression in einem linearen Modell untersucht. Die p-Werte aus den linearen Modellen wurden wie oben mit der Benjamini-Hochberg Methode adjustiert, und der Wert von 0,05 wurde wieder als Signifikanzniveau für die adjustierten p-Werte genommen.

3.2.4.3 Expressionsanalyse von *DDR1* und *DDR2* in AML-Patientenproben

Das Expressionsniveau von *DDR1* und *DDR2* wurde in 562 AML-Patientenproben und 10 gesunden Kontrollproben gemessen. Die Daten wurden im Rahmen der AMLCG 99 Studie (533 Patienten mit *de novo* AML, sekundärer AML oder Hochrisiko-MDS; ab 16 Jahren) und M3 AMLCG Studie (29 Patienten mit APL; 16-60 Jahre) vom Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München erhoben. Dazu wurden GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays und GeneChip® Human Genome U133A/B Arrays von Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) verwendet. Die hierzu benötigte RNA wurde aus Knochenmark oder peripherem Blut von Patienten vor Therapiebeginn gewonnen [248]. Die Hybridisierung und Bildaufnahme geschah gemäß den Herstellerprotokollen von Affymetrix. Die folgende Datenauswertung der vorliegenden Analyse wurde von Dr. Tobias Herold durchgeführt. Für die Annotation der Proben⁷ wurde GeneAnnot Version 2.0 synchronisiert mit GeneCards Version 3.04 (http://www.xlab.unimio.it/GA_CDF/) „*chip definition files*“ (CDFs) verwendet. Diese CDFs reduzieren die Gesamtzahl der Probesets (ein Probeset pro Gen) und verbessern die Spezifität der Analyse, indem Kreuzhybridisierungen von Proben eliminiert werden (Proben sind durch Sequenzspezifität limitiert). Die Normalisierung der Daten erfolgte nach der Robust Multichip Average (RMA) Methode [250]. Nur die 17389 Probesets, die auf beiden Arrays (U133 Plus 2.0 Arrays und U133 A/B Arrays) vorhanden waren, wurden in die Analyse eingeschlossen. Manche Probesets auf den U133 A/B Arrays neigen zu schwächeren Signalpegeln und höheren Standardabweichungen als die zugehörigen Probesets auf dem U133 Plus 2.0 Array. Um diesen, durch die verschiedenen Array-Designs entstandenen Effekt zu eliminieren, wurde eine zweite Normalisierung nach einer empirischen Bayes-Methode durchgeführt [251].

3.2.5 *In vivo* Arbeiten

Der *in vivo* Teil dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. I. Jeremias (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Alle Tierversuche wurden gemäß den ethischen und gesetzlichen Richtlinien des Tierschutzgesetzes und nach schriftlicher Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Nummer 55.2-1-54-2532-95-10).

⁷ Eine Probe ist eine, zu einer spezifischen mRNA komplementäre, kurze Basensequenz, die fest auf dem Array gebunden ist.

3.2.5.1 *In vivo* Modell

Es wurde mit Mäusen des immundefizienten Stamms NOD.Cg-Prdck^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, kurz NOD scid gamma (NSG) gearbeitet. Dieser Mausstamm zeichnet sich durch fehlende reife B- und T-Lymphozyten sowie durch eine gestörte Aktivität der natürlichen Killerzellen aus. Die Tiere wurden im Tierstall des Hämatologikums (Helmholtz Zentrum München) unter sterilen Bedingungen in einem 12 Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Das Alter der NSG Mäuse lag zu Beginn der Versuche zwischen 76 und 177 Tage. Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch CO₂-Begasung. Zellen der humanen AML-Zelllinie OCI-AML3, sowie der transgenen, polyklonalen Zelllinie OCI-AML3 FLT3-NPOS wurden in die Schwanzvene der Tiere injiziert. Luciferase-exprimierende OCI-AML3 Zellen (von der Arbeitsgruppe Prof. I. Jeremias (Helmholtz Zentrum München) mittels lentiviraler Transduktion hergestellt) wurden ebenfalls intravenös aber auch intrafemoral, intraperitoneal oder subkutan gespritzt.

3.2.5.2 Probenvorbereitung und Applikation der Zellen

Luciferase-exprimierende OCI-AML3 Zellen wurden sowohl intravenös (10³, 10⁵, 10⁶ oder 10⁷) als auch intrafemoral (10⁵, 10⁶), intraperitoneal (10⁶, 10⁷) oder subkutan (10⁵, 10⁶) gespritzt. Die Probenvorbereitung und Applikation dieser Zellen erfolgte in der Arbeitsgruppe Prof. I. Jeremias (Helmholtz Zentrum München).

Bei nativen OCI-AML3 und den eigens hergestellten OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen wurde auf zwei Arten verfahren: Entweder wurden native OCI-AML3 und OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen zwei Mal mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen (300 rcf, fünf Minuten), in PBS ohne Calcium und Magnesium auf die gleiche Konzentration eingestellt und im Verhältnis 10:1 und 1:1 miteinander gemischt. Dann wurden die Ansätze mit PBS ohne Calcium und Magnesium zehnfach verdünnt, um 1000 Zellen jeder Mischung in einem adäquaten Volumen entnehmen zu können. Schließlich wurde das Volumen noch mit PBS ohne Calcium und Magnesium auf 250 µl aufgefüllt. Oder die Zellen wurden mit dem Vi-CELL™ XR gezählt und je 5 x 10⁶ Zellen (Verhältnis 1:1) bzw. 9 x 10⁶ OCI-AML3 mit 1 x 10⁶ OCI-AML FLT3-NPOS (Verhältnis 10:1) gemischt. Die Mischungen wurden einmal für fünf Minuten bei 300 rcf zentrifugiert und in 1 ml PBS ohne Calcium und Magnesium resuspendiert. 10⁵ bzw. 10⁶ Zellen wurden mit PBS ohne Calcium und Magnesium auf 200 µl aufgefüllt.

Diese Ansätze wurden den Mäusen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Applikation wurde von der Arbeitsgruppe Prof. I. Jeremias (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Zur Kontrolle des Mischungsverhältnisses wurde jedem Mischansatz ein weiteres Aliquot entnommen und im FACS der prozentuale Anteil an GFP-positiven und GFP-negativen OCI-AML3 Zellen gemessen.

3.2.5.3 Isolierung von Zellen aus Knochenmark, Milz und Leber

Beim Auftreten erster Erkrankungszeichen und Lähmungserscheinungen an den Hinterläufen der Mäuse, wurden die Tiere getötet und beide Femora, die Milz sowie die Leber isoliert und in RPMI 1640 Medium oder PBS mit Antibiotikum (50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Gentamicin) aufgenommen. Die Milz und die Leber wurden anschließend jeweils durch ein 70 µm Sieb homogenisiert und die entstandene Zellsuspension in je ein 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Mit einer Schere wurden die Enden der Femora entfernt. Das Knochenmark wurde mittels einer Spritze mit PBS aus der Markhöhle der Femora gespült und durch ein 70 µm Sieb homogenisiert. Die entstandene Zellsuspension wurde ebenfalls in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen

aufgefangen. Gegebenenfalls aufgetretene Tumore wurden ebenfalls isoliert, in RPMI 1640 Medium mit Antibiotikum (50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Gentamicin) aufgenommen und durch ein 70 µm Sieb homogenisiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt.

3.2.5.4 Nachweis humaner Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung des prozentualen Anteils humaner Zellen an den aus Knochenmark, Milz, Leber und ggf. Tumor der Mäuse isolierten Zellen geschah durchflusszytometrisch. Dazu wurden die Zellen zunächst verdünnt (Knochenmark und Milz 1:2, Leber und Tumor 1:10) und die Zellzahl mittels Vi-CELL™ XR bestimmt. 5×10^5 Zellen wurden in ein Rundbodenröhrchen überführt und entweder direkt auf 195 µl mit PBS aufgefüllt oder nach Hinzufügen von PBS zur Volumenvergrößerung bei 300 rcf für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und dann in 95 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl APC-markiertem CD45 Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle wurden die Zellen für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und dann zwei Mal mit PBS gewaschen (300 rcf, fünf Minuten). Anschließend wurden die Zellen in 150-300 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil an CD45-positiven (humanen) Zellen an der Gesamtmenge der Zellen ermittelt. Es wurde auch eine ungefärbte Probe gemessen. Hierbei wurden 5×10^5 Zellen entweder direkt auf 200 µl mit PBS aufgefüllt oder nach Hinzufügen von PBS bei 300 rcf für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und dann in 200 µl PBS resuspendiert.

3.2.5.5 *In vivo* Bildgebung

Mäuse denen Luciferase-exprimierende OCI-AML3 Zellen injiziert wurden, konnten der Biolumineszenzbildgebung, dem sogenannten *Imagen* zugeführt werden. Dafür wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran narkotisiert und in Rückenlage an den Hinterextremitäten und mit Hilfe eines Inhalationsschlauches fixiert. Ihnen wurde D-Luziferin (150 mg/kg), das Substrat für die in den OCI-AML3 Zellen exprimierte Luciferase, intraperitoneal injiziert. Direkt nach der Injektion wurden für 30 Sekunden die Bilder im IVIS Lumina II Imaging System (PerkinElmer) aufgenommen. Mit der Living Image Software 4.X von PerkinElmer wurden die Aufnahmen ausgewertet. Zur Quantifizierung des Lichtsignals wurde die sogenannte ROI (*region of interest*) festgelegt. Im Vorversuch zur Klärung der geeignetsten Applikationsroute der OCI-AML3 Zellen wurden die Mäuse an Tag 13, 20 und 25 nach Applikation der Zellen geimaged. Im Vorversuch zur Zellzahl das erste Mal sieben Tage nach Applikation, dann alle zwei bis drei Tage, spätestens nach vier Tagen. Die *in vivo* Bildgebung wurde von der Arbeitsgruppe I. Jeremias (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt.

3.2.6 Statistik

Das Vorliegen statistischer Signifikanzen wurde je nach Hypothese mittels *One way ANOVA*, *Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks*, ungepaartem t-Test oder *Mann-Whitney Rank Sum Test* ermittelt. Der p-Wert wurde als zweiseitiger p-Wert berechnet. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der funktionellen Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen in der AML

AML-Patienten mit einer *NPM1*-Mutation zeigen einen günstigen Krankheitsverlauf. Tragen diese Patienten jedoch zusätzlich eine *FLT3*-ITD verschlechtert sich der Krankheitsverlauf erheblich [26, 222, 224]. Es wurde untersucht, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen den beiden Mutationen besteht. Hierzu wurde ein zelluläres Modellsystem etabliert, welches den Genotyp *NPM1c+/FLT3-WT* bzw. den Genotyp *NPM1c+/FLT3-ITD* repräsentiert.

4.1.1 Etablierung des zellulären Modellsystems

4.1.1.1 Optimierung des lentiviralen Transduktionsprotokolls

Um die Effizienz der lentiviralen Transduktion zu verbessern, wurde das Transduktionsprotokoll aufwändig optimiert. Die Optimierung fand im 96 Well Format statt. Es wurden Gewebekulturplatten mit Flachboden verwendet, da Vorversuche ergaben, dass OCI-AML3 Zellen darin grundsätzlich besser wachsen als in Rundbodenwells. Zur Optimierung wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Damit die OCI-AML3 Zellen sich zum Zeitpunkt der Transduktion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden 29-44 Stunden zuvor $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter ausgesät.
- Im Allgemeinen wurde mit aufkonzentriertem Virusüberstand im Vergleich zu nicht aufkonzentriertem Virusüberstand eine höhere Transduktionseffizienz erzielt. Dabei sollten 15 ml Virusüberstand auf 200-250 μ l aufkonzentriert werden. Zudem erzielte frischer im Vergleich zu einmal eingefrorenem Virusüberstand ebenfalls ein besseres Ergebnis.
- Eine größere Menge an Virusüberstand führte nicht unbedingt zu einer besseren Transduktionseffizienz. Hierbei spielte das Verhältnis der verwendeten Zellzahl zur eingesetzten Virusmenge eine Rolle. Ein Optimum ergab sich für $0,75 \times 10^6$ Zellen und 25 μ l Virusüberstand (aufkonzentriert, frisch) in einem Gesamtvolumen von 100 μ l.
- Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Transduktionseffizienz und der verwendeten Konzentration des Transduktionsreagenz Polybren. Es wurden Konzentrationen zwischen 3-8 μ g/ml getestet und schließlich mit 8 μ g/ml gearbeitet.
- Eine Verlängerung der Inkubationszeit der Zellen mit Virusüberstand von 24 auf 48 Stunden brachte keine oder nur eine geringe Verbesserung der Transduktionseffizienz (maximal um den Faktor 1,6). Folglich wurden die Zellen 24 Stunden mit Virusüberstand inkubiert.
- Da im Vergleich zu einer einmaligen Infektion der Zellen mit Virusüberstand eine Mehrfachinfektion (drei Infektionen im Abstand von je 24 Stunden) die Effizienz der Transduktion fünf Tage nach der ersten Infektion nur um den Faktor 1,1 erhöhte, wurde auf mehrmalige Infektion verzichtet.
- Um toxische Effekte, die möglicherweise von FLT3 ausgehen, als Ursache für die anfänglich schlechte Transduktionseffizienz auszuschließen, wurden die Zellen nach der Transduktion für mehrere Tage mit 50 nM des FLT3-Inhibitors AC220 kultiviert. Toxische Effekte ausgehend von FLT3 konnten ausgeschlossen werden, da diese Maßnahme zu keiner Erhöhung der Transduktionseffizienz führte. Ein Vorversuch ergab, dass OCI-AML3 Zellen bis zu einer Konzentration von 1 μ M AC220 keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen bezüglich ihres Apoptoseverhaltens zeigten.

- Vorversuche zeigten, dass OCI-AML3 Zellen sowohl eine 90-minütige Zentrifugation bei 30°C und 1200 g als auch eine zweistündige Inkubation bei 4°C gut tolerierten. Eine Spintransduktion der OCI-AML3 Zellen, in Anlehnung an ein aus der Literatur bekanntem Beispiel [252], erbrachte keine Verbesserung der Transduktionseffizienz. Auch eine im Handbuch des Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit von GeneCopoeia empfohlene zweistündige Inkubation der Zellen mit Lentivirusüberstand bei niedrigen Temperaturen (hier: 4°C) vor Inkubation bei 37°C führte zu keiner deutlichen Verbesserung der Transduktionseffizienz. Beide Maßnahmen wurden nicht in das Protokoll aufgenommen.
- Nur einmaliges Waschen der Zellen 24 Stunden nach der Transduktion führte fünf bis sechs Tage nach der Transduktion zu höheren Transduktionseffizienzen als entweder mehrmaliges Waschen nach 24 Stunden oder einmaliges Waschen nach 24 Stunden und wiederholtes Waschen drei bis sechs Tage nach der Transduktion. Beim einmaligen Waschen wurde Kulturmedium verwendet.
- OCI-AML3 Zellen sind viabler, wenn sie dichter ($0,5-2,0 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter) kultiviert werden. Deshalb hat sich in den Folgetagen der Transduktion eine Kultivierung der Zellen in 100 µl Medium im 96 Well bewährt.

Diese Optimierungsschritte mündeten in das unter 3.2.1.10.2 beschriebene Protokoll, welches zur Herstellung der transgenen OCI-AML3 Zelllinien verwendet wurde. Der Lentivirustiter des hergestellten Virusüberstands wurde wie unter 3.2.1.9 beschrieben, berechnet. Es wurde ein Wert von $8,7 \times 10^6$ TU/ml erzielt. Eine Optimierung des Protokolls zur Virusherstellung war nicht erforderlich.

4.1.1.2 Herstellung transgener OCI-AML3 Zelllinien

Als Modellsystem zur Untersuchung der funktionellen Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen wurde die humane AML-Zelllinie OCI-AML3 verwendet. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine heterozygote Exon-12-Mutation (Mutation A) im *NPM1*-Gen aus, welche zur aberranten zytoplasmatischen *NPM1*-Expression führt [253]. Die zytoplasmatische Mislokalisierung des mutierten *NPM1*-Proteins ist das charakteristische Merkmal einer primären AML mit *NPM1*-Mutation (*NPM1c+*) [221]. Ferner exprimieren OCI-AML3 Zellen endogen den wildtypischen *FLT3*-Rezeptor [88]. Deshalb wurde *FLT3*-ITD-cDNA mit Hilfe lentiviraler Transduktion stabil in das Zellgenom integriert (siehe Abbildung 10). Stellvertretend für alle *FLT3*-ITDs wurde mit der sogenannten NPOS Längenmutation gearbeitet. Diese Längenmutation besteht aus einer duplizierten Sequenz von 28 Aminosäuren, die sich zwischen den Aminosäuren 610 und 611 des wildtypischen *FLT3*-Rezeptors befinden (siehe Abbildung 2) [37, 84].

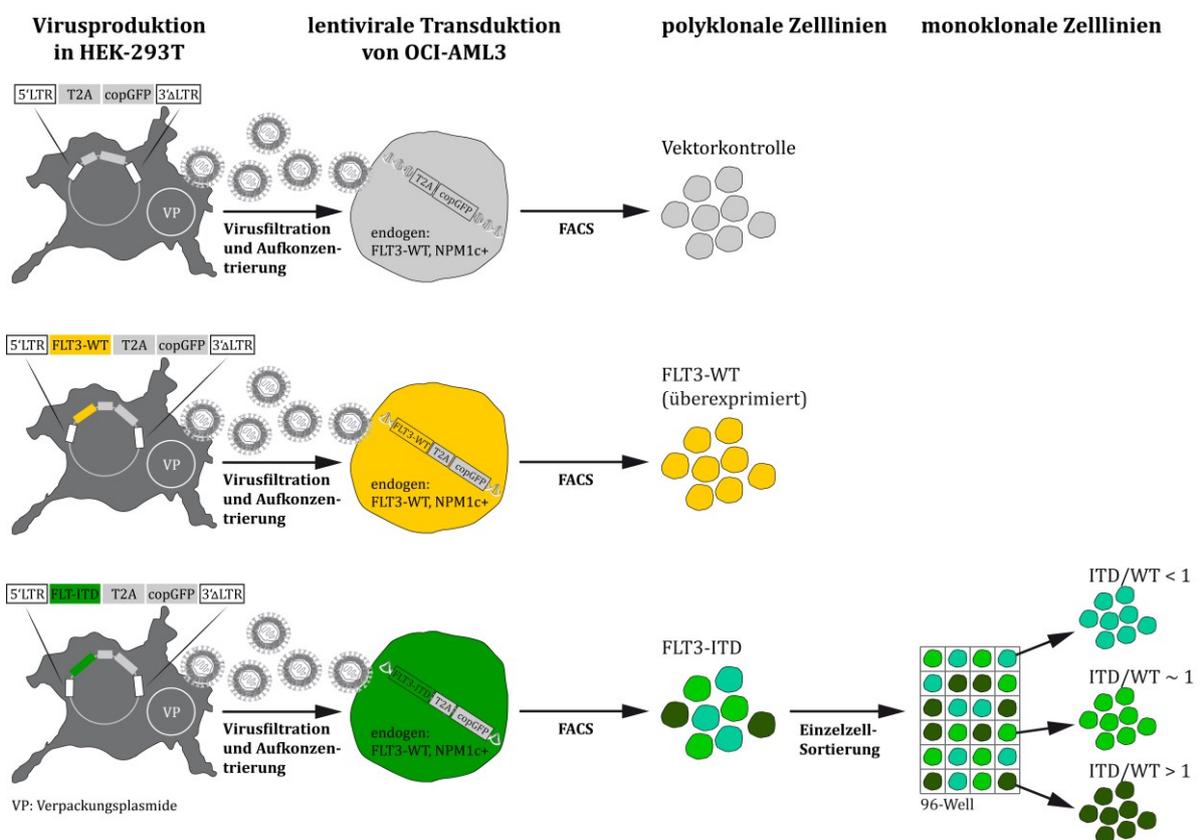


Abbildung 10: Arbeitsablauf zum Aufbau des OCI-AML3 Modellsystems. Nach Klonierung der cDNA von *FLT3*-WT und einer *FLT3*-ITD (NPOS) in den lentiviralen Expressionsvektor pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP (im Folgenden kurz pCDH genannt), wurden in HEK-293T Zellen Lentiviren produziert, die den Vektor mit der cDNA enthielten. Mit den Lentiviren wurden OCI-AML3 Zellen infiziert. Dabei wurde die *FLT3*-cDNA von den Viren stabil in das Genom der OCI-AML3 Zellen integriert. Nach Sortieren der Zellen wurden diese für Experimente eingesetzt. Zur Generierung einer Vektorkontrolle wurde der pCDH-Leervektor integriert. Des Weiteren wurde ausgehend von polyklonalen OCI-AML3 *FLT3*-NPOS Zellen durch eine Einzelzellsortierung monoklonale OCI-AML3 *FLT3*-NPOS Zelllinien (im Folgenden OCI-AML3 *FLT3*-ITD genannt) mit unterschiedlichen Verhältnissen von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT (ITD/WT) hergestellt.

Die Prognose bei NK-AML-Patienten wird nicht nur vom Vorhandensein einer *FLT3*-ITD *per se* bestimmt. Besonders das Allelverhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT beeinflusst den Krankheitsverlauf erheblich [240]. Deshalb wurde ausgehend von polyklonalen OCI-AML3 *FLT3*-NPOS Zellen eine Einzelzellsortierung durchgeführt und monoklonale OCI-AML3 *FLT3*-NPOS Zelllinien (im Folgenden OCI-AML3 *FLT3*-ITD genannt) mit unterschiedlichen Verhältnissen von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT (ITD/WT)

generiert. Unter den Annahmen, dass OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen je nach Anzahl der Lentiviren von denen sie infiziert wurden und je nach Integrationsort des Transgens im Zellgenom, eine unterschiedlich starke Expression des FLT3-NPOS-Rezeptors zeigen, war es möglich, monoklonale OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien mit unterschiedlichen Verhältnissen von transgenem *FLT3*-NPOS zu endogenem *FLT3*-WT herzustellen. Es konnten monoklonale OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien mit einem breiten Spektrum an ITD/WT-Verhältnissen erzeugt werden (siehe Abbildung 11).

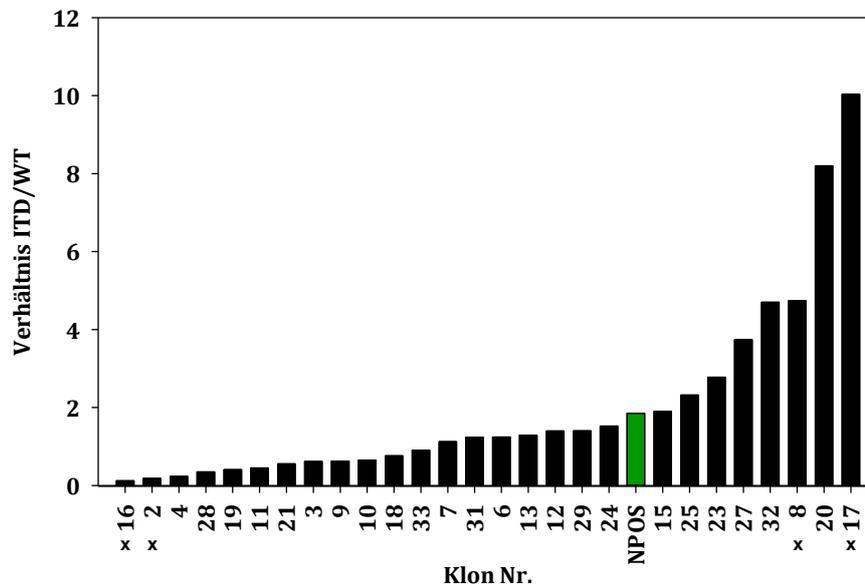


Abbildung 11: ITD/WT-Verhältnis der monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien. Aus monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien wurde mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels Fragmentlängenanalyse und der unter 3.2.3.20 beschriebenen Berechnungsmethode wurde das ITD/WT-Verhältnis bestimmt. Zur Durchführung von Versuchen wurden die mit x gekennzeichneten monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien stellvertretend für Zelllinien mit niedrigem (Klon Nr. 16 und 2), ausgewogenem (Klon Nr. 33 und 7) und hohem (Klon Nr. 8 und 17) ITD/WT-Verhältnis ausgewählt. Sie werden im Folgenden als FLT3-ITD-low (2), FLT3-ITD-low (16), FLT3-ITD-equal (7), FLT3-ITD-equal (33), FLT3-ITD-high (8) und FLT3-ITD-high (17) bezeichnet. Der grüne Balken zeigt außerdem das ITD/WT-Verhältnis der polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen.

4.1.2 Überprüfung des zellulären Modellsystems

Das Vorhandensein der *NPM1*-Mutation wurde kontrolliert und die Rezeptoren FLT3-WT sowie FLT3-NPOS auf ihre Funktionalität hin überprüft. Außerdem wurde die Stabilität des ITD/WT-Verhältnisses regelmäßig verifiziert.

4.1.2.1 Bestätigung der *NPM1*-Mutation A in den OCI-AML3

Der Nachweis der endogenen *NPM1*-Mutation in den nativen OCI-AML3 und den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien erfolgte mittels Schmelzkurvenanalyse. Bei der Schmelzkurvenanalyse wurden zwei Fluorochrom-konjugierten Sonden verwendet, die über dem potentiell mutierten Bereich der Mutation A des *NPM1*-Gens liegen. Bei langsamer Erhöhung der Temperatur wird eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenz durchgeführt, die das Abschmelzverhalten der Sonden vom Amplifikat aufzeichnet. Da zur Wildtypsequenz komplementäre Sonden eingesetzt wurden, dissoziieren die Sonden, die an mutierte Sequenz gebunden haben bei etwas niedrigerer Temperatur als die perfekt an die Wildtypsequenz gebundenen Sonden aufgrund der geringeren Bindungsenergie. Beim Abschmelzen wird das Fluoreszenzsignal zwischen den beiden Sonden

unterbrochen und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Das Prinzip der Schmelzkurvenanalyse ist unter 3.2.3.19 ausführlich beschrieben.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten den typischen Schmelzkurvenverlauf einer *NPM1*-Mutation A, der bedingt durch die heterozygote Natur der *NPM1*-Mutation zu einer Kurve mit zwei lokalen Maxima führt (siehe Abbildung 12A). Das Ergebnis dieser Schmelzkurvenanalyse wurde durch Sequenzierung nochmals bestätigt (siehe Abbildung 12B). Auch die Sequenzierung zeigte, dass sowohl native OCI-AML3 als auch die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien die erwartete, heterozygote *NPM1*-Mutation A, welche von einer 4-Basen-Duplikation (TCTG) gebildet wird, enthalten. Die Sequenz zeigt auch die durch die 4-Basen-Insertion hervorgerufene Rasterverschiebung.

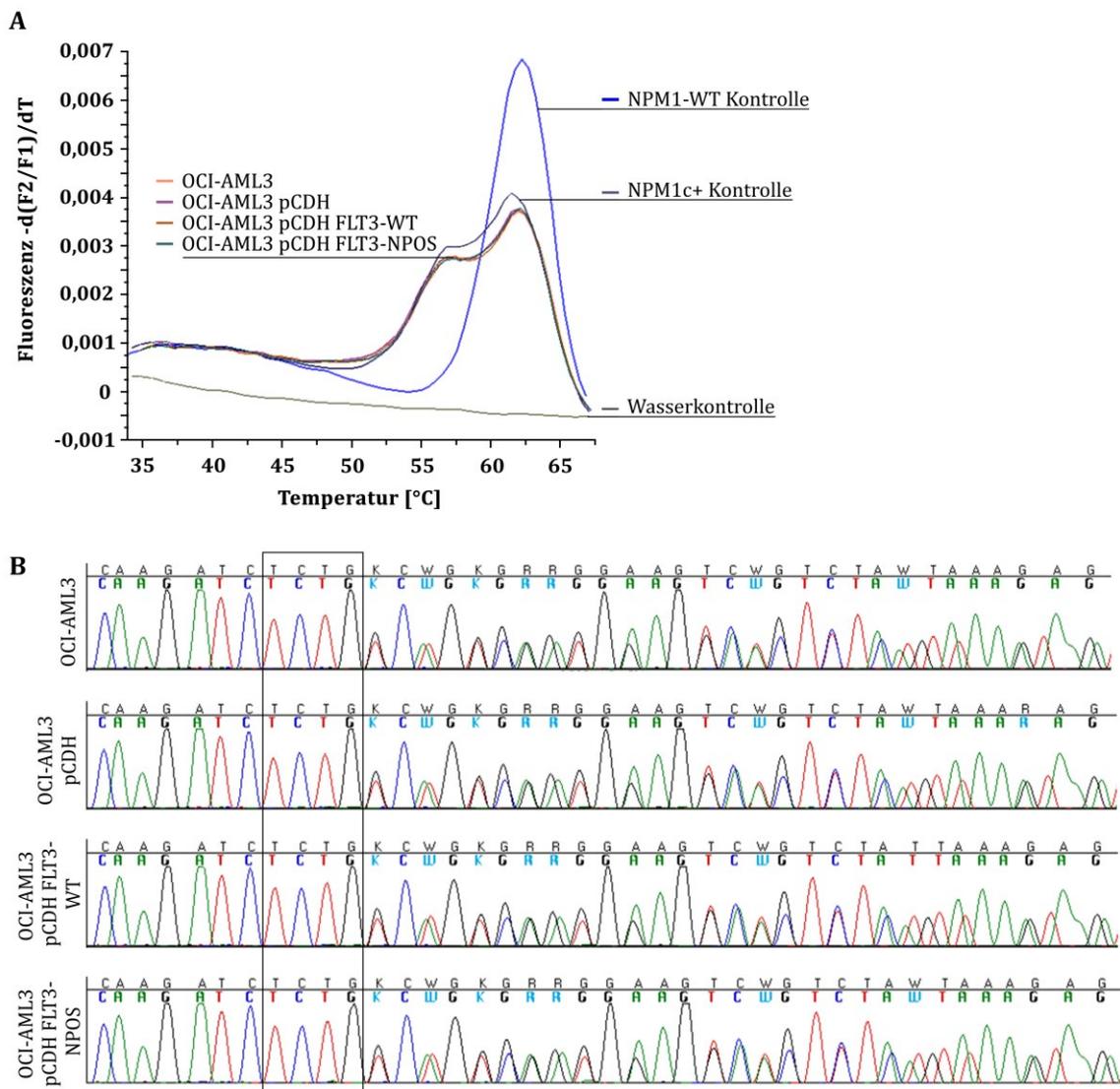


Abbildung 12: Bestätigung der *NPM1*-Mutation A in nativen OCI-AML3 und den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien. Aus nativen OCI-AML3 und den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurde mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. (A) Nach Amplifikation durch *Real-Time*-PCR mit *NPM1*-spezifischen Primern wurde das Amplifikat einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Die Schmelzkurven der nativen OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien stellen sich als Kurven mit zwei lokalen Maxima dar. Die Schmelzkurve mit nur einem Peak zeigt eine Kontrolle, die nur *NPM1*-Wildtyp enthält. Diese Kontrolle wurde ausgehend von einer AML-Patientenprobe mit *NPM1*-WT generiert. Als Positivkontrolle dienten native OCI-AML3. (B) Zur Überprüfung des Ergebnisses der Schmelzkurvenanalyse wurde das Amplifikat sequenziert. Der Ausschnitt der Sequenz, der die *NPM1*-Mutation A (TCTG Duplikation) enthält, ist dargestellt. Die TCTG Duplikation ist eingerahmt. K: Guanin (G) oder Thymin (T); W: Adenin (A) oder Thymin (T); R: A oder G.

4.1.2.2 Nachweis der stabilen FLT3-Proteinexpression

Die FLT3-Proteinexpression nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurde sowohl an der Zelloberfläche, als auch im Ganzzelllysate mittels Western Blot nachgewiesen. Native OCI-AML3 und die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wiesen bereits durch ihre endogene FLT3-Expression den FLT3-WT-Rezeptor an der Zelloberfläche auf (Abbildung 13A). Die Oberflächenexpression wurde im Fall der OCI-AML3 Zellen mit überexprimiertem FLT3-WT-Rezeptor verstärkt (MFI-Ratio = 10,25). OCI-AML3 Zellen mit transgenem FLT3-NPOS-Rezeptor (MFI-Ratio = 5,08) wiesen eine leicht stärkere FLT3-Oberflächenexpression auf als native OCI-AML3 (MFI-Ratio = 3,39) und die Vektorkontrolle OCI-AML3 pCDH (MFI-Ratio = 3,74).

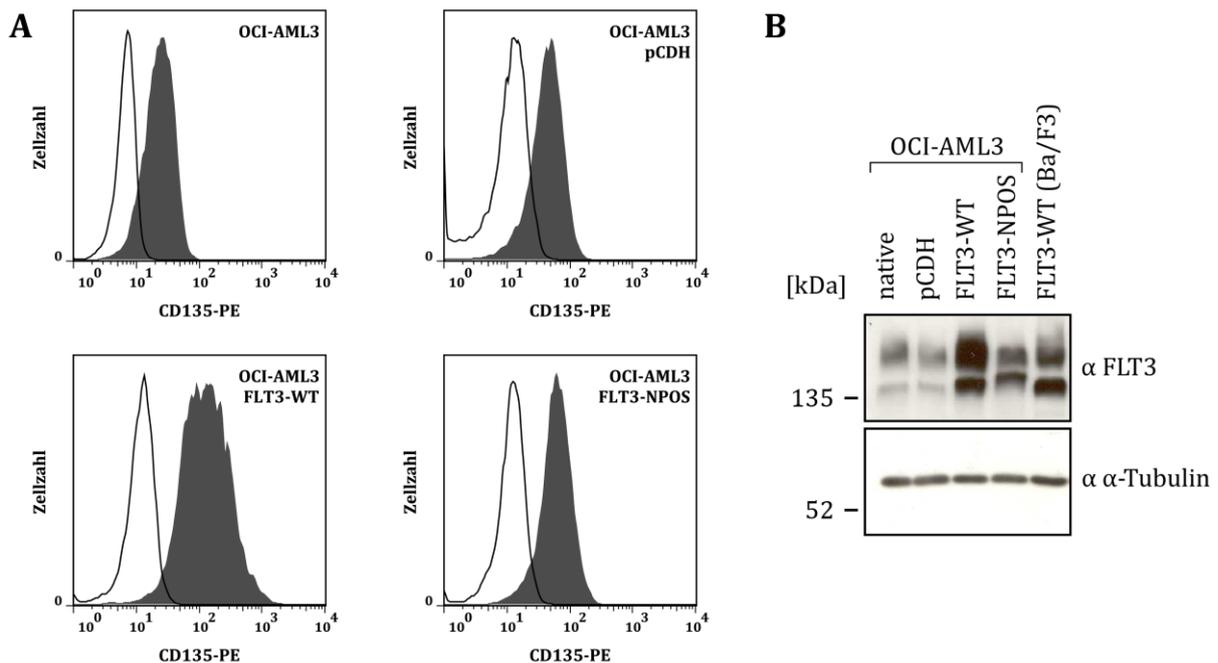


Abbildung 13: Oberflächenexpression des FLT3-Rezeptors (A) und Nachweis der FLT3-Proteinexpression (B). (A) Abgebildet sind die Histogramme nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien, die die Oberflächenexpression des FLT3-Rezeptors widerspiegeln. Das weiße Histogramm repräsentiert die Zellen nach Färbung mit IgG1-PE-Antikörper (Isotypkontrolle), das dunkelgraue Histogramm die Zellen nach Färbung mit spezifischem CD135-Antikörper. Gezeigt ist eine repräsentative Messung von mehreren unabhängigen Messungen. (B) Ganzzelllysate nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurden auf die Expression des FLT3-Rezeptors hin untersucht. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines FLT3-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Als Positivkontrolle wurde ein Ganzzelllysate von Ba/F3 eingesetzt, die den FLT3-Wildtyp-Rezeptor exprimieren.

Das humane FLT3-Protein umfasst 993 Aminosäuren [254]. Es liegt in der Zelle sowohl als schwach glykosyliertes, nicht-membrangebundenes Protein (130-143 kDa) als auch als stark glykosyliertes, in der Zellmembran lokalisiertes Protein (158-160 kDa) vor [62, 255]. Folglich ist FLT3 im Western Blot als Doppelbande zu sehen [62, 255]. Die Expression der pCDH-FLT3-Konstrukte (FLT3-WT und FLT3-NPOS) wurde im Western Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 13B). Alle Proben zeigten die für FLT3 typische Doppelbande. Die FLT3-Proteinexpression nativer OCI-AML3 sowie der Vektorkontrolle pCDH waren schwach und spiegeln die endogene FLT3-WT-Expression der OCI-AML3 Zellen wider. Die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien zeigten eine durch das Transgen hervorgerufene stärkere FLT3-Proteinexpression. Die OCI-AML3 Zellen mit überexprimiertem FLT3-WT-Rezeptor zeigten die stärkste FLT3-Proteinexpression. Mit Ausnahme der OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen fällt außerdem auf, dass die höhermolekulare Bande jeweils intensiver war. Die relative Bandenintensität

von höher- zu niedermolekularer Bande beläuft sich für OCI-AML3 auf 2,6, für OCI-AML3 pCDH auf 1,5, für OCI-AML3 FLT3-WT auf 1,9 und liegt für OCI AML3 FLT3-NPOS bei 0,8. Die relative Bandenintensität wurde mit ImageJ bestimmt.

4.1.2.3 Konsitutive Aktivierung des FLT3-ITD-Rezeptors

Die Bindung des FLT3-Liganden (FL) führt zur Aktivierung des FLT3-Rezeptors, indem sie die Dimerisierung [256] und Autophosphorylierung [62] des Rezeptors induziert. *FLT3*-ITD-Mutationen führen zur Ligand-unabhängigen, konstitutiven Autoaktivierung des FLT3-Rezeptors [82].

Um die Funktionalität des FLT3-WT- und FLT3-NPOS-Rezeptors im Modellsystem zu überprüfen, wurde mit einem Phospho-FLT3-ELISA die Menge an phosphoryliertem, also aktiviertem FLT3 in nativen OCI-AML3 und den transgenen, polyklonalen OCI-AML Zelllinien gemessen (siehe Abbildung 14). Verglichen wurde dabei jeweils die Menge an phosphoryliertem FLT3 von mit FL stimulierten Zellen mit unstimulierten Zellen. Es wurde die Zunahme der Phosphorylierung von FLT3 bei Stimulation der Zellen mit FL ermittelt. Aufgrund der endogenen FLT3-WT-Expression der OCI-AML3, zeigten native OCI-AML3 und die Vektorkontrolle pCDH bei Stimulation mit FL eine dreifache Zunahme der Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors. Infolge der Überexpression des FLT3-WT-Rezeptors in den OCI-AML3 FLT3-WT Zellen nahm die Phosphorylierung hier im Vergleich zu nativen OCI-AML3 und der Vektorkontrolle pCDH nochmals zu. OCI-AML3 FLT3-WT Zellen, die mit FL stimuliert wurden, zeigten eine fünffach stärkere FLT3-Phosphorylierung als unstimulierte OCI-AML3 FLT3-WT Zellen. Die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors in den FLT3-WT überexprimierenden OCI-AML3 Zellen ist unter den untersuchten Zelllinien somit am Stärksten. Die OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen zeigten dagegen kaum eine Zunahme der Phosphorylierung des FLT3-NPOS-Rezeptors bei Vergleich der FL-stimulierten Zellen mit den unstimulierten Zellen. Der FL führte zu keiner Stimulation. Die OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen sind im unstimulierten Zustand bereits maximal phosphoryliert und konstitutiv aktiv.

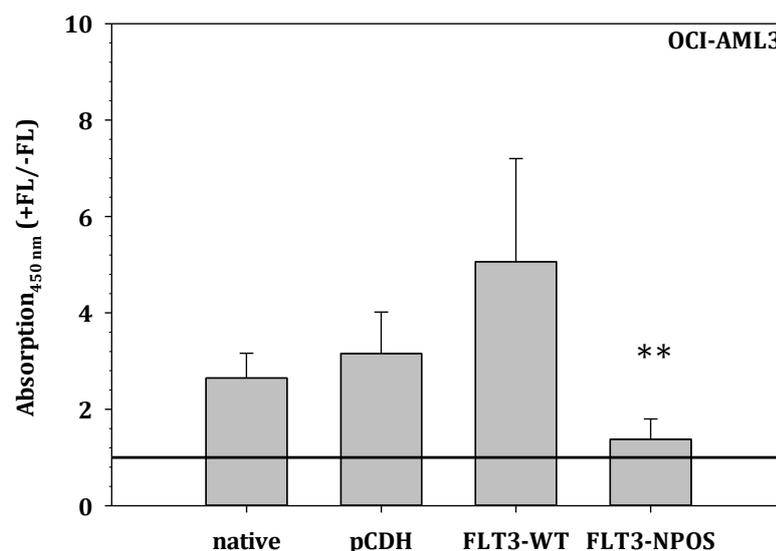


Abbildung 14: Änderung der Phosphorylierung von FLT3 nach Stimulation nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien mit FL. Native OCI-AML3 sowie die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurden unstimuliert oder nach zehn Minuten Stimulation mit 100 ng/ml FL lysiert. Von den Ganzzelllysaten wurde jeweils die gleiche Proteinmenge zur Quantifizierung von phosphoryliertem FLT3 mittels Phospho-FLT3 ELISA eingesetzt. Hier dargestellt ist das Verhältnis der FLT3-Phosphorylierung von stimuliertem zu unstimuliertem Lysat. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. **p<0,01

4.1.2.4 Aktivierung des STAT5-Signalwegs durch *FLT3*-ITD-Mutationen

Die wichtigsten nachgeschalteten Signalwege von *FLT3* sind die drei Signalwege STAT5, PI3K/AKT und RAS/MAPK. Insbesondere der STAT5-Signalweg wird von *FLT3*-ITD-Mutationen aktiviert [84, 87]. Um die Funktionalität des *FLT3*-Rezeptors in den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien weiter zu überprüfen, wurde die zelluläre Signalübertragung dieser Zelllinien untersucht (siehe Abbildung 15). Lysate nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen phospho-STAT5, phospho-AKT und phospho-MAPK analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass in nativen OCI-AML3 sowie in den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien der PI3K/AKT- und RAS/MAPK-Signalweg aktiviert ist. Die Aktivierung des STAT5-Signalwegs war nur in den OCI-AML3 *FLT3*-NPOS Zellen zu sehen.

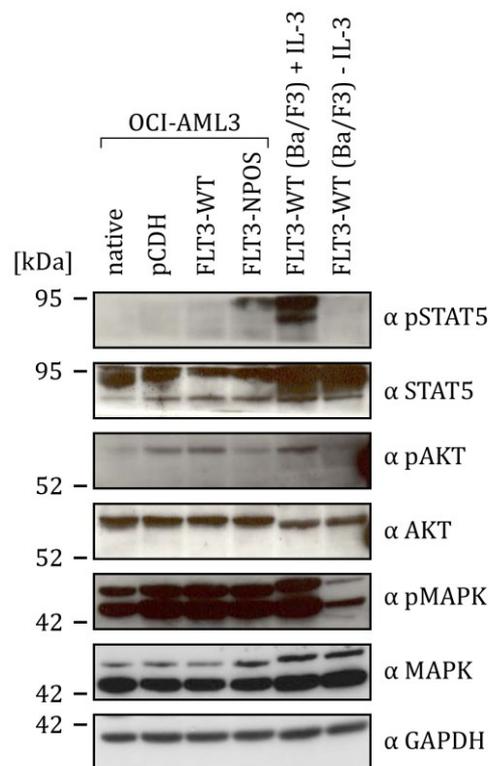


Abbildung 15: Aktivierung von STAT5 in *FLT3*-NPOS exprimierenden OCI-AML3 Zellen. Ganzzelllysate nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mit anti-phospho-STAT5-, anti-phospho-AKT- und anti-phospho-MAPK-Antikörpern immunoblottet, dann gestrippt und mit anti-STAT5-, anti-AKT- und anti-MAPK-Antikörpern inkubiert. Als Ladekontrolle diente anti-GAPDH und als Positiv- bzw. Negativkontrolle ein Ganzzelllysate von Ba/F3 Zellen, die den *FLT3*-Wildtyp-Rezeptor exprimieren. Die Ba/F3 *FLT3*-WT Zellen wurden unstimuliert oder nach zehn Minuten Inkubation mit 10 ng/ml IL-3 lysiert.

4.1.2.5 Keine Veränderung des Immunphänotyps der OCI-AML3 durch die Transduktion

Vor und nach der lentiviralen Transduktion wurden die Zellen einer Immunphänotypisierung unterzogen, um sicherzustellen, dass die lentivirale Transduktion keine immunphänotypischen Veränderungen hervorgerufen hat. Der ermittelte Immunphänotyp nativer OCI-AML3 sowie der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien, der zu einem Zeitpunkt nach der lentiviralen Transduktion bestimmt wurde, stimmte mit dem Immunphänotyp nativer OCI-AML3 überein, der zu einem Zeitpunkt vor der lentiviralen Transduktion aufgenommen wurde (siehe Tabelle 20). Ferner ist aus der Literatur bekannt, dass mehr als 95% der *NPM1c+* NK-AMLs CD34-negativ sind [221]. Auch die nativen OCI-AML3 sowie die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien sind CD34-negativ.

Tabelle 20: Immunphänotyp vor und nach der lentiviralen Transduktion der OCI-AML3. Der Immunphänotyp nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurde im Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München entsprechend der diagnostischen Routinefärbung bestimmt. Es konnten nur die Färbungen derjenigen Oberflächenmarker ausgewertet werden, die nicht mit einem mit grünem Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem Antikörper detektiert wurden, da die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) besitzen. -: 0-20% positive Zellen wird als negativ gewertet; +: 21-100% positive Zellen wird als positiv gewertet; +/-: Werte schwanken um den *Cut-off*-Wert von 20%

	OCI-AML3	OCI-AML3	OCI-AML3 pCDH	OCI-AML3 FLT3-WT	OCI-AML3 FLT3- NPOS
	vor der Transfektion	nach der Transfektion			
CD2	-	-	-	-	-
CD4	+	+	+	+	+
CD13	+	+	+	+	+
CD14	-	-	-	-	-
CD19	-	-	-	-	-
CD33	+	+	+	+	+
CD34	-	-	-	-	-
CD45	+	+	+	+	+
CD56	+	+	+	+	+
CD87	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD117	-	-	-	-	-
cyCD3	-	-	-	-	-
cyCD22	-	-	-	-	-
cyCD45	+	+	+	+	+
cylgG1	-	-	-	-	-
cylgG2	-	-	-	-	-
7.1	-	-	-	-	-
MPO	-	-	-	-	-

- 0-20%
+ 21-100%

4.1.2.6 Konstantes ITD/WT-Verhältnis in den monoklonalen Zelllinien

Um sicher zu stellen, dass das ITD/WT-Verhältnis einer monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinie (FLT3-ITD-low/-equal/-high; siehe dazu Abbildung 11) in allen Experimenten gleich ist, wurde nach jedem Auftauen der Zellen das ITD/WT-Verhältnis mittels Fragmentlängenanalyse bestimmt. Innerhalb leichter Schwankungen war das ITD/WT-Verhältnis aller monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien konstant (siehe Abbildung 16). Für die beiden untersuchten OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien lag das ITD/WT-Verhältnis stets deutlich unter eins (0,1-0,4). Für die beiden untersuchten OCI-AML3 FLT3-ITD-equal Zelllinien lag der Wert immer um eins (0,7-1,7) und für die beiden untersuchten OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien zeigte das ITD/WT-Verhältnis immer Werte deutlich über eins (3,9-18,7). Entsprechend wurde mit den polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen verfahren. Auch diese zeigten ein konstantes ITD/WT-Verhältnis, das ähnlich dem der monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD-equal Zelllinien war.

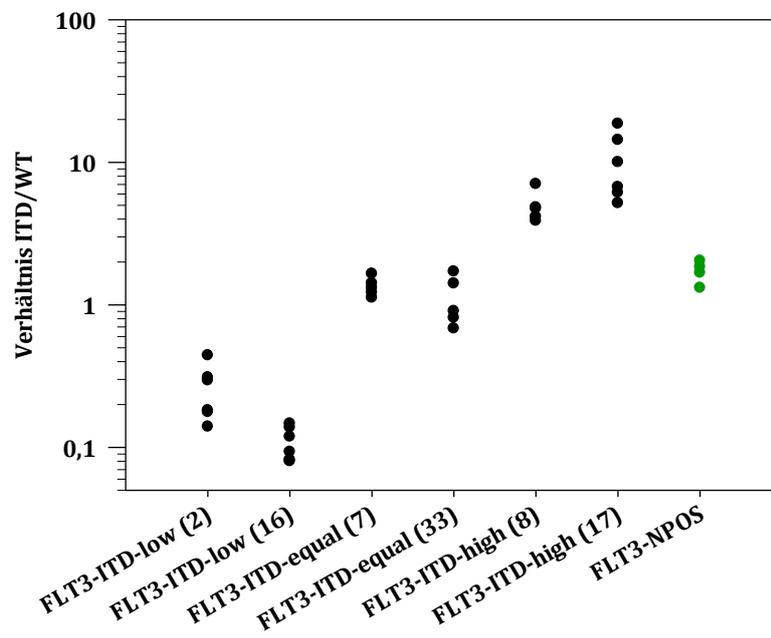


Abbildung 16: Konstantes ITD/WT-Verhältnis der monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien und der polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen. Die mRNA wurde aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Das ITD/WT-Verhältnis wurde dann mittels Fragmentlängenanalyse und der unter 3.2.3.20 angegebenen Berechnungsmethode ermittelt. In grün ist das ITD/WT-Verhältnis der polyklonalen OCI-AML3 FLT3 NPOS Zellen gezeigt. Die Zahl in Klammern bezieht sich auf die Nummer des Klon aus dem die monoklonale Zelllinie hervorgegangen ist und dient ihrer Identifizierung.

4.1.3 Charakterisierung der FLT3-ITD im NPM1-mutierten Hintergrund

4.1.3.1 Keine Wachstumsunterschiede bei Spontanproliferation nach 72 Stunden

Zunächst wurde in OCI-AML3 Zellen, deren charakteristisches Merkmal eine *NPM1*-Mutation ist, die Auswirkung der Expression einer *FLT3*-ITD auf das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Es ist bekannt, dass der Erwerb einer *FLT3*-ITD Mutation im *FLT3*-Gen eine faktorunabhängige Zellproliferation hervorruft [84]. In einem ersten Versuch wurde deshalb die Zellzahl nativer OCI-AML3 sowie transgener, polyklonaler OCI-AM3 Zelllinien nach 72-stündiger Kultivierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an FKS bestimmt. Es konnten jedoch keine Wachstumsunterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 17A). Native OCI-AML3 sowie alle transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wuchsen bei 20% FKS auf eine Zelldichte von 2,0-2,1 x 10⁶ Zellen

pro Milliliter, bei 5% FKS auf $1,8 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter, bei 1,25% FKS auf $1,0-1,2 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter und bei 0,3% FKS auf nur noch $0,8-0,9 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter. Somit traten keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen nativen OCI-AML3 und den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien auf.

Unter der Annahme, dass die transgenen, monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien mit zunehmendem ITD/WT-Verhältnis stärker spontan proliferieren, wurde der Versuch bei 20% FKS mit monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien, die unterschiedliche ITD/WT-Verhältnisse aufwiesen, wiederholt. Erneut konnten keine signifikanten Wachstumsunterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 17B). Die p-Werte (t-Test) liegen beim Vergleich der Gruppen ITD/WT < 1, ITD/WT \approx 1, ITD/WT > 1 untereinander zwischen 0,285 und 0,472.

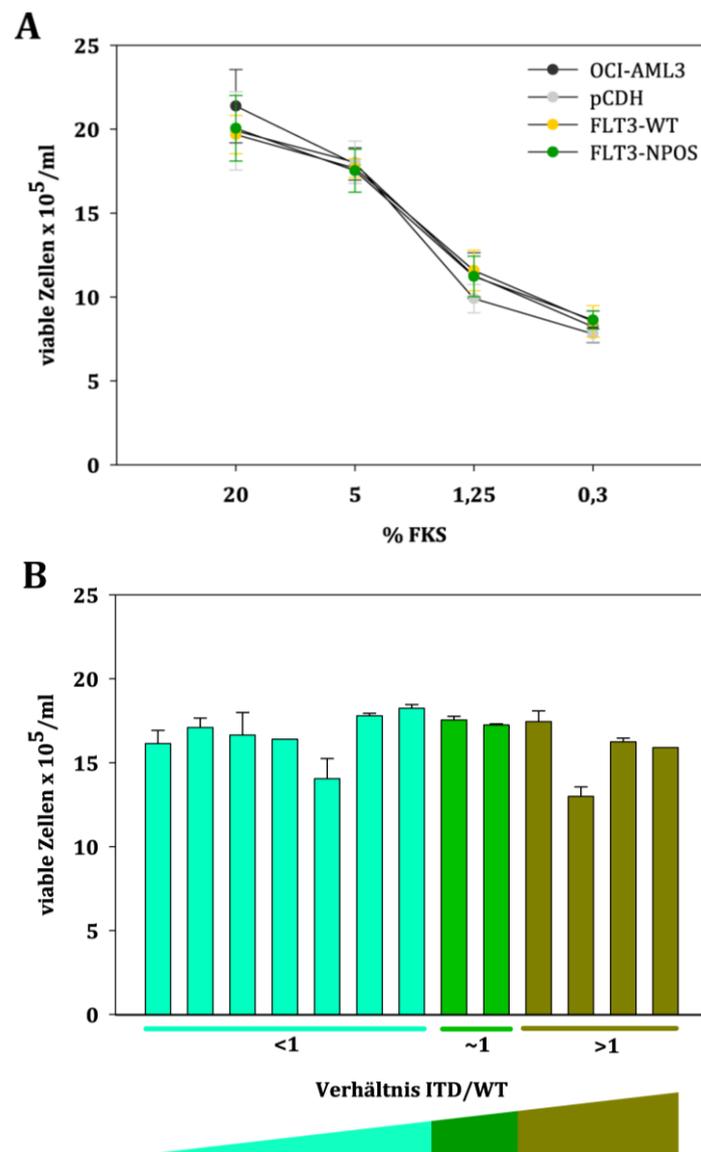


Abbildung 17: 72-Stunden-Proliferation nativer OCI-AML3 und der transgenen, poly- sowie monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien. 2×10^5 Zellen pro Milliliter MEM α versetzt mit FKS, 50 U/ml Penicillin sowie 50 μ g/ml Streptomycin wurden ausgesät und nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C die Lebendzellzahl pro Milliliter nach der Trypanblau-Methode (Vi-CELL™ XR) bestimmt. (A) Native OCI-AML3 und die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurden unter Anwesenheit von 20%, 5%, 1,25% oder 0,3% FKS kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwert und Standardabweichung der Lebendzellzahl pro Milliliter von vier unabhängigen Versuchen. (B) Die monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien wurden mit 20% FKS kultiviert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Lebendzellzahl pro Milliliter von zwei unabhängigen Versuchen.

4.1.3.2 Kompetitiver Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien bei Langzeitproliferation *in vitro*

In einem weiterführenden kompetitiven Langzeitproliferationsversuch, der in Abbildung 18 dargestellt ist, wurden native OCI-AML3 mit einer transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinie in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Die Zellen wurden über mehrere Wochen kokultiviert. Im FACS wurde wöchentlich der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen an der Gesamtmenge der Zellen ermittelt. Dabei wurde sich die Eigenschaft zunutze gemacht, dass die transgenen, polyklonalen und monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien GFP koexprimieren und native OCI-AML3 keinen Fluoreszenzmarker besitzen. Eine Übersicht der untersuchten Mischungsverhältnisse gibt Tabelle 21.

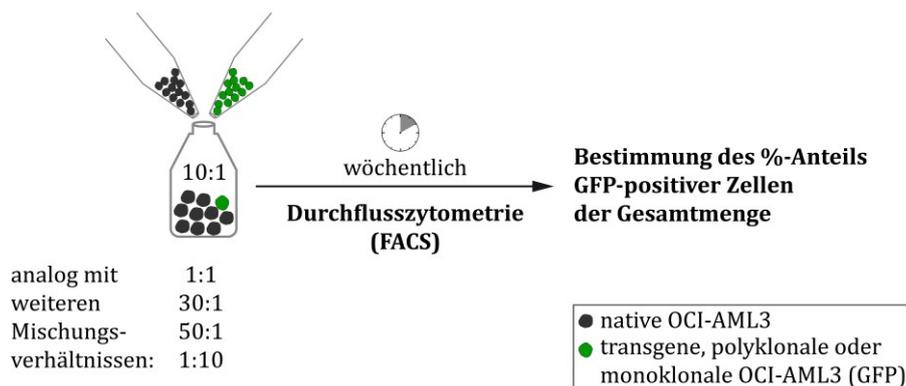


Abbildung 18: Versuchsaufbau der kompetitiven Langzeitproliferation von nativen OCI-AML3 versus der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien. Native OCI-AML3 wurden mit transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Eine detaillierte Übersicht über alle untersuchten Mischungen gibt Tabelle 21. Wöchentlich wurde der Anteil GFP-positiver Zellen an der Gesamtmenge der Zellen im FACS bestimmt. Eine Unterscheidung zwischen nativen OCI-AML3 und transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien war möglich, da die transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien im Gegensatz zu nativen OCI-AML3 einen Fluoreszenzmarker (GFP) besitzen.

Tabelle 21: Übersicht über alle untersuchten Mischungen und deren Verhältnisse im Rahmen der kompetitiven Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 versus der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien.
dunkelgrau: native OCI-AML3; grün: transgene, polyklonale oder monoklonale OCI-AML3 Zelllinien

OCI-AML3 : OCI-AML3 pCDH	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-WT	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-NPOS	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD-low (2)	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD-low (16)	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD-high (8)	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD-high (17)
1 : 10 _{n=1}	1 : 10 _{n=1}	1 : 10 _{n=1}	1 : 10 _{n=1}	1 : 10 _{n=1}		
1 : 1 _{n=1}	1 : 1 _{n=1}	1 : 1 _{n=4}	1 : 1 _{n=2}	1 : 1 _{n=2}	1 : 1 _{n=2}	1 : 1 _{n=3}
10 : 1 _{n=1}	10 : 1 _{n=1}	10 : 1 _{n=5}	10 : 1 _{n=2}	10 : 1 _{n=2}	10 : 1 _{n=2}	10 : 1 _{n=3}
		30 : 1 _{n=4}	30 : 1 _{n=2}	30 : 1 _{n=2}	30 : 1 _{n=2}	30 : 1 _{n=3}
		50 : 1 _{n=1}				

Bei den Mischungen von nativen OCI-AML3 mit transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien ergab sich ein kompetitiver Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen gegenüber nativen OCI-AML3, der für alle Mischungsverhältnisse (außer 1:10) bereits ab der zweiten Woche der Kokultur zu erkennen war (siehe Abbildung 19). Bei einem Mischungsverhältnis von 1:10 (Daten nicht gezeigt) war der Wachstumsvorteil erst nach vier bis fünf Wochen zu erkennen. Nach zehn Wochen Kokultur waren 99% der Zellen transgenen Ursprungs (OCI-AML3 FLT3-NPOS).

In mehreren unabhängigen Versuchen überwucherten die OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen die nativen OCI-AML3 deutlich. Abbildung 19 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus diesen Versuchen, Abbildung 20 einen repräsentativen Versuch des Mischungsverhältnisses 10:1. Ausgehend vom Verhältnis 10:1 machten die OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen im Mittel nach acht Wochen prozentual mehr als die Hälfte der Zellen der Kokultur aus (siehe Abbildung 19).

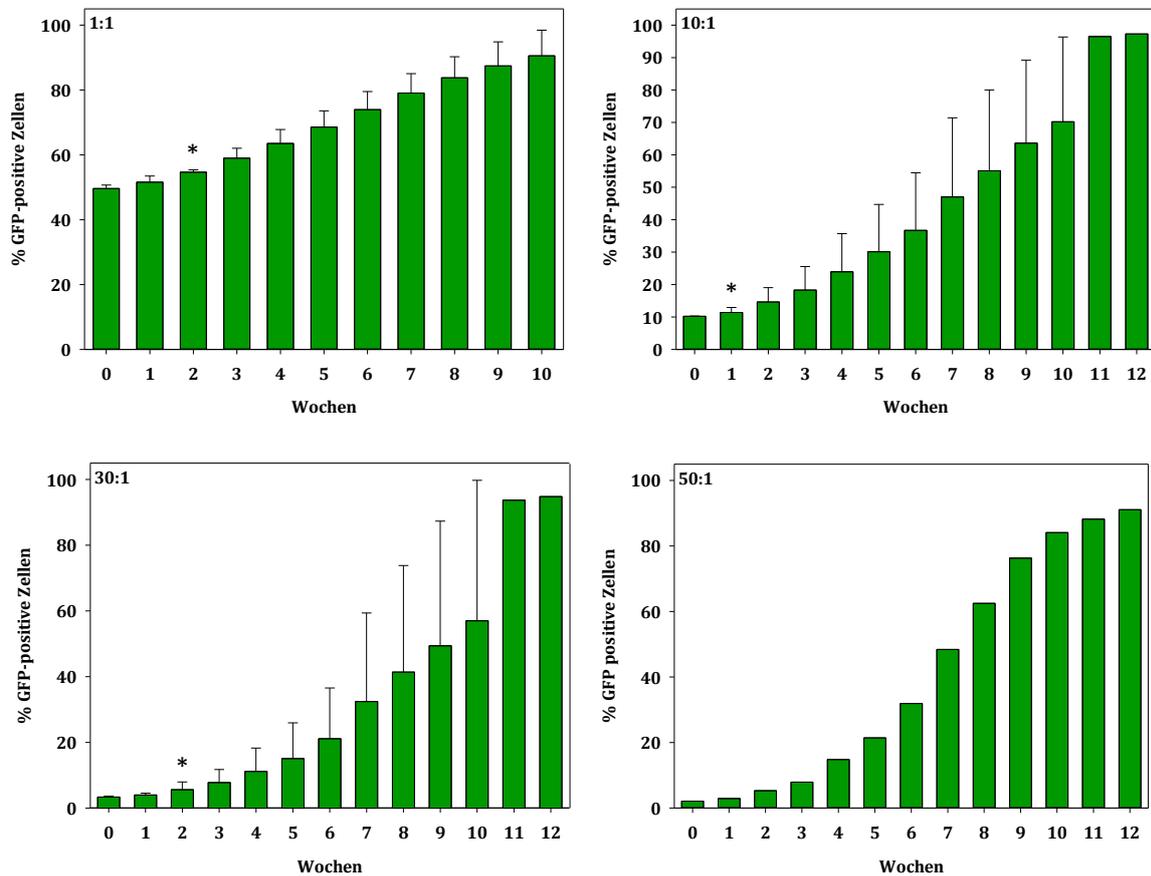


Abbildung 19: Wöchentliche Zunahme des prozentualen Anteils der OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen an der Gesamtmenge der Zellen in Mischungen mit nativen OCI-AML3. Aus allen durchgeführten Versuchen mit den 1:1, 10:1, 30:1 und 50:1 Mischungen von nativen OCI-AML3 mit OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Anteils der GFP-positiven OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen an der Gesamtmenge der Zellen ermittelt und sind gezeigt. Mit Ausnahme des Mischungsverhältnis 50:1 (n=1) gilt: Woche 0-6 n ≥ 4, Woche 7-10 n ≥ 3, Woche 11-12 n = 1. *p<0,05 (1:1 ab Woche 2; 10:1 ab Woche 1; 30:1 Woche 2-5)

Da für alle Mischungsverhältnisse von nativen OCI-AML3 zu transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien äquivalente Ergebnisse erzielt wurden, sind im Folgenden die Ergebnisse des Mischungsverhältnisses 10:1 repräsentativ dargestellt.

Bei der Mischung nativer OCI-AML3 mit OCI-AML3 FLT3-WT Zellen blieb das Mischungsverhältnis von 1:1 und 10:1 über die ersten Wochen konstant. Erst nach sechs Wochen zeigten die OCI-AML3 FLT3-WT Zellen einen schwachen Proliferationsvorteil gegenüber nativen OCI-AML3, der sich bis zum Ende der Kokultur fortsetzte. Am Ende der Kokultur (nach zehn Wochen) war der Anteil an OCI-AML3 FLT3-WT Zellen um 32,7% (1:1) bzw. 32,2% (10:1) gestiegen. Beim Mischungsverhältnis 1:10 war erst sieben Wochen nach Versuchsstart ein schwacher Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-WT Zellen zu verzeichnen. Abbildung 20B zeigt das Ergebnis des Mischungsverhältnisses 10:1.

Alle untersuchten Mischungsverhältnisse der nativen OCI-AML3 mit der Vektorkontrolle pCDH blieben über die gesamte Dauer des Versuchs unverändert (für das Mischungsverhältnis 10:1 siehe Abbildung 20A).

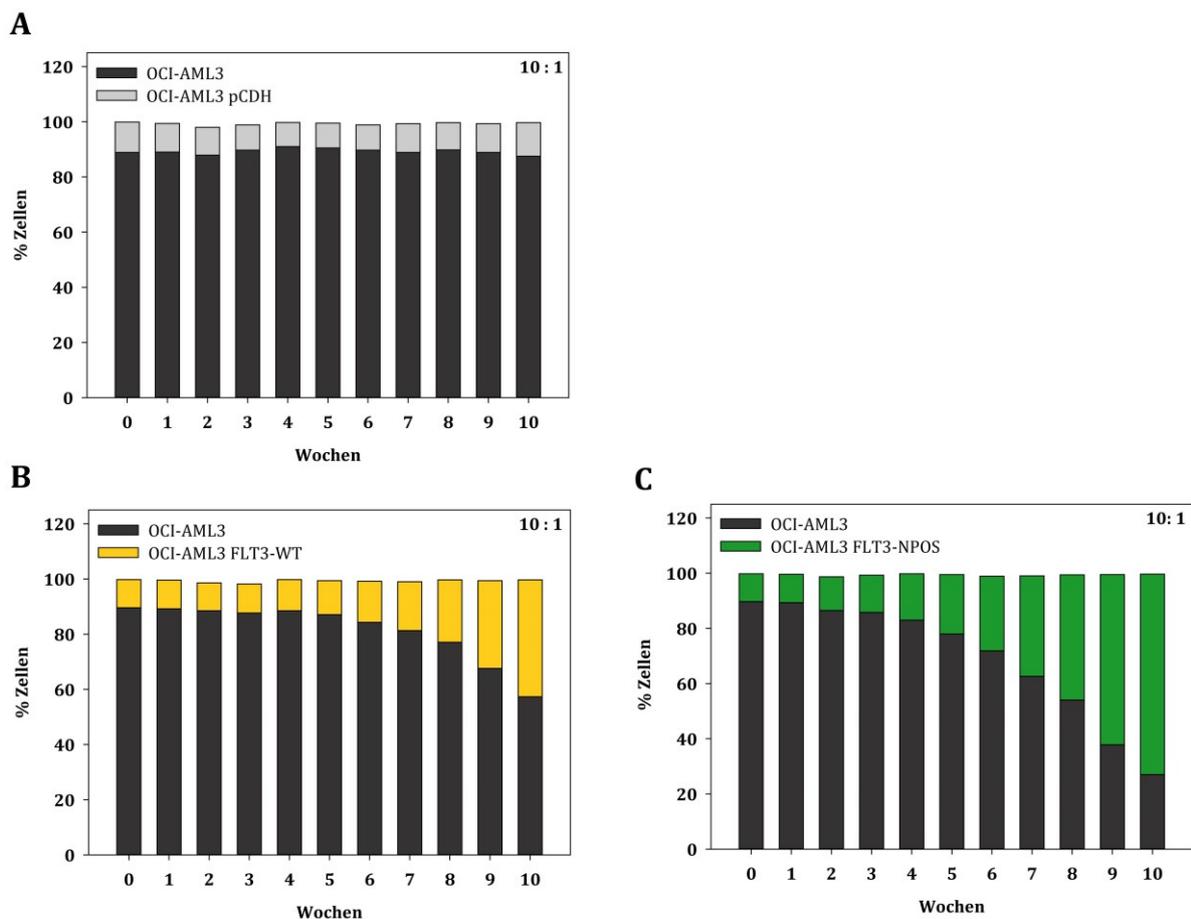


Abbildung 20: Kompetitive Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 mit transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien. Native OCI-AML3 wurden im Verhältnis 10:1 mit OCI-AML3 pCDH Zellen (A), OCI-AML3 FLT3-WT Zellen (B) oder OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen (C) gemischt und für 10 Wochen kokultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen gesplittet und dabei gut durchmischt. Einmal wöchentlich wurde der prozentuale Anteil GFP-positiver (OCI-AML3 pCDH, OCI-AML3 FLT3-WT oder OCI-AML3 FLT3-NPOS) und GFP-negativer (OCI-AML3) Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und ist hier dargestellt.

Zusammenfassend zeigten OCI-AML3 FLT3-WT Zellen einen schwachen und OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen einen deutlichen Proliferationsvorteil gegenüber nativen OCI-AML3.

Unter der Annahme, dass mit zunehmendem ITD/WT-Verhältnis der Proliferationsvorteil der OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien gegenüber nativen OCI-AML3 Zellen steigt, wurden native OCI-AML3 mit monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien gemischt und über mehrere Wochen kokultiviert.

Stellvertretend wurden hierzu je zwei Mischungen aus nativen OCI-AML3 und monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zellen mit niedrigem sowie mit hohem ITD/WT-Verhältnis verwendet und mit einer Mischung aus nativen OCI-AML3 und polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen verglichen. Repräsentativ ist das Mischungsverhältnis 10:1 von nativen OCI-AML3 zu transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zellen dargestellt (siehe Abbildung 21). OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien überwuchsen native OCI-AML3 schneller als polyklonale OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen mit niedrigerem ITD/WT-Verhältnis. Der Anteil an OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zellen hingegen, die ein ITD/WT-Verhältnis deutlich kleiner eins, sogar kleiner 0,5 aufweisen, nahm in allen Mischungen kontinuierlich ab und ging nach mehreren Wochen in Kokultur gegen null bzw. bei einem Ausgangsverhältnis von 1:10 gegen Werte <10%.

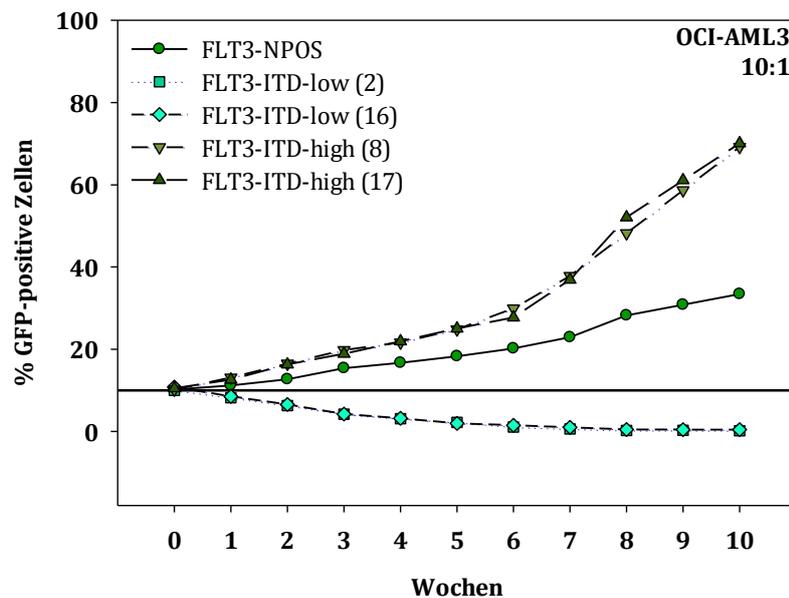


Abbildung 21: Zunahme des kompetitiven Wachstumsvorteils der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien gegenüber nativen OCI-AML3 mit steigendem ITD/WT-Verhältnis. Native OCI-AML3 wurden im Verhältnis 10:1 mit polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen oder mit monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD-low bzw. -high Zelllinien gemischt und für 10 Wochen kokultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen gesplittet und dabei gut durchmischt. Einmal wöchentlich wurde der prozentuale Anteil GFP-positiver (OCI-AML3 FLT3-NPOS, OCI-AML3 FLT3-ITD-low oder OCI-AML3 FLT3-ITD-high) und GFP-negativer (OCI-AML3) Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Der Anteil GFP-positiver Zellen ist dargestellt. Gezeigt ist ein von zwei bis drei unabhängigen Ergebnissen.

Zusammenfassend konnte für alle untersuchten Mischungsverhältnisse bestätigt werden, dass die monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien, die ein größeres ITD/WT-Verhältnis haben als die polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen, auch einen größeren kompetitiven Wachstumsvorteil haben.

Um zu ermitteln, ob der kompetitive Wachstumsvorteil der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien gegenüber nativen OCI-AML3 durch die *FLT3*-ITD gesteuert wird, wurden erneut Mischungen aus nativen OCI-AML3 und transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zellen generiert und über mehrere Wochen kokultiviert. Den Mischungen wurde kontinuierlich 20 nM AC220, ein selektiver Proteintyrosinkinase-Inhibitor [257] zugesetzt. Eine detaillierte Übersicht über alle untersuchten Mischungen mit AC220 gibt Tabelle 22.

Tabelle 22: Übersicht über alle untersuchten Mischungen und deren Verhältnisse im Rahmen der kompetitiven Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 versus der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien mit AC220. dunkelgrau: native OCI-AML3; grün: transgene, polyklonale oder monoklonale OCI-AML3

OCI-AML3 : OCI-AML3 pCDH	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-WT	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3- NPOS	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD- low (2)	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD- low (16)	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD- high (8)	OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-ITD- high (17)
		+AC220	+AC220	+AC220	+AC220	+AC220
		1 : 1 n=2	1 : 1 n=1	1 : 1 n=1	1 : 1 n=1	1 : 1 n=2
		10 : 1 n=2	10 : 1 n=1	10 : 1 n=1	10 : 1 n=1	10 : 1 n=2
		30 : 1 n=2	30 : 1 n=1	30 : 1 n=1	30 : 1 n=1	30 : 1 n=2

Mischungen mit OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien wurden von AC220 nicht beeinflusst. Die Zellzahl an GFP-positiven Zellen nahm in gleicher Weise ab wie bei Ansätzen ohne AC220. Dagegen reagierten OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen und die OCI-AML3 FLT3-ITD-high (8) bzw. (17) Zelllinie, obwohl unterschiedlich stark, in gleicher Weise auf den Inhibitor. In den ersten drei Wochen stagnierte (OCI-AML3 FLT3-ITD-high (8)) bzw. nahm ihr prozentualer Anteil an der Kokultur ab (OCI-AML3 FLT3-NPOS; FLT3-ITD-high (17)). In Woche vier bzw. Woche sieben überschritten OCI-AML3 FLT3-ITD-high (8) Zellen bzw. OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen ihre Ausgangsmenge an der Gesamtmenge der Zellen deutlich. Dies galt für alle getesteten Mischungsverhältnisse. OCI-AML3 FLT3-ITD-high (17) Zellen überschritten erst in Woche 9 den Wert 3,33% (30:1) bzw. in Woche zehn den Wert 10% (10:1). Der Ausgangswert von 50% (1:1) war nach 10 Wochen noch nicht überschritten (45,8%). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

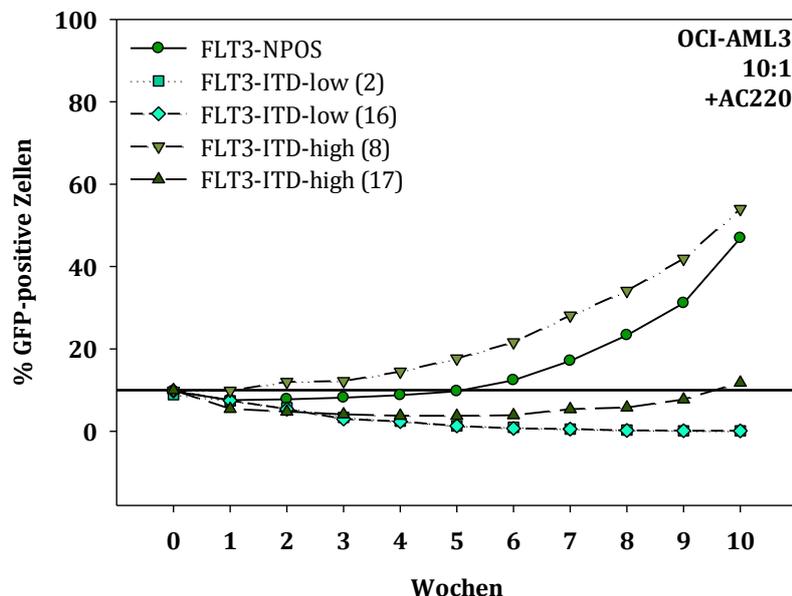


Abbildung 22: Kompetitives Wachstumsverhalten der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien gegenüber nativen OCI-AML3 bei ständiger Anwesenheit des FLT3-Inhibitors AC220. Native OCI-AML3 wurden im Verhältnis 10:1 mit polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen oder mit monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD-low bzw. -high Zelllinien gemischt und für zehn Wochen unter ständiger Anwesenheit von 20 nM AC220 kokultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen gesplittet und dabei gut durchmischt. Einmal wöchentlich wurde der prozentuale Anteil GFP-positiver (OCI-AML3 FLT3-NPOS, OCI-AML3 FLT3-ITD-low oder OCI-AML3 FLT3-ITD-high) und GFP-negativer (OCI-AML3) Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen eines Versuchs ist dargestellt.

Alle Zelllinien mit einem ITD/WT-Verhältnis von größer eins reagierten nur anfänglich auf den FLT3-Inhibitor AC220 und proliferierten später wieder stärker als native OCI-AML3. Der kompetitive Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen und OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien gegenüber nativen OCI-AML3 kann durch den FLT3-Inhibitor AC220 nur über eine gewisse Dauer gehemmt werden.

AML-Patienten, die über einen längeren Zeitraum mit AC220 behandelt werden, entwickeln häufig Resistenzmutationen gegenüber AC220 [258]. Deshalb wurde nach zehnwöchiger Kokultur unter ständiger Anwesenheit von 20 nM AC220 die mRNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR der Bereich des *FLT3*-Gens amplifiziert, in dem die bekannten Resistenzmutationen D676, F691, G697, D835, D839 und Y842 auftreten. Die Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produktes ergab keine AC220 Resistenzmutation. So konnten bekannte AC220 Resistenzmutationen [258-260] als Grund für die einsetzende zunehmende Proliferation der OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen bzw. der OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass je größer das ITD/WT-Verhältnis der OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien ist, desto größer ist ihr kompetitiver Wachstumsvorteil gegenüber nativen OCI-AML3. Dieser Proliferationsvorteil kann teilweise durch Zugabe von 20 nM AC220 gehemmt werden.

4.1.3.3 Kompetitiver Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen bei Proliferation *in vivo*

In einem weiteren Schritt wurde der kompetitive Wachstumsvorteil der polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen auch *in vivo* untersucht.

4.1.3.3.1 Bestimmung der Applikationsroute und der applizierten Zellzahl

Quentmeier *et al.* applizierten in einer Untersuchung $2-5 \times 10^7$ OCI-AML3 Zellen subkutan in NOD/SCID-Mäuse und beobachteten das Anwachsen der Zellen [253]. In der vorliegenden Arbeit wurden NSG-Mäuse verwendet. Um in NSG-Mäusen die beste Applikationsroute und optimale Zahl zu applizierender Zellen zu ermitteln, wurden zwei Vorversuche durchgeführt. In beiden Versuchen wurden den Mäusen OCI-AML3 Zellen verabreicht, die transgen ein Luciferase-Gen exprimieren. Der Verlauf des Anwachsens der OCI-AML3 Zellen in den Mäusen konnte somit in regelmäßigen Abständen per Biolumineszenzbildgebung, dem sogenannten *Imagen*, beobachtet werden. Das *Imagen* wurde von der Arbeitsgruppe Prof. I. Jeremias (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Der Vergleich verschiedener Applikationsrouten (intravenös, intrafemoral, intraperitoneal und subkutan) ergab, dass nur bei intravenöser (i.v.) Gabe die OCI-AML3 Zellen überwiegend wie gewünscht das Knochenmark infiltrieren. Bei einer Maus konnten bei intravenöser Applikation sogar 60% leukämische OCI-AML3 im Knochenmark nachgewiesen werden. Zum Vergleich dazu lag dieser Wert bei den anderen Applikationsrouten nur zwischen 0,2-3,2% (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für folgende Versuche die intravenöse Applikationsroute gewählt. Dabei wurden die Zellen in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Die angegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf Tag 25 nach Verabreichung von 10^5-10^7 Zellen. An Tag 25 mussten die Tiere aufgrund ihres Gesundheitszustandes getötet werden. Zur Ermittlung der minimalen Zellzahl, bei der die Zellen noch anwachsen, wurde die applizierte Zellzahl variiert. Dies sollte dazu dienen, das Zeitfenster bis zur Erkrankung der Maus zu verlängern. Hierzu wurden den Mäusen 10^7 , 10^5 und 10^3 Zellen i.v. injiziert. Je zwei Mäuse erhielten die gleiche Anzahl an Zellen. Die OCI-AML3 Zellen wuchsen in allen Tieren an. Je mehr Zellen injiziert wurden, desto kürzer war die Latenzzeit. Bei 10^7 Zellen mussten die Tiere krankheitsbedingt nach

24 Tagen, bei 10^5 Zellen nach 31 Tagen (eine Maus ist an Tag 26 in Narkose verstorben) und bei 10^3 Zellen erst nach 35 Tagen getötet werden.

4.1.3.3.2 Untersuchung des Wachstumsvorteils von OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen in vivo

Um zu untersuchen, ob der kompetitive Wachstumsvorteil von polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen gegenüber nativen OCI-AML3 auch *in vivo* besteht, wurden Mischungen aus beiden Zelllinien in Mäuse injiziert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 23 grafisch dargestellt.

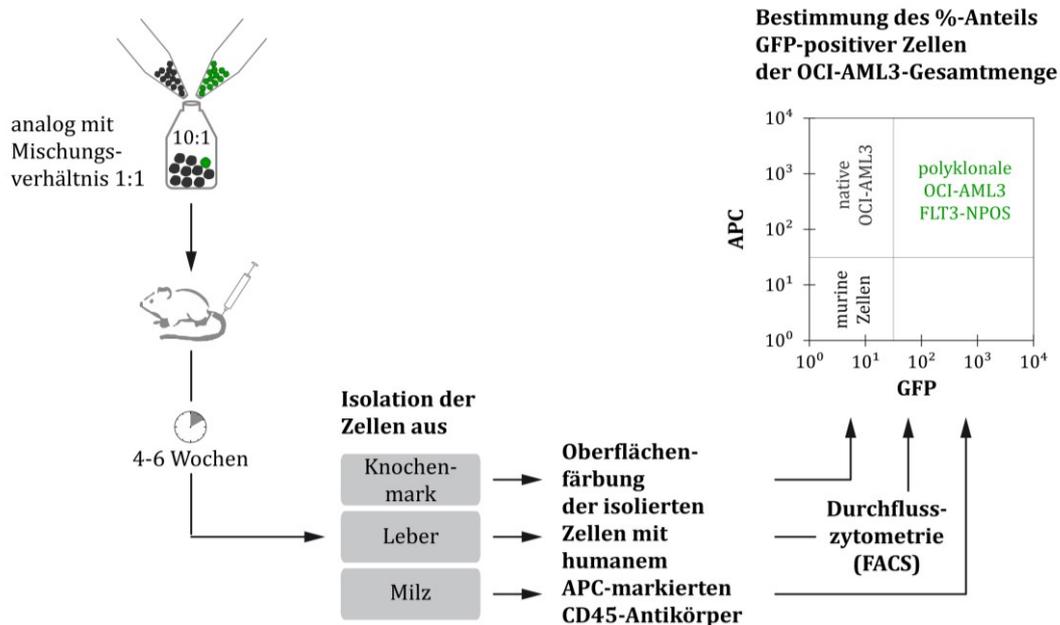


Abbildung 23: Versuchsaufbau der kompetitiven Langzeitproliferation von nativen OCI-AML3 versus polyklonaler OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen in vivo. Native OCI-AML3 wurden mit polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen im Verhältnis 1:1 oder 10:1 gemischt und NSG-Mäusen intravenös appliziert. Eine detaillierte Übersicht über alle untersuchten Mischungen gibt Tabelle 23. Nach 4-6 Wochen erkrankten die Mäuse und mussten getötet werden. Die Zellen wurden aus Knochenmark, Leber und Milz isoliert. Eine Oberflächenfärbung mit einem APC-markierten CD45-Antikörper erlaubte die Unterscheidung humaner von murinen Zellen im FACS. Eine Unterscheidung zwischen nativen OCI-AML3 und polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen war möglich, da die polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen im Gegensatz zu nativen OCI-AML3 einen Fluoreszenzmarker (GFP) besaßen. Der Anteil GFP-positiver Zellen an der Gesamtmenge der humanen Zellen im FACS wurde ermittelt.

Tabelle 23: Übersicht über alle in vivo untersuchten Mischungen und deren Verhältnisse im Rahmen der kompetitiven Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 versus polyklonaler OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen. Die ersten beiden Zeilen zeigen die Mäuse aus dem ersten, die letzten vier Zeilen die Mäuse aus dem zweiten Versuch.

Mischungsverhältnis OCI-AML3 : OCI-AML3 FLT3-NPOS	Applizierte Zellzahl	Anzahl der Mäuse	Tage bis Analyse
1:1	10^3	3	kein Engraftment; 101 Tage
10:1	10^3	3	kein Engraftment; 101 Tage
1:1	10^5	2	verstorben; 41 Tage
1:1	10^6	1	29 Tage
10:1	10^5	2	39 Tage
10:1	10^6	1	39 Tage

Da im Vorversuch 10^3 Zellen angewachsen waren, wurden in einer ersten Untersuchung der kompetitiven Proliferation von nativen OCI-AML3 und polyklonaler OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen je drei Mäusen 10^3 Zellen in einem Mischungsverhältnis von 1:1 bzw. 10:1 appliziert. Wider Erwarten waren die Zellen auch nach 101 Tagen in keiner der Mäuse angewachsen. Eine Analyse der humanen, leukämischen Zellen in Knochenmark, Leber und Milz der Mäuse ergab sehr geringe Werte von 1,25%, 0,24% und 1,18%. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch den Mäusen die gleichen Mischungen gespritzt, jedoch die Gesamtzellzahl auf 10^5 (je zwei Mäuse) bzw. 10^6 (je eine Maus) erhöht. Eine Maus starb während des Versuchs (1:1; 10^5) und konnte nicht analysiert werden. Die Todesursache wurde nicht untersucht. Alle anderen Mäuse erkrankten 29-41 Tage nach Applikation der Zellmischungen. Es bestand kein Zusammenhang zwischen applizierter Zellzahl und Latenzzeit. Deshalb wurde bei der Auswertung nicht nach applizierter Zellzahl unterschieden. Die erkrankten Mäuse zeigten Lähmungserscheinungen an den Hinterläufen. Beim ersten Auftreten der Lähmungserscheinungen wurden sie getötet und die Zellen aus Knochenmark, Leber und Milz isoliert und analysiert. Die isolierten Zellen wurden mit einem humanen APC-markierten CD45-Antikörper gefärbt, um humane und murine Zellen durchflusszytometrisch voneinander zu unterscheiden. Dies wurde in einem Vorversuch kontrolliert, in dem humane OCI-AML3 Zellen mit murinen Ba/F3 Zellen in definierten Verhältnissen gemischt und die Mischungen mit diesem Antikörper gefärbt wurden. Bei der Analyse im FACS wurden die eingesetzten Mengenverhältnisse beider Zelllinien exakt wiedergefunden (Daten nicht gezeigt). Eine Unterscheidung zwischen nativen OCI-AML3 und polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen war aufgrund des GFP der transgenen Zellen möglich. In Abbildung 24 dargestellt sind die prozentualen Anteile GFP-positiver und GFP-negativer Zellen des Mischungsverhältnisses 10:1 im Knochenmark, der Leber und Milz. In allen drei Kompartimenten konnte der kompetitive Wachstumsvorteil der polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen gegenüber nativen OCI-AML3 bestätigt werden. Am stärksten ausgeprägt war dieser mit einem Anstieg auf durchschnittlich 53,6% im Knochenmark.

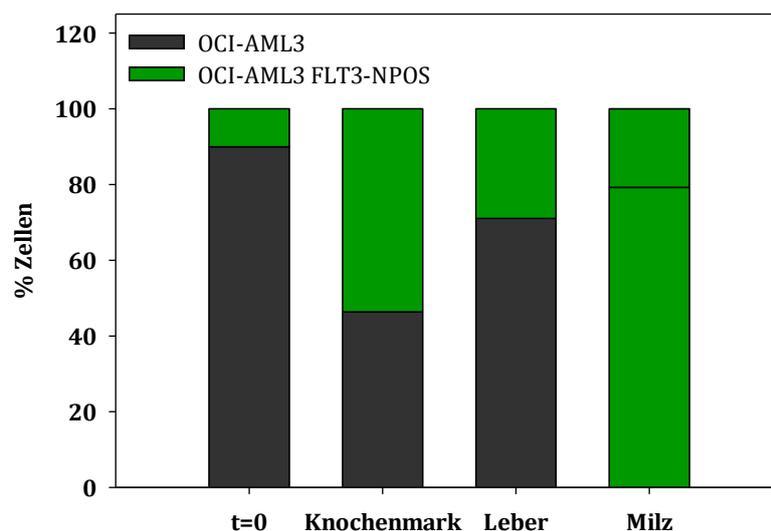


Abbildung 24: Kompetitiver Wachstumsvorteil der polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen gegenüber nativen OCI-AML3 *in vivo*. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-positiver (OCI-AML3 FLT3-NPOS) sowie GFP-negativer (OCI-AML3) humaner, leukämischer Zellen, die aus dem Knochenmark, der Leber und der Milz isoliert wurden. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von drei Mäusen. t=0 bezeichnet das Mischungsverhältnis zum Zeitpunkt der Injektion.

Auch in einer der beiden Mäuse des Mischungsverhältnisses 1:1 vermehrten sich die polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen stärker als native OCI-AML3. In allen drei untersuchten Organen nahmen sie gleich stark von 50% auf 72,5-75,7% zu. Bei der anderen Maus hingegen, ging der prozentuale Anteil an polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen im Vergleich zur Ausgangsmischung zurück. Insgesamt hatten zwei Mäuse außerdem einen soliden Tumor im Bauchraum, der bei einer Maus zu 98,9% aus OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen und bei der anderen Maus zu 99,3% aus nativen OCI-AML3 bestand.

Die 1:1 und 10:1 Mischungen, die den Mäusen gespritzt wurden, wurden parallel auch *in vitro* kultiviert. Auch *in vitro* überwuchsen wie erwartet die polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen die nativen OCI-AML3. An Tag 41 nach Injektion in die Maus waren *in vitro* der prozentuale Anteil der polyklonalen OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen von 50% auf 88,1% bzw. von 10% auf 52,2% gestiegen (Daten nicht gezeigt).

4.1.3.4 Apoptoseverhalten unbehandelter und behandelter OCI-AML3 Zelllinien

Da der aktivierte FLT3-Rezeptor nicht nur pro-proliferative, sondern auch anti-apoptotische Aktivität besitzt [74, 261-263], wurde zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps neben der Proliferation auch die Apoptose der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien untersucht. Die Spontanapoptoserate nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien wurde nach 72 Stunden durch Färbung der Zellen mit Annexin V und 7-AAD durchflusszytometrisch gemessen und der Anteil an früh-, spät- sowie gesamtapoptotischen Zellen bestimmt. Die Messung wurde in zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien festgestellt werden konnten, sind die Daten nicht gezeigt.

Da AML-Patienten mit einer FLT3-ITD schlecht auf die Standard-Chemotherapie ansprechen [264], wurde das Zellmodell genutzt, um die apoptotische Wirkung verschiedener Zytostatika (Cytarabin, Daunorubicin) und Inhibitoren (Multikinase-Inhibitor Sorafenib und FLT3-Inhibitor AC220) auf OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen im Vergleich zu nativen OCI-AML3 und OCI-AML3 FLT3-WT Zellen sowie der Verkorkontrolle zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen (siehe Tabelle 24) behandelt und anschließend die spezifische Apoptose im FACS gemessen (siehe hierzu 3.2.1.16). Im Rahmen einer Dosis-Wirkungskurve von Cytarabin und Daunorubicin wurden native OCI-AML3 und die transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien außerdem mit 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 20 und 25 µM Cytarabin bzw. mit 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500 und 1000 µM Daunorubicin kultiviert. Die Zelllinien zeigten für alle Substanzen und Konzentrationen keine Unterschiede im Ansprechen auf die Substanzen (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 24: Liste der verwendeten Substanzen und Konzentrationen

Bezeichnung	Wirkungsweise	Konzentrationen
AC220	FLT3-Inhibitor	10nM, 33nM, 100nM
Cytarabin	Zytostatikum	1µM, 25µM
Daunorubicin	Zytostatikum	0,1µM, 1µM
Sorafenib	Multikinase-Inhibitor	10µM, 20µM

4.1.3.5 Genexpressionsanalyse in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses

4.1.3.5.1 In AML-Patienten mit normalem Karyotyp und NPM1-Mutation

Um differentiell exprimierte Gene in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses zu untersuchen, wurde das Genexpressionsprofil (GEP) von 91 *NPM1*-mutierten AML-Patienten mit normalem Karyotyp analysiert. Die Patienten wurden analog zu Schneider *et al.* [240] anhand ihres ITD/WT-Verhältnisses der leukämischen Blasten in drei Gruppen aufgeteilt: Patienten mit *FLT3*-WT ohne *FLT3*-ITD (0; WT), Patienten mit niedriger *FLT3*-ITD-Last (0,01-0,49; low) und Patienten mit hoher *FLT3*-ITD-Last ($\geq 0,5$; high). Die WT-Gruppe umfasste 47 Patienten, die low-Gruppe 21 Patienten und die high-Gruppe 23 Patienten. Die Erhebung aller Daten erfolgte im Rahmen der AMLCG 99 Studie. Die Auswertung der Genexpressionsdaten wurde von Dipl.-Math. Vindi Jurinovic vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt (siehe 3.2.4.2). Als signifikant dereguliert wurden nur Gene mit einem adjustierten p-Wert von $\leq 0,05$ und einem *Fold Change* (FC) von $\geq 1,5$ (hochreguliert) bzw. $\leq -1,5$ (herunterreguliert) angesehen. In der low-Gruppe war im Vergleich zur WT-Gruppe die Expression von fünf Genen signifikant hoch- und von acht Genen signifikant herunterreguliert. In der high-Gruppe war im Vergleich zur WT-Gruppe die Expression von 23 Genen signifikant hoch- und von zehn Genen signifikant herunterreguliert. Diese Gene sind in Tabelle 25 aufgelistet. Bis auf *TUBB2A* waren alle Gene, die beim Vergleich der low- mit der WT-Gruppe signifikant dereguliert waren, auch beim Vergleich der high- mit der WT-Gruppe unter den signifikant deregulierten Genen. Beim Vergleich der high-Gruppe mit der low-Gruppe waren keine Gene differentiell exprimiert. In der Heatmap ist ein sehr ähnliches Muster zwischen der low- und der high-Gruppe zu erkennen (siehe Abbildung 25). Auffällig ist, dass das GEP von fünf Patienten aus der high-Gruppe dem GEP der Patienten aus der WT-Gruppe gleicht. Aufgrund der in der Routinediagnostik dieser Patienten erhobenen Daten wurden keine Auffälligkeiten festgestellt, die diese fünf Patienten von anderen Patienten mit hohem ITD/WT-Verhältnis unterscheiden.

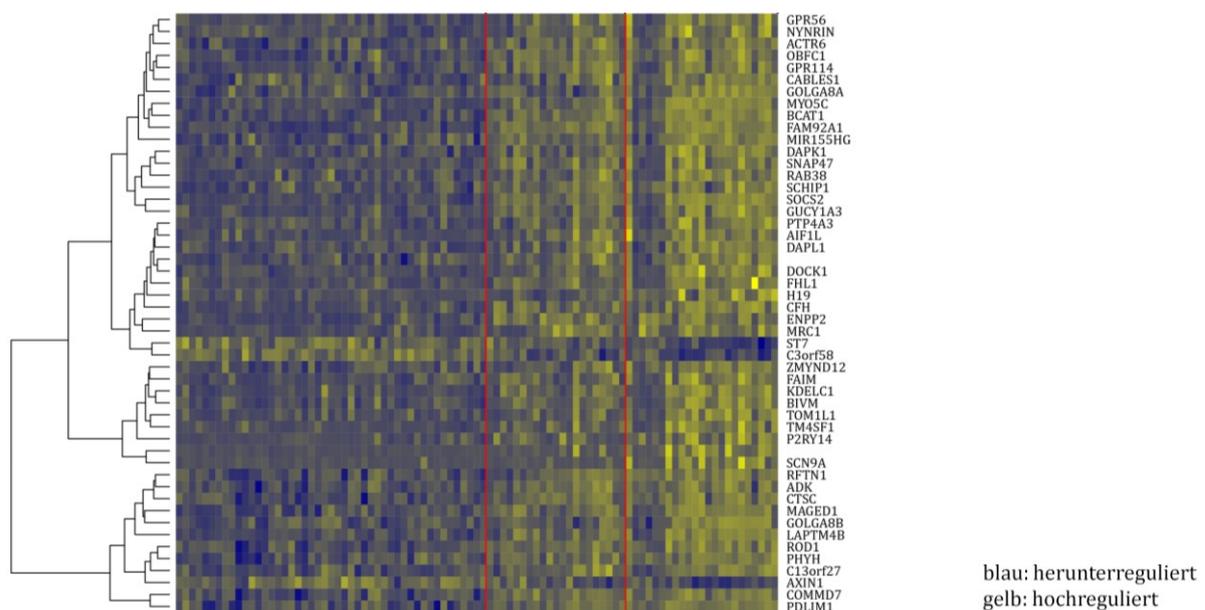


Abbildung 25: Heatmap der 50 signifikantesten differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses in *NPM1*-mutierten AML-Patienten mit normalem Karyotyp. Insgesamt wurden 91 Patienten untersucht. Die Patienten wurden mit kontinuierlich aufstiegender ITD/WT-Verhältnis von links nach rechts angeordnet. Die roten Linien grenzen die WT-Gruppe (nur *FLT3*-WT; ITD/WT-Verhältnis = 0), die low-Gruppe (ITD/WT-Verhältnis 0,01-0,49) und die high-Gruppe (ITD/WT-Verhältnis $\geq 0,5$) voneinander ab. Der *Fold Change* blieb in dieser Auswertung unberücksichtigt.

Tabelle 25: Liste der differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses bei *NPM1*-mutierten AML-Patienten mit normalem Karyotyp. Das Genexpressionsprofil von Patienten mit *FLT3*-WT ohne *FLT3*-ITD (0; WT), von Patienten mit niedriger *FLT3*-ITD-Last (0,01-0,49; low) und von Patienten mit hoher *FLT3*-ITD-Last ($\geq 0,5$; high) nach Schneider *et al.* [240] wurde miteinander verglichen. Signifikant deregulierte Gene (adjustierter p-Wert $\leq 0,05$; $FC \geq 1,5$ bzw. $FC \leq -1,5$) sind aufgelistet. Fett gedruckt sind Gene, die sowohl beim Vergleich der low- als auch der high-Gruppe mit der WT-Gruppe signifikant dereguliert waren. FC: *Fold-change*; adj. adjustiert; N/A nicht annotiert

low versus WT			high versus WT			high versus low		
Gen	adj. p-Wert	FC	Gen	adj. p-Wert	FC	Gen	adj. p-Wert	FC
HIST1H3D	2,92E-03	4,16	SOCS2	3,12E-14	7,58	keine		
SOCS2	6,04E-07	4,05	LAPTM4B	5,24E-09	6,08			
ENPP2	3,05E-06	3,57	MYO5C	9,58E-12	3,87			
FAM92A1	4,43E-09	2,99	ENPP2	9,35E-08	3,75			
LAPTM4B	3,20E-03	2,89	BCAT1	7,02E-12	3,72			
TUBB2A	4,21E-03	-2,88	FAM92A1	2,19E-13	3,67			
SLC4A1	3,79E-03	-2,90	SHIP1	1,44E-06	3,67			
CA1	6,18E-03	-2,94	CYTL1	4,25E-04	3,63			
HBM	8,71E-03	-3,02	MRC1	6,77E-07	3,56			
SELENBP1	4,21E-03	-3,09	NPTX2	2,09E-04	3,53			
EPB42	3,39E-03	-3,39	GUCY1A3	5,83E-07	3,48			
AHSP	3,88E-03	-3,66	HIST1H3D	1,66E-03	3,42			
ALAS2	6,94E-03	-3,68	KIAA0125	1,01E-04	3,38			
			CFH	1,16E-09	3,27			
			P2RY14	1,04E-06	3,21			
			TRBV27	5,09E-04	3,18			
			CLU	2,77E-05	3,11			
			N/A	3,52E-08	3,11			
			MIR155HG	9,07E-06	3,09			
			LOC401097	8,73E-05	2,96			
			CXCL3	1,49E-03	2,93			
			GAS2	1,56E-05	2,89			
			KDELC1	1,71E-07	2,83			
			SLC6A8	8,71E-05	-2,87			
			HBA2	3,86E-04	-2,95			
			HBA1	6,07E-04	-3,02			
			SLC4A1	1,90E-04	-3,23			
			SELENBP1	1,54E-04	-3,62			
			EPB42	2,35E-04	-3,65			
			CA1	1,26E-04	-3,85			
			HBM	7,13E-05	-4,58			
			AHSP	7,34E-05	-4,65			
			ALAS2	1,22E-04	-5,31			

4.1.3.5.2 In monoklonalen OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien

Das Genexpressionsprofil in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses wurde ebenfalls in den monoklonalen OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien mittels RNA-Seq untersucht. Die Genexpression von vier OCI-AML3 *FLT3*-ITD-high und vier OCI-AML3 *FLT3*-ITD-low Zelllinien wurde miteinander verglichen.

Die Erhebung der Daten erfolgte am Genzentrum München in der Arbeitsgruppe von Dr. H. Blum. Die Datenauswertung wurde von Dipl.-Math. Vindi Jurinovic vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt (siehe 3.2.4.1). Als signifikant dereguliert wurden nur Gene mit einem adjustierten p-Wert von $\leq 0,05$ und einem *Fold Change* (FC) von $\geq 1,5$ (hochreguliert) bzw. $\leq -1,5$ (herunterreguliert) angesehen. Die Expression von vier Genen war in den OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien im Vergleich zu den OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien signifikant hochreguliert. Von keinem Gen war die Expression signifikant herunterreguliert (siehe Tabelle 26). *FLT3* war das am stärksten hochregulierte Gen. *FLT3* war aufgrund der ITD in OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien vierfach stärker exprimiert als in OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien. Außerdem waren *EGR1* (FC: 3,77), *IL-8* (FC: 2,98) und *BCYRN1* (FC: 2,72) in OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien signifikant stärker exprimiert.

Tabelle 26: Liste der differentiell exprimierten Gene bei Vergleich der OCI-AML3 FLT3-ITD-high mit den OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien. Mittels RNA-Seq wurde das Genexpressionsprofil von OCI-AML3 FLT3-ITD-high und OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien ermittelt. Die Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Signifikant deregulierte Gene (adjustierter p-Wert $\leq 0,05$; $FC \geq 1,5$ bzw. $FC \leq -1,5$) sind aufgelistet. FC: *Fold-change*; adj. adjustiert

high versus low		
Gen	adj. p-Wert	FC
<i>FLT3</i>	4,76E-10	4,09
<i>EGR1</i>	1,35E-07	3,77
<i>IL-8</i>	2,55E-03	2,98
<i>BCYRN1</i>	2,55E-03	2,72

Abbildung 26 zeigt die Heatmap aller signifikant deregulierten Gene vor Adjustierung der p-Werte. Es fällt auf, dass das GEP einer OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinie dem GEP einer OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinie ähnlicher war als dem GEP der anderen OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinien. Auch umgekehrt entsprach das GEP einer OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinie eher dem GEP einer OCI-AML3 FLT3-ITD-high Zelllinie. Ordnet man diese Zelllinien der jeweils anderen Gruppe zu und wiederholt die Analyse, war *FLT3* nicht mehr unter den signifikant deregulierten Genen. Dies beweist, dass die Proben nicht vertauscht wurden und es begründet die niedrige Zahl an signifikant deregulierten Genen in der Genexpressionsanalyse der monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien.

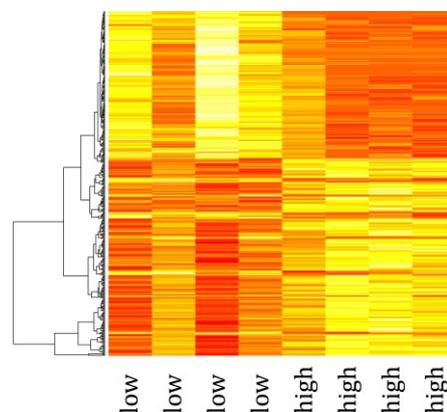


Abbildung 26: Heatmap aller signifikanten Gene vor Adjustierung der p-Werte bei der Genexpressionsanalyse der monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien. Es wurden jeweils vier OCI-AML3 FLT3-ITD-low bzw. -high Zelllinien untersucht. rot: herunterreguliert; gelb: hochreguliert

Beim Vergleich der signifikant differentiell exprimierten Gene in den AML-Patienten mit den signifikant differentiell exprimierten Genen in den Zelllinien gab es keine Übereinstimmung. Keines der vier in den Zelllinien signifikant hochregulierten Gene (*FLT3*, *EGR1*, *IL-8*, *BCYRN1*) war auch in den AML-Patienten signifikant dereguliert.

4.2 Transkriptionelle Regulation des *FLT3*-Promotors

Blasten von Patienten mit AML oder ALL zeigen häufig eine Überexpression von FLT3 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene [62, 66]. Extrem hohe *FLT3*-WT-Expressionslevel führen zur konstitutiven Aktivierung von FLT3 [265]. AML-Patienten mit überexprimiertem *FLT3*-WT haben eine ungünstige Prognose für das Gesamtüberleben [266]. Eine Ursache für die Überexpression von *FLT3*-WT könnte in einer erhöhten Transkriptionsrate begründet liegen, welche unter anderem durch Mutationen in Transkriptionsfaktoren oder im *FLT3*-Promotor hervorgerufen sein könnte. Deshalb wurde im Folgenden die Wirkung von Transkriptionsfaktoren auf die Promotoraktivität des proximalen *Flt3*-Promotors mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System untersucht. Es wurden die zugehörigen Vektoren der 3. Generation (pGL3) verwendet. Zur Messung der *Flt3*-Promotoraktivität wurde der *Flt3*-Promotor an ein *firefly*-Luciferasegen (Reporter) gekoppelt, dessen Expression er in Abhängigkeit des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors reguliert. Die Aktivität der *firefly*-Luciferase kann quantifiziert werden und erlaubt Rückschlüsse auf die *Flt3*-Promotoraktivität. Die Reporterkonstrukte sowie die Funktionsweise des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems sind in 3.2.1.20 näher beschrieben. Als proximaler *Flt3*-Promotor wurden -901 Basen *upstream* der *Flt3*-Transkriptionsstartstelle in Exon 1 definiert [242].

4.2.1 Identifizierung von hämatopoetischen *FLT3*-Transkriptionsfaktoren

Mit Hilfe einer Datenbank (Transfac®) und einer Software (MatInspector) zur Suche nach Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) wurde nach Transkriptionsfaktoren (TF) gesucht, die im proximalen Promotor von *FLT3* binden. MatInspector fand im proximalen Promotor von *FLT3* insgesamt 261 TFBS. Bei der Suche wurde mit der Bibliothek „*Transcription factor binding sites (Weight matrices)*“ gearbeitet. Alle Matrizen der Matrixgruppen „*General Core Promotor Elements*“ und „*Vertebrates*“ wurden ausgewählt. Die „*Core similarity*“ betrug 0,75 und die „*Matrix similarity*“ war optimiert. Die gefundenen TFBS konnten nach Gewebe unterschieden werden, darunter das hämatopoetische System. 60 der 261 gefundenen TFBS waren TFBS für insgesamt 48 hämatopoetische TF. Für manche TF gab es mehrere Bindestellen im proximalen *FLT3*-Promotor. Über die Datenbank Transfac® konnte nicht nach Gewebe diskriminiert werden. Die Matrizengruppe „*vertebrate_non_redundant_minFP*“ wurde ausgewählt. Diese wendet automatisch *Cut-off*-Kriterien an, um Falschpositive zu minimieren. Es wurden 45 TFBS gefunden. Insgesamt gab es sieben TF, die von beiden Systemen identifiziert wurden, zwei davon waren hämatopoetische TF (*paired box 5* (PAX5); *v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog* (MYB)).

4.2.2 PAX5 als schwacher Repressor, MYB als starker Aktivator des *Flt3*-Promotors

Die Aktivität des *Flt3*-Promotors wurde in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen des PAX5- bzw. des MYB-Transkriptionsfaktors untersucht. Die Promotoraktivität des *Flt3*-Promotors wurde mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System gemessen.

In einem Vorversuch wurde zunächst das optimale Verhältnis zwischen *firefly*-Luciferase und *Renilla*-Luciferase ermittelt. Es wurden die Verhältnisse 10:1 und 200:1 getestet. Mit beiden Verhältnissen wurde ein gutes und nahezu identisches Ergebnis erzielt. Der promotorlose *firefly*-Luciferase-Vektor zeigte wie gewünscht nur eine schwache Hintergrundaktivität, der *Renilla*-Luciferase-Vektor mit einem konstitutiv aktiven SV40-Promotor, eine 32-fach (10:1) bzw. 37-fach (200:1) stärkere Aktivität

als der promotorlose Vektor (Daten nicht gezeigt). Für die anschließenden Versuche wurde ein Verhältnis von *firefly* zu *Renilla* Luciferase gewählt, das zwischen den getesteten Verhältnissen liegt (1:100).

Mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System konnte gezeigt werden, dass PAX5 auf den *Flt3*-Promotor schwach repressorisch wirkt. Die relative Luciferase-Aktivität spiegelt die *Flt3*-Promotoraktivität wieder. Diese lag in HEK-293T Zellen für alle Ansätze, die neben dem *Flt3*-Promotor auch den Transkriptionsfaktor PAX5 enthielten, 15,8-33,2% unterhalb der basalen *Flt3*-Promotoraktivität. Dabei nahm die *Flt3*-Promotoraktivität mit zunehmender PAX5-Menge ab (siehe Abbildung 27 PAX5). Die basale *Flt3*-Promotoraktivität wurde in einer Probe gemessen, die nur den *Flt3*-Promotor und keinen transgenen Transkriptionsfaktor enthält.

Vom Transkriptionsfaktor MYB wurden zwei Transkriptionsvarianten (TV) untersucht. Die TV1 kodiert die längste Isoform des Proteins. TV2 ist kürzer als TV1, da ihr durch alternatives Spleißen ein Exon in der kodierenden Region fehlt. Die beiden Transkriptionsvarianten des Transkriptionsfaktors MYB aktivierten den *Flt3*-Promotor gleichermaßen. Die Aktivität des *Flt3*-Promotors lag in Anwesenheit einer der beiden Transkriptionsvarianten des Transkriptionsfaktors MYB zwei- bis dreifach über der basalen *Flt3*-Promotoraktivität und nahm mit zunehmendem MYB-Expressionslevel bis auf den fünf- bis sechsfachen Wert der basalen *Flt3*-Promotoraktivität zu (siehe Abbildung 27 MYB (TV1) und MYB (TV2)).

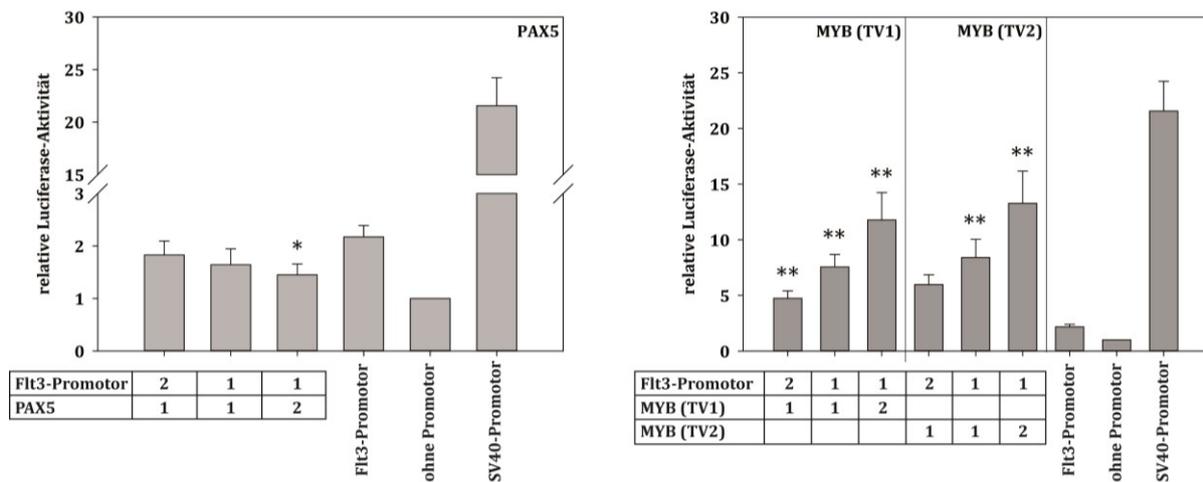


Abbildung 27: *Flt3*-Promotoraktivität in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors PAX5 oder MYB in HEK-293T. Mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System wurde die relative Luciferase-Aktivität bestimmt. Diese gibt die *Flt3*-Promotoraktivität wieder. Die relative Luciferase-Aktivität berechnet sich aus dem Quotienten *firefly*/*Renilla* Luciferase-Aktivität der Probe geteilt durch den Quotienten *firefly*/*Renilla* Luciferase-Aktivität des Ansatzes „ohne Promotor“. Der Ansatz „ohne Promotor“ misst die Hintergrundaktivität des Systems, da er zwar das Reporterogen, aber keinen Promotor enthält. Dem Ansatz „*Flt3*-Promotor“ wurde kein transgener Transkriptionsfaktor zugegeben. Mit diesem Ansatz wurde die basale Aktivität des *Flt3*-Promotors in HEK-293T Zellen gemessen. Der Ansatz „SV40-Promotor“ enthält ebenfalls keinen transgenen Transkriptionsfaktor. Der SV40-Promotor ist konstitutiv aktiv und stellt somit eine Positivkontrolle dar, die die Funktionalität des Systems überprüft. Zur Bestimmung der *Flt3*-Promotoraktivität in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors PAX5 bzw. MYB (TV1 oder TV2) wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse des *Flt3*-Promotors und des jeweiligen Transkriptionsfaktors untersucht. Diese Mischungsverhältnisse sind in 3.2.1.8.3 näher beschrieben. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Die Expressionslevel der Transkriptionsfaktoren wurden mittels Western Blot überprüft. Dazu wurde die Transfektion des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems wie unter 3.2.1.8.4 beschrieben „upgescaled“ und in HEK-293T im 6 Well wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 gezeigt. Sowohl für PAX5 als auch für die beiden Transkriptionsvarianten von MYB nahm die Bandenintensität mit zunehmender Menge des jeweiligen Transkriptionsfaktors zu. Das Verhältnis von *Flt3*-Promotor zu Transkriptionsfaktor von 2:1 enthielt die geringste Menge an Transkriptionsfaktor. Die Ansätze zeigten auch jeweils die schwächste PAX5- bzw. MYB-Expression im Western Blot. Die stärkste Expression war beim Verhältnis 1:2 zu sehen, bei dem jeweils die vierfache Menge des Transkriptionsfaktors bezogen auf das Verhältnis 2:1 zum Einsatz kam. Je mehr DNA eines Transkriptionsfaktors eingesetzt wurde, desto stärker war auch die Expression des jeweiligen Proteins. Auch die Ansätze des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems, die keinen Transkriptionsfaktor enthielten, wurden untersucht. Da HEK-293T eine endogene PAX5-Expression besitzen, war in den Ansätzen ohne transgenen Transkriptionsfaktor eine schwache PAX5-Expression zu sehen. Da HEK-293T keine endogene MYB-Expression aufweisen, ist in den Ansätzen ohne transgenes MYB keine spezifische Bande zu erkennen.

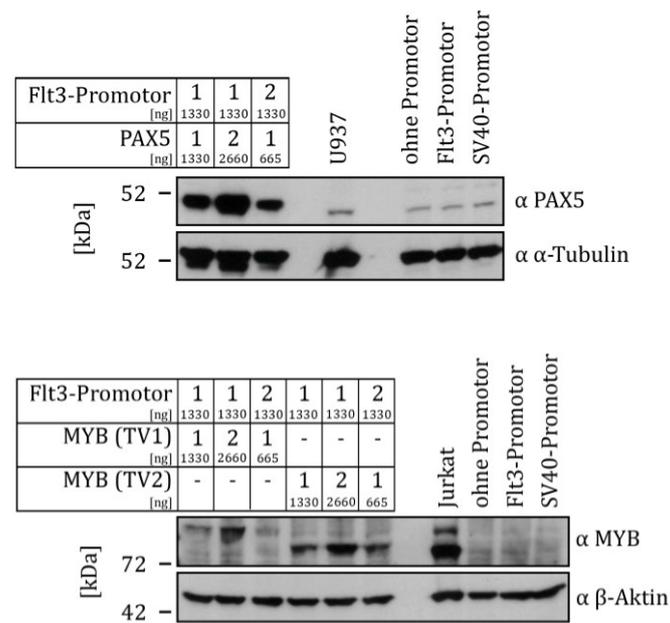


Abbildung 28: Expressionsnachweis der Transkriptionsfaktoren PAX5 und MYB in HEK-293T. Ganzzelllysate von HEK-293T Zellen wurden hergestellt. HEK-293T Zellen wurden zuvor mit den im Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendeten Ansätzen (im upgescalten Maßstab, siehe 3.2.1.8.4) transfiziert. U937 bzw. Jurkat dienen als Positivkontrolle, da diese Zelllinien endogen PAX5 bzw. MYB (TV1 und TV2) exprimieren. Die Detektion erfolgte mit einem PAX5- bzw. MYB-spezifischen Antikörper mittels Western Blot. Als Ladekontrolle wurde α-Tubulin bzw. β-Aktin verwendet.

Die endogene PAX5-Expression von HEK-293T wurde in einem unabhängigen Versuch bestätigt. Verglichen wurde dabei mittels Western Blot die PAX5- bzw. MYB-Expression von nativen HEK-293T mit für den jeweiligen Transkriptionsfaktor transgenen HEK-293T (siehe Abbildung 29).

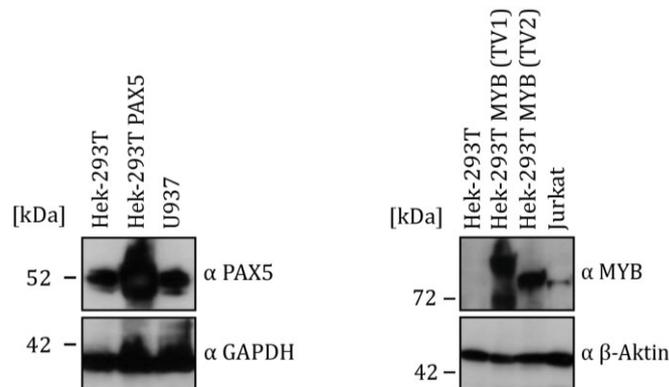


Abbildung 29: Überprüfung der endogenen PAX5- und MYB-Expression von HEK-293T. Ganzzelllysate von U937 bzw. Jurkat, nativen HEK-293T, und mit pCMV6-PAX5 bzw. pCMV6-MYB transient transfizierten HEK-293T Zellen wurden hergestellt. Neben den transgenen HEK-293T Zellen dienten auch die U937 bzw. Jurkat, die endogenen PAX5 bzw. MYB exprimieren, als Positivkontrolle der PAX5- bzw. MYB-Expression. Die Detektion erfolgte mit einem PAX5- bzw. MYB-spezifischen Antikörper mittels Western Blot. Als Ladekontrolle wurde GAPDH bzw. β -Aktin verwendet.

4.2.3 CEBPA als Regulator des *Flt3*-Promotors

Ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP; *single nucleotide polymorphism*) im Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor CEBPA in einer familiären AML (n.A932C; p.Q311P) war Anlass, einen möglichen Zusammenhang zwischen wildtypischem bzw. mutiertem Transkriptionsfaktor CEBPA und der *FLT3*-Promotoraktivität zu untersuchen. Der Transkriptionsfaktor CEBPA steuert die Expression zahlreicher Gene, die bei der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu reifen Granulozyten von Bedeutung sind [267]. Eine Arbeit von Volpe *et al.* zeigt, dass der Transkriptionsfaktor CEBPA an einen regulatorischen Bereich von *FLT3* bindet und dass ein Zusammenhang zwischen der *CEBPA*- und *FLT3*-Expression besteht [268].

Mittels des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems konnte gezeigt werden, dass CEBPA-WT und CEBPA Q311P zu einer Aktivierung des *Flt3*-Promotors führen. Während der CEBPA-Wildtyp den *Flt3*-Promotor um das Zwei- bis Viereinhalbfache aktivierte, aktivierte der mutierte Transkriptionsfaktor CEBPA Q311P den *Flt3*-Promotor um das Drei- bis Elfache im Vergleich zur basalen *Flt3*-Promotoraktivität (siehe Abbildung 30). Die *Flt3*-Promotoraktivität nahm dabei mit zunehmendem CEBPA-Expressionslevel zu. Die basale *Flt3*-Promotoraktivität wurde in einer Probe gemessen, die zwar den *Flt3*-Promotor, aber keinen transgenen CEBPA-Transkriptionsfaktor enthielt.

p30 ist eine physiologische Isoform von CEBPA, die in geringen Mengen neben dem normalen, 42 kDa großen CEBPA-Protein vorkommt. Die p30 Isoform von CEBPA entsteht durch ein alternatives Startcodon innerhalb desselben offenen Leserahmens. Ihr fehlen die ersten 117 N-terminalen Aminosäuren [269, 270] und folglich Domänen, die den Kontakt zum Transkriptionsapparat vermitteln [271]. Die p30 Isoform von CEBPA fungierte somit als Negativkontrolle. Im Dual-Luciferase® Reporter Assay System konnte keine Aktivierung des *Flt3*-Promotors durch CEBPA p30 hervorgerufen werden. Die Werte der relativen Luciferase-Aktivität, die die *Flt3*-Promotoraktivität widerspiegelt, bewegen sich im Rahmen der basalen *Flt3*-Promotoraktivität.

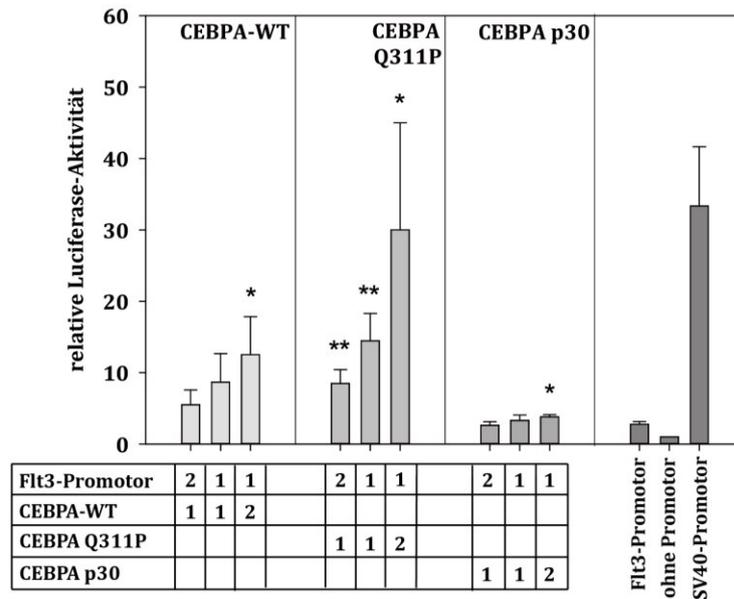


Abbildung 30: FIt3-Promotoraktivität in Anwesenheit des wildtypischen oder mutierten Transkriptionsfaktors CEBPA oder der p30 Isoform in HEK-293T. Mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System wurde die relative Luciferase-Aktivität bestimmt. Diese gibt die *FIt3*-Promotoraktivität wieder. Die relative Luciferase-Aktivität berechnet sich aus dem Quotienten *firefly/Renilla* Luciferase-Aktivität der Probe geteilt durch den Quotienten *firefly/Renilla* Luciferase-Aktivität des Ansatzes „ohne Promotor“. Der Ansatz „ohne Promotor“ misst die Hintergrundaktivität des Systems, da er zwar das Reporter gen, aber keinen Promotor enthält. Dem Ansatz „FIt3-Promotor“ wurde kein transgener Transkriptionsfaktor zugegeben. Mit diesem Ansatz wurde die basale Aktivität des *FIt3*-Promotors in HEK-293T Zellen gemessen. Der Ansatz „SV40-Promotor“ enthält ebenfalls keinen transgenen Transkriptionsfaktor. Der SV40-Promotor ist konstitutiv aktiv und stellt somit eine Positivkontrolle dar, die die Funktionalität des Systems überprüft. Zur Bestimmung der *FIt3*-Promotoraktivität in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors CEBPA (CEBPA-WT; CEBPA Q311P; CEBPA p30) wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse des *FIt3*-Promotors und des jeweiligen Transkriptionsfaktors untersucht. Diese Mischungsverhältnisse sind in 3.2.1.8.3 näher beschrieben. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Mittels Western Blot wurden die CEBPA-Expressionslevel überprüft. Dazu wurde zunächst die Transfektion des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems wie unter 3.2.1.8.4 beschrieben „upgescalt“ und in HEK-293T im 6 Well durchgeführt. Da sowohl die 42 kDa als auch die 30 kDa Isoform im Zellkern lokalisiert ist [272], wurden neben zytoplasmatischen Proteinlysaten auch Kernlysate hergestellt. Stellvertretend wurde mit dem Verhältnis 1:1 von *FIt3*-Promotor zu Transkriptionsfaktor gearbeitet. Mit Hilfe des Qproteome® Nuclear Protein Kit von QIAGEN (Hilden) wurden die zytosolischen Proteine, die Nukleinsäure-bindenden Proteine und „unlösliche“ nukleäre Proteine getrennt voneinander isoliert. In den beiden Fraktionen, die die nukleären Proteine enthalten, zeigten CEBPA-WT und CEBPA Q311P eine nahezu identische Proteinexpression. Während CEBPA Q311P auch im Zytoplasma exprimiert wurde, war CEBPA-WT im Zytoplasma kaum vorhanden. Die zytoplasmatische Expression von CEBPA Q311P soll mittels Immunfluoreszenz noch bestätigt werden. Die CEBPA p30 Isoform kam ebenfalls in beiden Fraktionen der nukleären Proteine vor, vor allem jedoch in der Fraktion der „unlöslichen“ nukleären Proteine (siehe Abbildung 31).

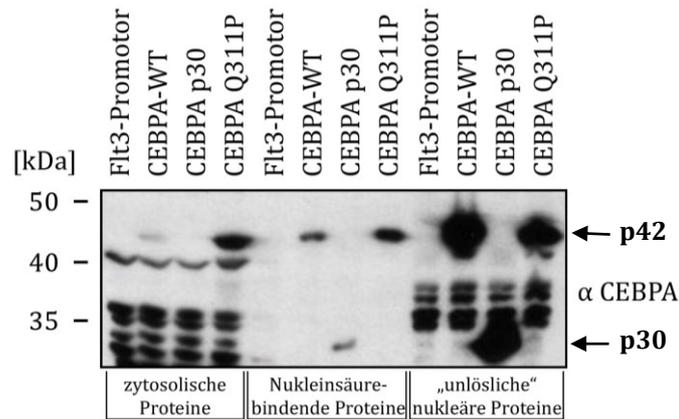


Abbildung 31: Expressionsnachweis von CEBPA-WT, CEBPA p30 und CEBPA Q311P im Zytosol und Zellkern von HEK-293T. Mit Hilfe des Qproteome Nuclear Protein Kit von QIAGEN wurden die zytosolischen Proteine, Nukleinsäure-bindenden Proteine sowie die „unlöslichen“ nukleären Proteine aus CEBPA-WT, CEBPA p30 oder CEBPA Q311P transient exprimierenden HEK-293T Zellen isoliert und immungeblottet. HEK-293T Zellen wurden zuvor mit den im Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendeten Ansätzen im upgescalten Maßstab wie unter 3.2.1.8.4 beschrieben, transfiziert. Es wurde nur das Verhältnis 1:1 von *Flt3*-Promotor und CEBPA-Transkriptionsfaktor untersucht. Die Detektion von CEBPA erfolgte mit einem CEBPA-spezifischen Antikörper. CEBPA-WT, CEBPA Q311P: ~42 kDa; CEBPA p30: ~30 kDa

Ganzzelllysate von CEBPA-WT, CEBPA Q311P und CEBPA p30 in den Verhältnissen 2:1, 1:1 und 1:2 von *Flt3*-Promotor zum jeweiligen Transkriptionsfaktor zeigten mit zunehmend eingesetzter DNA-Menge an Transkriptionsfaktor eine stärkere Bandenintensität (Expression des jeweiligen Proteins). Zudem zeigten HEK-293T keine endogene CEBPA-Expression (Abbildung 32).

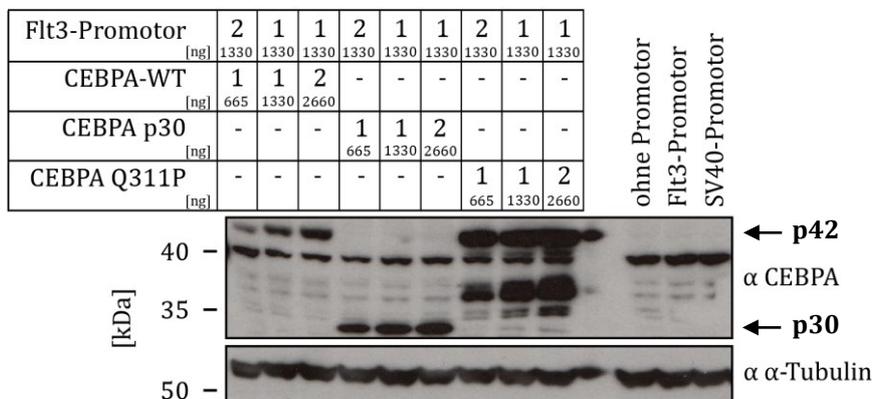


Abbildung 32: Quantitativer Expressionsnachweis von CEBPA-WT, CEBPA p30 und CEBPA Q311P in HEK-293T. Ganzzelllysate von CEBPA-WT, CEBPA Q311P oder CEBPA p30 exprimierenden HEK-293T Zellen wurden hergestellt. HEK-293T Zellen wurden zuvor mit den im Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendeten Ansätzen (im upgescalten Maßstab, siehe 3.2.1.8.4) transfiziert. Die Detektion erfolgte mit einem CEBPA-spezifischen Antikörper mittels Western Blot. Als Ladekontrolle wurde α-Tubulin verwendet. CEBPA-WT, CEBPA Q311P: ~42 kDa; CEBPA p30: ~30 kDa

4.3 Funktionelle Charakterisierung von Mutationen in den Rezeptortyrosinkinasen DDR1 und DDR2 in der AML

Neue Sequenzieretechniken (*Next Generation Sequencing*) ermöglichen einen immer tieferen Einblick in die molekulare Pathogenese der AML. Ziel ist es mittels *Next Generation Sequencing* neue leukämogene und therapeutische Zielstrukturen zu validieren. Ein Fokus liegt dabei auf Mutationen in Genen, die für Tyrosinkinasen kodieren. In der diesem Teilprojekt zugrunde liegenden Arbeit von Greif *et al.* aus unserer klinischen Kooperationsgruppe wurden durch Exom-Sequenzierung (*Whole Exome Sequencing*) 13 somatische Mutationen in APL-Patienten identifiziert. Darunter befand sich eine zuvor nicht beschriebene Mutation in der Rezeptortyrosinkinase DDR2 (D854N) [273]. In der AML sind mutierte Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) häufig [274] und spielen eine große Rolle bei der Entstehung der Erkrankung. Da RTKs therapeutische Zielmoleküle darstellen [47], haben sie einen besonderen Stellenwert. Die Rezeptortyrosinkinasen DDR1 und DDR2 wurden bisher vor allem mit soliden Tumoren und nur selten mit hämatologischen Neoplasien in Verbindung gebracht [121]. Bezüglich der AML sind in der Literatur insgesamt neun AML-Fälle mit einer *DDR1*- oder *DDR2*-Mutation beschrieben [106, 273, 275, 276]. Ziel dieses Teilprojektes der vorliegenden Arbeit war deshalb die funktionelle Charakterisierung einiger dieser AML-assoziierten *DDR*-Mutationen, um eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese der AML zu erfassen. Neben der *DDR2* D854N Mutation waren dies die nicht-synonymen *DDR*-Mutationen *DDR1* A766V, *DDR2* G222R und *DDR2* M291I. *DDR1* A766V ist in der Tyrosinkinasedomäne von *DDR1* lokalisiert. *DDR2* G222R und *DDR2* M291I befinden sich in der extrazellulären Domäne von *DDR2*, *DDR2* D854N am C-Terminus. Des Weiteren wurde die Expression der *DDR*-Kinasen in AML-Zelllinien und AML-Patienten untersucht.

4.3.1 Stabile Expression wildtypischer und mutierter *DDR1*- bzw. *DDR2*-Rezeptoren in Ba/F3

Die aus murinen pro-B-Zellen generierte IL-3 abhängige Ba/F3 Zelllinie [277] ist zu einem gängigen Modellsystem bei der Untersuchung von Kinasemutationen geworden [278]. Die Ba/F3 Zelllinie wurde deshalb zur Analyse der *DDR1*- und *DDR2*-Mutationen verwendet.

Die cDNA des wildtypischen *DDR1*- bzw. *DDR2*-Rezeptors wurde in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV-IRES-EYFP (MIY) kloniert. Die Mutationen *DDR1* A766V, *DDR2* G222R, *DDR2* M291I und *DDR2* D854N wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese in die wildtypische *DDR1*- bzw. *DDR2*-Sequenz integriert. Als Kontrollen wurden die kinasetoten Mutanten des *DDR1*- bzw. *DDR2*-Rezeptors generiert (*DDR1* K618A, *DDR2* K608E). Durch die vollständige Sequenzierung der *DDR1*- und *DDR2*-cDNA konnten die erfolgreiche Mutagenese bestätigt und unerwünschte zusätzliche Mutationen ausgeschlossen werden. Die retrovirale Transduktion ermöglichte die stabile Expression der Vektorkontrolle MIY, des *DDR1*- und *DDR2*-Wildtyp-Rezeptors, der mutierten Rezeptoren *DDR1* A766V, *DDR2* G222R, *DDR2* M291I und *DDR2* D854N sowie der kinasetoten Mutanten *DDR1* K618A und *DDR2* K608E in Ba/F3. Erfolgreich transduzierte Ba/F3 Zellen wurden durchflusszytometrisch anhand des koexprimierten EYFP sortiert. Die Expression des *DDR1*- und *DDR2*-Rezeptors wurde an der Zelloberfläche (nur *DDR1*) der transgenen Ba/F3 Zellen (siehe Abbildung 33A) und auf Proteinebene (*DDR1* und *DDR2*) im Western Blot (siehe Abbildung 33B) nachgewiesen. Gut funktionierende Antikörper für den Oberflächennachweis von *DDR2* standen nicht zur Verfügung. Für den durchflusszytometrischen Oberflächennachweis des *DDR1*-Rezeptors wurde ein PE-konjugierter CD167a-Antikörper verwendet. Native Ba/F3 sowie die Vektorkontrolle MIY exprimierten kein *DDR1* und zeigten folglich keine Oberflächenexpression des *DDR1*-Rezeptors.

Die transgenen Ba/F3 Zellen wiesen hingegen eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Färbung mit CD167a-Antikörper und somit eine deutliche Oberflächenexpression des DDR1-Rezeptors auf (siehe Abbildung 33A). Die Oberflächenexpression des DDR1-Rezeptors für DDR1-WT und DDR1 A766V war annähernd gleich stark (MFI-Ratio = 9,93 und 9,88), während sie für die kinetotote Mutante DDR1 K618A etwas schwächer war (MFI-Ratio = 6,59).

Zudem wurde die Expression der MIY-DDR1- und MIY-DDR2-Konstrukte in Ba/F3 im Western Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 33B). Alle Konstrukte zeigten eine DDR1- bzw. DDR2-Expression im Western Blot. Die transgenen Ba/F3 Zellen zeigten eine einheitliche Stärke der DDR1-Banden. Bei den mit den MIY-DDR2-Konstrukten transduzierten Ba/F3 Zellen zeigten die Ba/F3 DDR2-WT und Ba/F3 DDR2 D854N eine stärkere DDR2-Expression im Vergleich zu den Ba/F3 DDR2 G222R, Ba/F3 DDR2 M291I und der kinetototen Mutante Ba/F3 DDR2 K608E. Auch hier fehlte die DDR1- bzw. DDR2-Expression in den nativen Ba/F3 und der Vektorkontrolle MIY, da diese wie bereits oben erwähnt kein DDR1 bzw. DDR2 exprimieren.

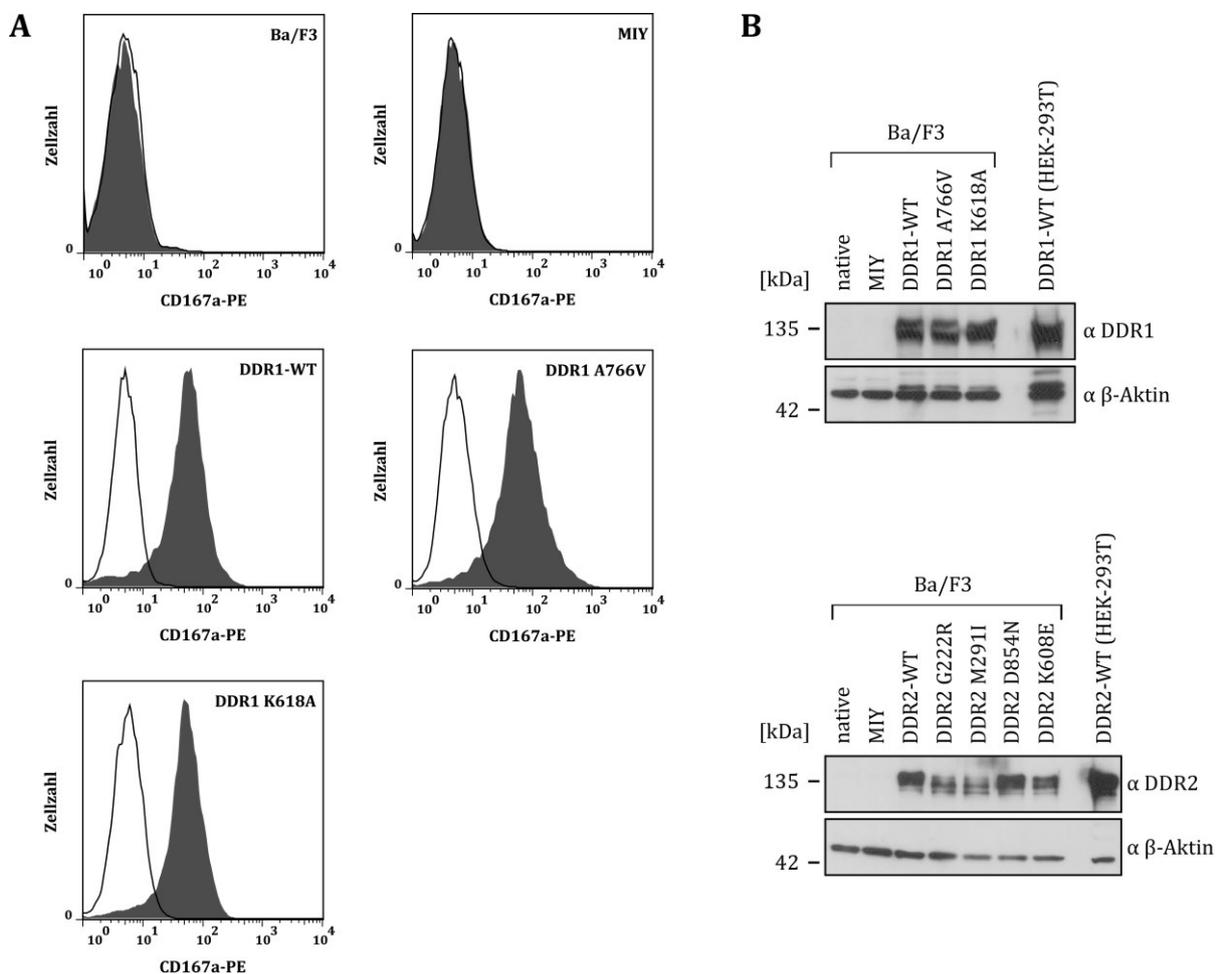


Abbildung 33: Oberflächenexpression des DDR1-Rezeptors in Ba/F3 (A) und Nachweis der DDR1- und DDR2-Proteinexpression in Ba/F3 (B). (A) Abgebildet sind die Histogramme nativer und transgener Ba/F3 Zellen, die die Oberflächen-expression des DDR1-Rezeptors zeigen. Das weiße Histogramm repräsentiert die Zellen nach Färbung mit IgG1-PE-Antikörper (Isotypkontrolle), das dunkelgraue Histogramm die Zellen nach Färbung mit spezifischem CD167a-Antikörper. Gezeigt ist eine repräsentative Messung von zwei unabhängigen Messungen. (B) Ganzzelllysate der nativen und transgenen Ba/F3 Zellen wurden auf die Proteinexpression des DDR1-Rezeptors bzw. DDR2-Rezeptors hin untersucht. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines DDR1- bzw. DDR2-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Als Positivkontrolle wurde ein Ganzzelllysate von HEK-293T Zellen eingesetzt, die den DDR1- bzw. DDR2-Wildtyp-Rezeptor exprimieren.

4.3.2 Kein onkogenes Zellwachstumspotential DDR-exprimierender Ba/F3

Nach Transduktion mit transformierenden Genen wachsen Ba/F3 Zellen IL-3 unabhängig. Das transformierende Potential der mutierten DDR1- und DDR2-Rezeptoren in Ba/F3 wurde untersucht. Dazu wurden die transgenen, DDR1- bzw. DDR2-exprimierenden Ba/F3 Zellen mit und ohne Wachstumsfaktor IL-3 kultiviert. Die Anzahl lebender Zellen wurde nach 72 Stunden mit dem Vi-CELL™ XR bestimmt. Keine der *DDR1*- oder *DDR2*-Mutationen führte zu einem IL-3 unabhängigen Wachstum. Native Ba/F3, Ba/F3 mit der Vektorkontrolle MIY, Ba/F3 DDR1- bzw. DDR2-Wildtyp und Ba/F3 mit den DDR1- bzw. DDR2-Mutanten zeigten kein signifikant unterschiedliches Wachstumsverhalten. Das Wachstumsverhalten der transgenen Ba/F3 glich dem der nativen Ba/F3. Im Vergleich zu ihrem Wachstum mit IL-3, zeigten die Ba/F3 Zelllinien ohne IL-3 eine extrem geringe Wachstumsrate (2,8-4,0%). Auch die Zugabe des DDR-Liganden Kollagen bei der Kultivierung der Ba/F3 Zelllinien ohne IL-3 (Stimulation mit humanem Kollagen Typ I über 72 Stunden) führte zum gleichen Ergebnis und konnte das Zellwachstum nicht stimulieren. Das Wachstumsverhalten der DDR1- und DDR2-exprimierenden Ba/F3 Zellen mit und ohne Kollagen ist in Abbildung 34 gezeigt.

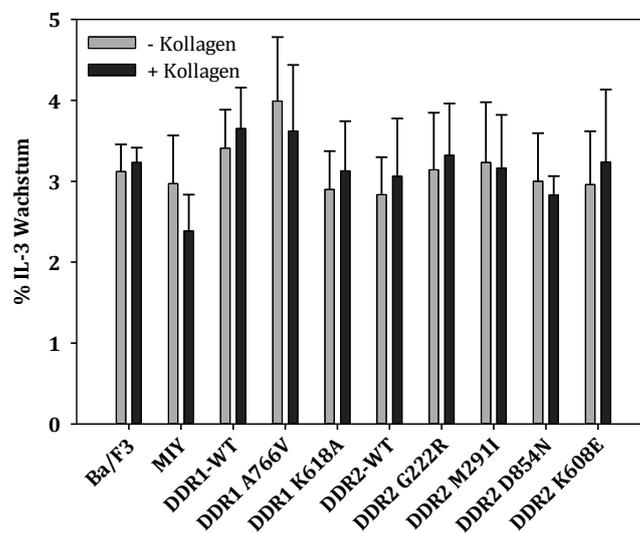


Abbildung 34: Wachstumsverhalten der DDR1- und DDR2-exprimierender Ba/F3 mit und ohne Kollagen. Die nativen und transgenen Ba/F3 Zellen wurden entweder ohne IL-3 in An- bzw. Abwesenheit von Kollagen (10 µg/ml) oder nur mit IL-3 (10 ng/ml) in einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen pro Milliliter ausgesät. Nach 72 Stunden wurde die Lebendzellzahl pro Milliliter ermittelt. Die Lebendzellzahl pro Milliliter des Ansatzes der nur IL-3 enthielt, wurde als 100% definiert. Dargestellt ist das Verhältnis der Ansätze ohne IL-3 in An- bzw. Abwesenheit von Kollagen zum jeweiligen Ansatz mit nur IL-3 in Prozent. Der Mittelwert und die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen sind gezeigt.

In einem weiteren Versuch wurden native und transgene Ba/F3 langsam von IL-3 entwöhnt. Bei eventuell schwächer transformierendem Potential dient die langsame Entwöhnung der Zellen von IL-3 der sensitiveren Erfassung eines möglichen Phänotyps. Bei der langsamen IL-3-Entwöhnung wurden die nativen und die transgenen Ba/F3 Zellen zunächst für drei Tage mit 0,1% WEHI-3B konditioniertem Medium kultiviert, bevor sie anschließend sechs Tage ohne WEHI-3B konditioniertem Medium kultiviert wurden. Täglich wurde die Lebendzellzahl mit Hilfe des Vi-CELL™ XR bestimmt. Ein Teil der entwöhnten Zellen wurde außerdem kontinuierlich mit Kollagen inkubiert, ein anderer Teil ohne Kollagen gehalten. Auch hier war keinerlei Unterschied im Wachstumsverhalten auszumachen zwischen den Zelllinien, die kontinuierlich vom IL-3 entwöhnt und die in An- oder Abwesenheit von Kollagen kultiviert wurden (Abbildung 35 oben). Das Zellwachstum stagnierte beim Übergang von 0,1% zu 0% WEHI-3B konditioniertem Medium. Nach

Tag 7 (Tag 4 ohne IL-3) nahm die Zellzahl ab. Nur bei der IL-3-Kontrolle, bei der die Ba/F3 Zelllinien weiterhin kontinuierlich mit 10 ng/ml IL-3 kultiviert wurden, stieg die Zellzahl kontinuierlich an (Abbildung 35 unten).

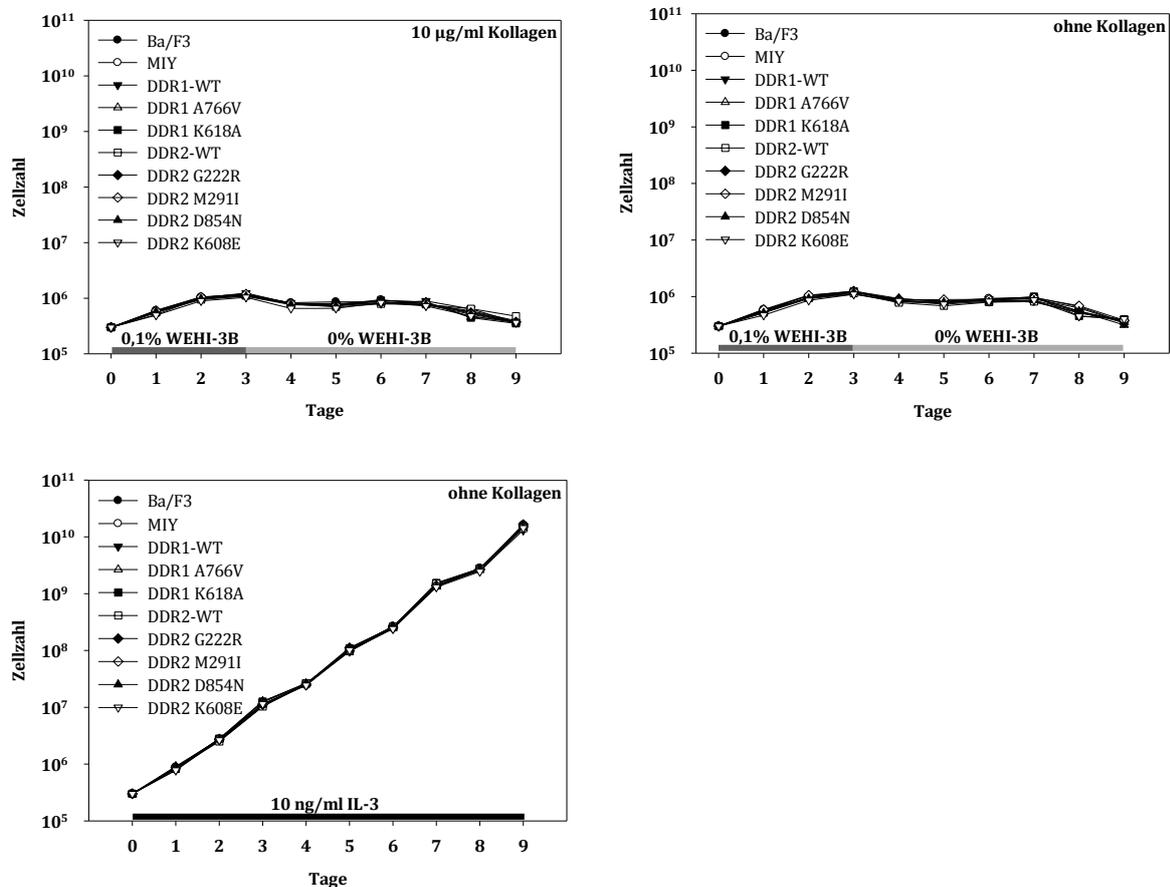


Abbildung 35: Wachstumsverhalten der DDR1- und DDR2-exprimierenden Ba/F3 bei langsamem IL-3 Entzug. 3×10^5 native oder transgene Ba/F3 Zellen pro Milliliter wurden in 0,1% WEHI-3B konditioniertem Medium in An- bzw. Abwesenheit von Kollagen (10 µg/ml) ausgesät und drei Tage kultiviert bevor 3×10^5 Zellen pro Milliliter in 0% WEHI-3B konditioniertem Medium mit oder ohne Kollagen überführt wurden und für weitere sechs Tage kultiviert wurden. In einem weiteren Ansatz wurden die nativen und transgenen Ba/F3 Zellen ohne Kollagen aber dafür kontinuierlich mit IL-3 kultiviert. Auch hier wurden anfangs 3×10^5 Zellen pro Milliliter ausgesät. Täglich wurde die Lebendzellzahl pro Milliliter ermittelt. Der Mittelwert von zwei unabhängigen Messungen ist jeweils gezeigt.

4.3.3 Transiente Expression wildtypischer und mutierter DDR1- bzw. DDR2-Rezeptoren in HEK-293T

Um die Aktivierungskinetik der wildtypischen und mutierten DDR1- bzw. DDR2-Rezeptoren zu untersuchen, wurden diese mittels Calciumphosphat-Transfektion in HEK-293T transient exprimiert. Zunächst erfolgte ein Expressionsnachweis der Konstrukte mittels Western Blot (siehe Abbildung 36). Es bestand kein Unterschied in der Gesamtproteinmenge zwischen unstimuliertem und mit Kollagen stimuliertem Zelllysate. Die MIY-DDR1-Konstrukte zeigten in HEK-293T eine vergleichbare Expressionsstärke. Für DDR2 war das MIY-DDR2-WT-Konstrukt am stärksten und die kinastetote Mutante DDR2 K608E am schwächsten exprimiert. Die Expressionsstärke der DDR2-Mutationen lag dazwischen. Native HEK-293T sowie HEK-293T mit der Vektorkontrolle MIY zeigten keine endogene DDR1- oder DDR2-Proteinexpression.

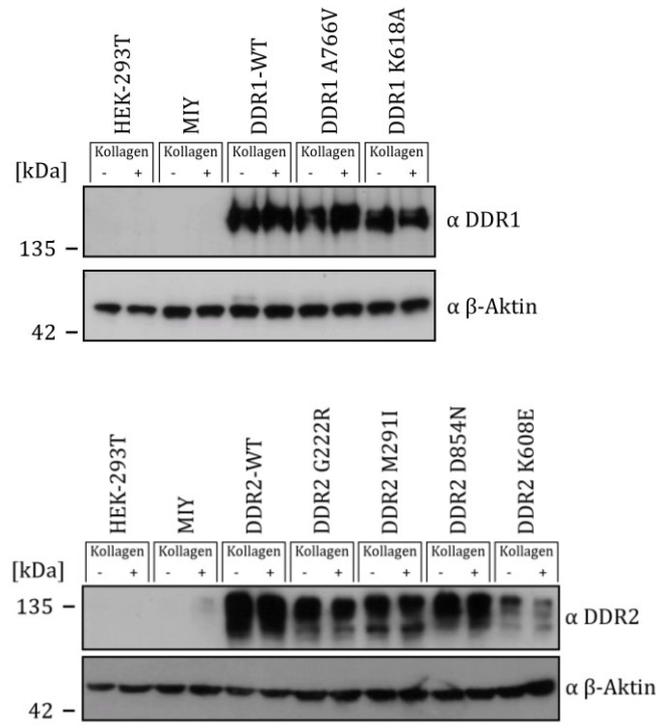


Abbildung 36: Nachweis der DDR1- und DDR2-Proteinexpression in HEK-293T. Ganzzelllysate der nativen und der mit MIY-*DDR1* bzw. MIY-*DDR2* transient transfizierten HEK-293T Zellen wurden auf die Proteinexpression des DDR1- bzw. DDR2-Rezeptors hin untersucht. Die Zellyse erfolgte zwei Tage nach Transfektion der Zellen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines DDR1- bzw. DDR2-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Die wildtypische und mutierte *DDR1*- bzw. *DDR2*-cDNA wurde den HEK-293T Zellen über Calciumphosphat-Transfektion vermittelt. Die Zellen wurden entweder direkt lysiert (-) oder vor der Lyse für 90 Minuten mit 10 μ g/ml Kollagen stimuliert (+).

4.3.4 Aktivierungskinetik wildtypischer und mutierter DDR1- bzw. DDR2-Rezeptoren

Die Rezeptortyrosinkinase DDR1 und DDR2 werden durch Bindung ihres Liganden Kollagen autophosphoryliert und aktiviert [149]. Im Vergleich zur Ligand-induzierten Aktivierung der meisten anderen RTKs ist die Kollagen-induzierte Aktivierung der wildtypischen DDR-Kinasen jedoch langsamer [149]. Zur Ermittlung der Zeitkinetik der Kollagen-induzierten Phosphorylierung der wildtypischen und mutierten DDR1- und DDR2-Kinasen wurden Zelllysate unstimulierter und mit Kollagen (human, Typ I) stimulierter DDR1- und DDR2-exprimierender HEK-293T Zellen hergestellt. Die Stimulation dauerte zwischen null und 720 Minuten (12 Stunden). Die DDR1- und DDR2-Rezeptoren wurden dann mit einem DDR1- bzw. DDR2-Antikörper immunpräzipitiert und die Phosphorylierung der Rezeptoren mit Hilfe eines phospho-Tyrosin-Antikörpers im Western Blot detektiert (siehe Abbildung 37). Die Phosphorylierung der wildtypischen DDR1- und DDR2-Rezeptoren erfolgte nur langsam nach Zugabe ihres Liganden Kollagen. Die maximale Phosphorylierung der wildtypischen Rezeptoren wurde erst nach mindestens 60 Minuten erreicht. Außerdem war die Phosphorylierung langandauernd. Drei Stunden nach Stimulation waren die wildtypischen DDR-Rezeptoren noch immer stark phosphoryliert. Erst nach 12 Stunden war die Phosphorylierung fast komplett verschwunden. Ähnlich verhielt sich die Mutante DDR2 D854N. Die maximale Phosphorylierung wurde nach 30 Minuten erreicht. Im Gegensatz zum DDR2-Wildtyp-Rezeptor blieb die Phosphorylierung jedoch auch nach 12 Stunden maximal. Anders verhielten sich die extrazellulären *DDR2*-Mutationen DDR2 G222R und DDR2 M291I. Bereits unstimuliert zeigten die

extrazellulären DDR2-Mutanten eine starke Phosphorylierung, die durch Zugabe von Kollagen nur noch unwesentlich verstärkt werden konnte. Wie erwartet zeigten die kinasetoten Mutanten DDR2 K608E und DDR1 K618E keinen phosphorylierten Rezeptor. Die DDR1-Mutante DDR1 A766V verhielt sich wie der oben beschriebene DDR1-Wildtyp-Rezeptor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ligand-induzierte Aktivierung der Rezeptoren DDR1-WT, DDR1 A766V, DDR2-WT und DDR2 D854N langsam stattfand und sehr langanhaltend war. Die extrazellulären DDR2-Mutanten, DDR2 G222R und DDR2 M291I hingegen waren bereits unstimuliert stark phosphoryliert und ihre Aktivierung ließ sich durch Ligandstimulation kaum verstärken.

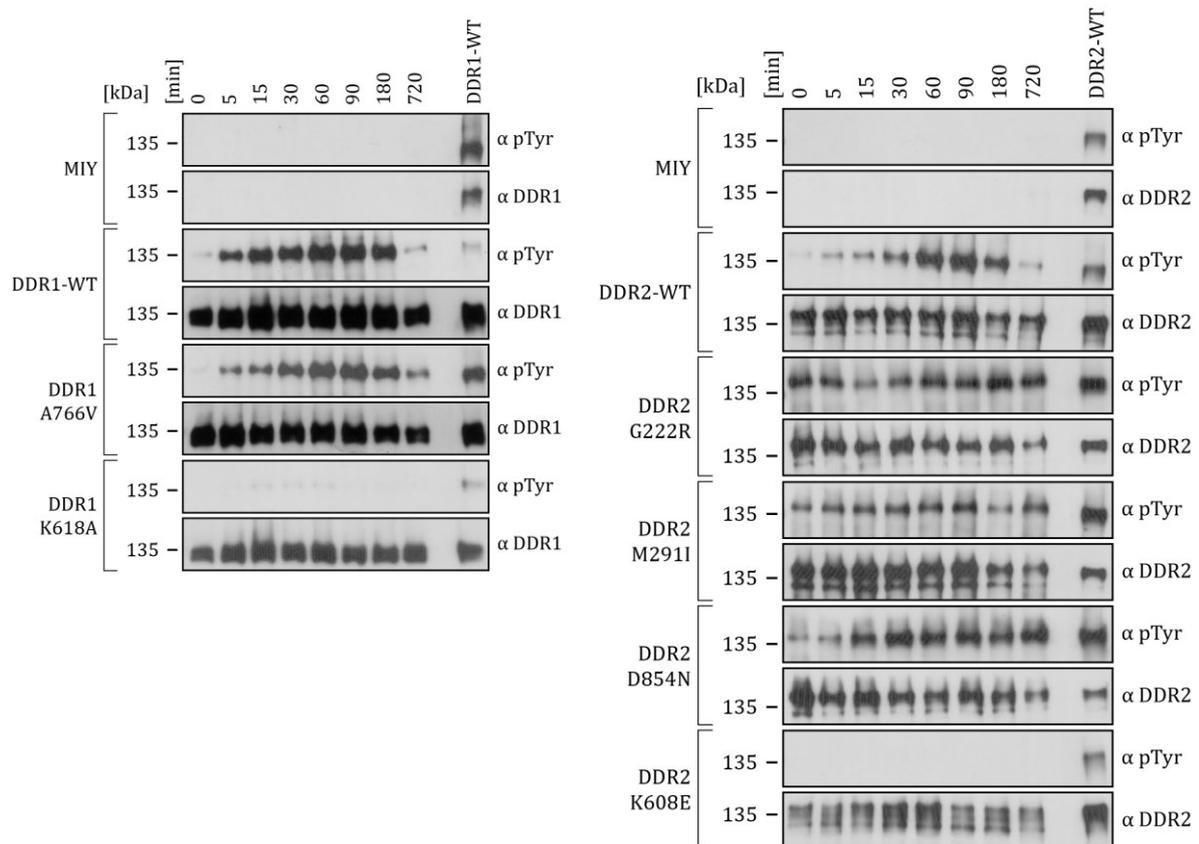


Abbildung 37: Zeitkinetik der DDR1- und DDR2-Phosphorylierung in HEK-293T. Ganzzelllysate von unstimulierten (0 min) und Kollagen-stimulierten (10 µg/ml; human, Typ I; 5, 15, 30, 60, 90, 180, 720 min), serum-gehungenen DDR1-WT, DDR1 A766V, DDR1 K618A und DDR2-WT, DDR2 G222R, DDR2 M291I, DDR2 D854N, DDR2 K608E exprimierenden HEK-293T Zellen wurden hergestellt. Die DDR1- bzw. DDR2-Rezeptoren wurden mit DDR1- bzw. DDR2-Antikörper aus den Ganzzelllysaten immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem phospho-Tyrosin-Antikörper immungeblottet. Die Blots wurden gestrippt und anschließend mit DDR1- bzw. DDR2-Antikörper inkubiert.

Abbildung 38 zeigt die Quantifizierung der Kollagen-induzierten relativen Phosphorylierung der wildtypischen und mutierten DDR1- bzw. DDR2-Rezeptoren dieser Zeitkinetik.

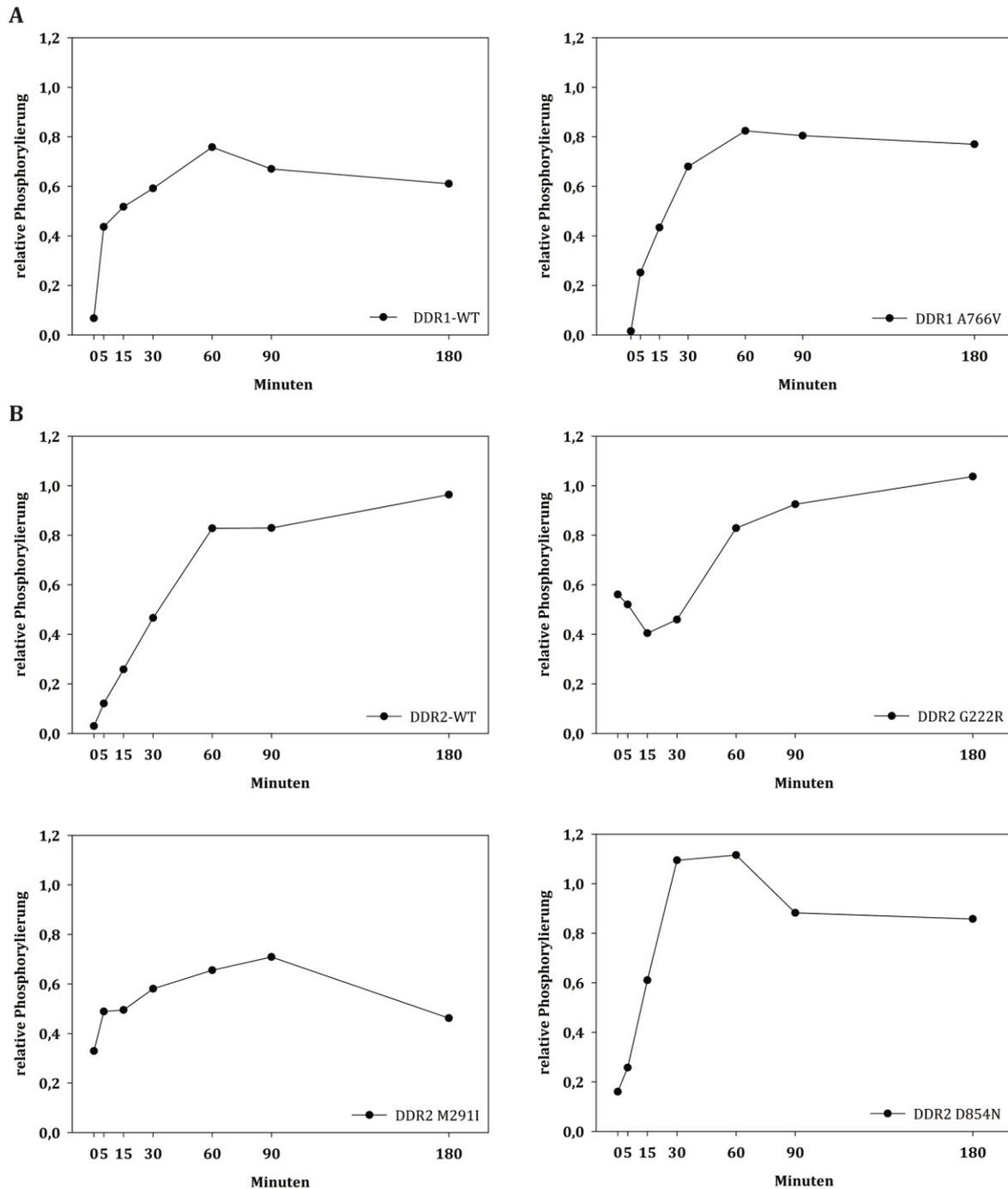


Abbildung 38: Quantifizierung der relativen Phosphorylierung der wildtypischen und mutierten DDR1- bzw. DDR2-Rezeptoren bei Stimulation mit Kollagen. Die bei der Zeitkinetik der Kollagen-induzierten (A) DDR1- bzw. (B) DDR2-Phosphorylierung in HEK-293T erhaltene Aktivierung der wildtypischen und mutierten Rezeptoren (siehe Abbildung 37) wurde mit Hilfe der Software ImageJ quantifiziert. Als Maß für die Aktivierung der Rezeptoren wurde für jedes Stimulationsintervall die Ratio von phosphoryliertem zum gesamten DDR ermittelt (relative Phosphorylierung). Es ist ein Versuch gezeigt.

4.3.5 Adhäsionsverhalten von humanen Leukämie-Zelllinien und DDR-exprimierenden Ba/F3

Eine Hauptfunktion von DDR-Rezeptoren ist die Regulierung der Zelladhäsion [121, 279]. AML-Zelllinien (HL-60, MOLM-13, MV4-11, OCI-AML3, THP-1) und eine CML-Zelllinie (K-562) wurden in An- und Abwesenheit von Kollagen 72 Stunden kultiviert. AML-Zelllinien (außer THP-1) adhärten nur vereinzelt an die Kollagenfasern. THP-1 Zellen bildeten kleine Trauben entlang der Kollagenfasern, dies jedoch auch ohne Zugabe von Kollagen. Nur die CML-Zelllinie K-562 zeigte eine ausgeprägte Traubenbildung entlang der Kollagenfasern während sie in kollagenfreiem Medium als runde Einzelzellen vorlagen (Daten nicht gezeigt).

Um die Zelladhäsion in den DDR-exprimierenden Ba/F3 Zellen zu untersuchen, wurden native und transgene Ba/F3 Zellen in An- und Abwesenheit von Kollagen ausgesät und über mehrere Tage beobachtet. Täglich wurde eine fotografische Aufnahme der Zellen gemacht. Die Aufnahmen der Zellen in Anwesenheit von Kollagen sind in Abbildung 39 dargestellt. Die Zellen wurden dabei zunächst drei Tage in 0,1% WEHI-3B konditioniertem Medium und dann in WEHI-3B-freiem Medium kultiviert. Eine weitere Kontrolle war ein Ansatz mit 10 ng/ml IL-3. Ba/F3 DDR1-WT und Ba/F3 DDR1 A766V bildeten Zelltrauben entlang der Kollagenfasern. In geringerem Maße auch die kinasetote Mutante Ba/F3 DDR1 K618A. Diese Zelltrauben lösten sich im Medium ohne WEHI-3B nach und nach auf. Für Ba/F3 mit wildtypischem oder mutiertem DDR2-Rezeptor lagerten sich nur einzelne Zellen an die Kollagenfasern an. In den Kontrollen ohne Kollagen bzw. mit IL-3 lagen die Zellen als runde Einzelzellen in Suspension vor (Daten nicht gezeigt).

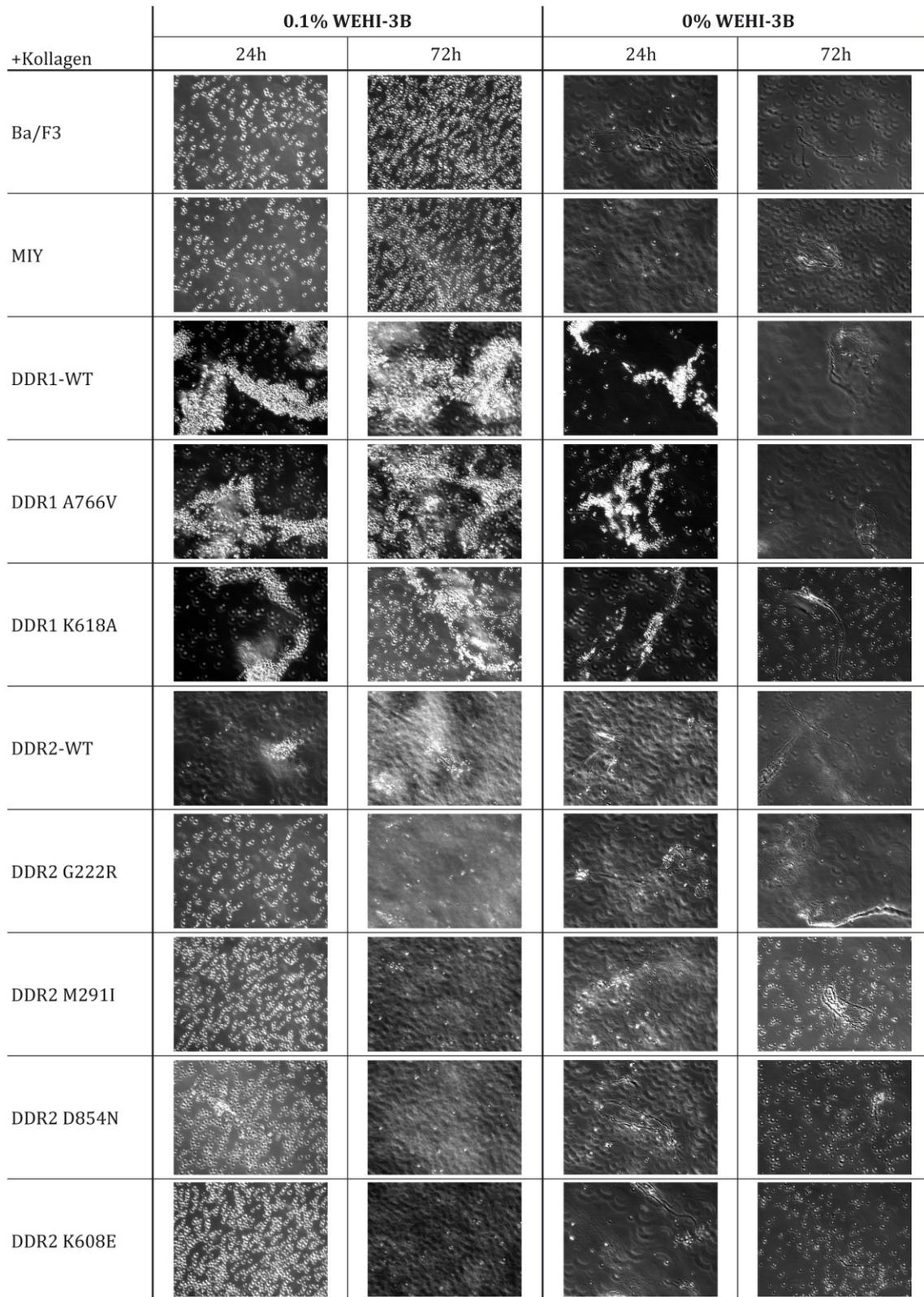


Abbildung 39: Adhäsionsverhalten der nativen und transgenen Ba/F3 in Anwesenheit von Kollagen. 3×10^5 native oder transgene Ba/F3 Zellen wurden pro Milliliter in 0,1% WEHI-3B konditioniertem Medium in Anwesenheit von $10 \mu\text{g/ml}$ Kollagen ausgesät und drei Tage kultiviert. Dann wurden 3×10^5 Zellen pro Milliliter in 0% WEHI-3B konditioniertem Medium mit $10 \mu\text{g/ml}$ Kollagen überführt und für weitere sechs Tage kultiviert. Täglich wurde eine Aufnahme des Adhäsionsverhaltens der Zellen erstellt. Gezeigt sind jeweils die Aufnahmen nach 24 und 72 Stunden in 0,1% bzw. 0% WEHI-3B konditioniertem Medium mit $10 \mu\text{g/ml}$ Kollagen.

4.3.6 Endogene DDR1-Proteinexpression in K-562

Da bei einer Reihe von soliden Tumoren eine veränderte DDR-Expression beschrieben ist [121], wurde in dieser Arbeit die endogene DDR1- und DDR2-Proteinexpression in verschiedenen AML- und einer CML-Zelllinie untersucht. In den untersuchten Zelllinien (EOL-1, HL-60, THP-1, KASUMI-1, KG-1, MOLM-13, MV4-11, NB-4, OCI-AML3 und K-562) zeigte nur die CML-Zelllinie K-562 sowohl im Western Blot als auch bei der CD167a-Oberflächenfärbung eine endogene DDR1-Proteinexpression (Daten nicht gezeigt). Für den Oberflächennachweis von DDR2 stand kein gut funktionierender Antikörper zur Verfügung. Im Western Blot konnte für DDR2 noch kein Ergebnis erzielt werden.

4.3.7 Herunterregulierte Expression von *DDR1* und *DDR2* in der AML

Das Expressionsniveau von *DDR1* und *DDR2* wurde in 562 AML-Patientenproben mittels GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays und GeneChip® Human Genome U133A/B Arrays von Affymetrix untersucht und mit zehn gesunden Kontrollproben verglichen. Die Patienten wurden im Rahmen der AMLCG 99 Studie (*de novo* AML, sekundäre AML, Hochrisiko-MDS; ab 16 Jahren) und der M3 AMLCG Studie (APL; 16-60 Jahre) rekrutiert. Die Datenauswertung der vorliegenden Analyse wurde von Dr. Tobias Herold durchgeführt. Die Daten wurden, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, generiert und ausgewertet.

In allen untersuchten AML-Subgruppen, ELN-Risikogruppen und FAB-Gruppen war eine Genexpression von *DDR1* bzw. *DDR2* nachweisbar (siehe Abbildung 40). In den untersuchten AML-Subgruppen mit Ausnahme der AML mit isolierter Trisomie 13 (nur *DDR1*) lag der Median der Genexpression sowohl für *DDR1* als auch für *DDR2* unterhalb des medianen Expressionslevels der gesunden Kontrollproben. Gleiches gilt für die ELN-Risikogruppen bzw. FAB-Gruppen. Zwischen den ELN-Risikogruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede in den Expressionslevel von *DDR1* bzw. *DDR2*. Es wurden keine geschlechterspezifischen Expressionsunterschiede von *DDR1* und *DDR2* gefunden (Daten nicht gezeigt).

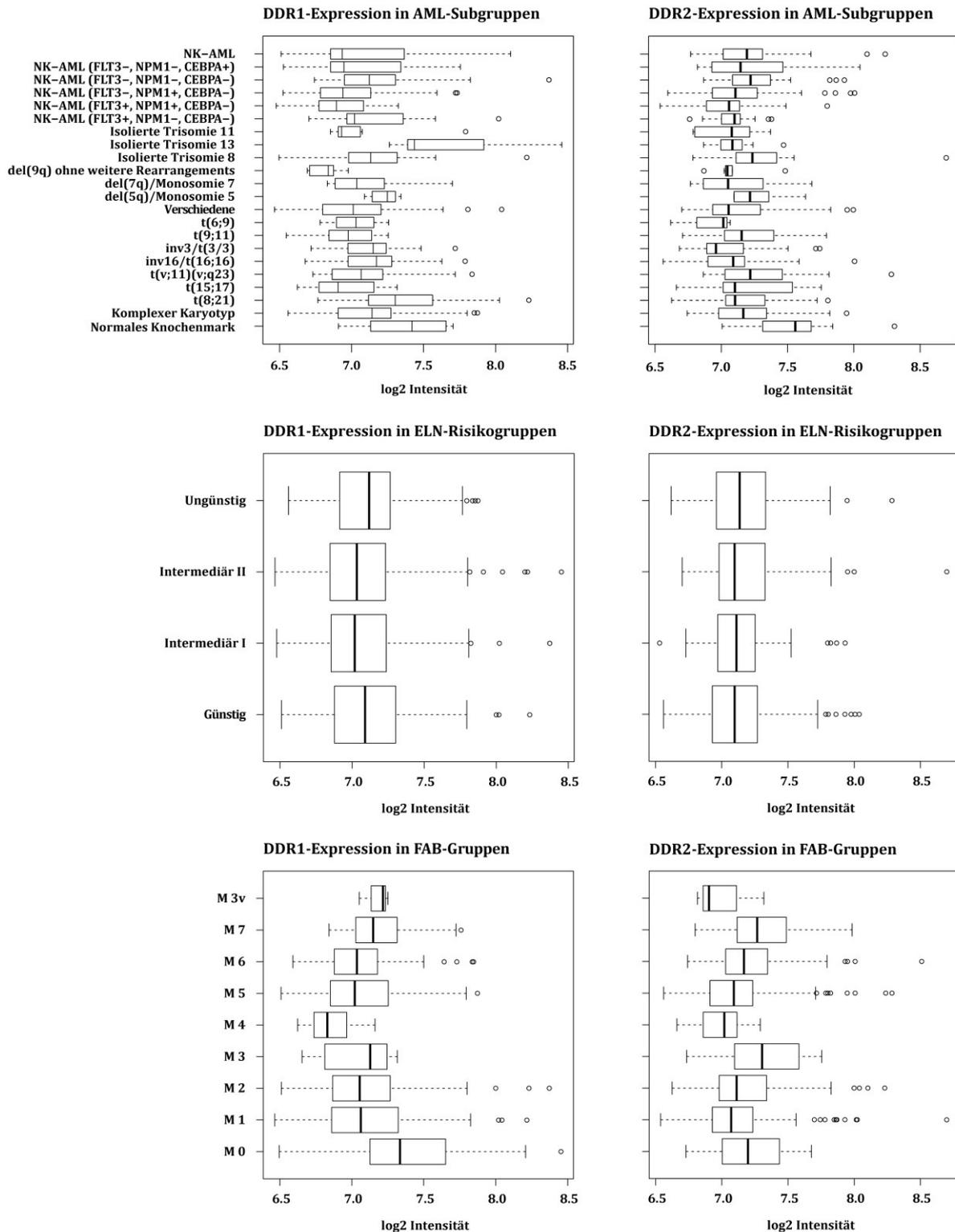


Abbildung 40: DDR1- bzw. DDR2-Expressionlevel in AML-Patienten. Gezeigt sind die DDR1- bzw. DDR2-Expressionslevel in verschiedenen, nach zytogenetischen und molekulargenetischen Merkmalen eingeteilten AML-Subgruppen, ELN-Risikogruppen und FAB-Gruppen.

4.3.8 Geplante Experimente

Für die weitere funktionelle Charakterisierung der *DDR1*- und *DDR2*-Mutationen soll das Adhäsionsverhalten näher untersucht werden. Zelladhäsion zählt zu den Hauptaufgaben der DDR-Rezeptoren [121]. Dazu werden HEK-293 Zellen verwendet, die stabil wildtypischen oder mutierten *DDR1*- bzw. *DDR2*-Rezeptor exprimieren. Der Adhäsionsversuch wie in Xu et al. [280] beschrieben, befindet sich aktuell im Aufbau. Geplant sind außerdem Versuche zur Inhibition von *DDR1* und *DDR2* und deren Auswirkung auf die Phosphorylierung der Rezeptoren. Als Inhibitoren für *DDR1* und *DDR2* sind in der Literatur die BCR-ABL (*Breakpoint Cluster Region-Abelson*) Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib beschrieben [281, 282]. Imatinib ist zur Behandlung von CML sowie gastrointestinaler Stromatumoren unter anderem in Deutschland zugelassen, Nilotinib zur Behandlung von CML und Dasatinib zur Behandlung von CML sowie Philadelphia-Chromosom-positiver ALL. Im Jahr 2013 wurde *in vitro* *DDR1-IN-1* als ein neuer, selektiver *DDR1*-Inhibitor beschrieben [283].

5 Diskussion

5.1 Funktionelle Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen in der AML

Ein gehäuftes gleichzeitiges Auftreten von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen bei AML-Patienten generell und bei NK-AML-Patienten im Besonderen wird in mehreren Studien beschrieben [222, 224, 225] und deutet auf einen möglichen pathogenen Zusammenhang dieser beiden Mutationen hin. Um die Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen bei der Pathogenese der AML zu belegen, hat man sich bisher ausschließlich auf klinische Daten von NK-AML-Patienten gestützt [26, 101, 222, 224]. Darüber hinaus haben mindestens vier Studien den Einfluss des Verhältnisses von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT (ITD/WT) auf klinische (Prognose-) Parameter untersucht [28, 71, 101, 102] und für die jeweils definierte Patientengruppe mit hoher *FLT3*-ITD-Last ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben [28, 71, 101], ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben [28, 71] sowie eine erhöhte Rezidivrate [71, 101] gezeigt. Schneider *et al.* aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass das ITD/WT-Verhältnis nur in Gegenwart einer *NPM1*-Mutation eine Rolle spielt und ein zunehmendes ITD/WT-Verhältnis nur bei NK-AML-Patienten mit *NPM1*-Mutation das Gesamtüberleben und Rezidiv-freie Überleben der Patienten signifikant negativ beeinflusst (siehe Abbildung 6). Bei NK-AML-Patienten mit *NPM1*-Wildtyp nimmt der *FLT3*-Status keinen Einfluss auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben der Patienten [240]. Diese Beobachtungen deuten auf eine Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen bei der Entstehung der AML hin.

5.1.1 Aufbau des Zellmodells und Verifizierung der Funktionalität

In der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von diesen klinischen Erkenntnissen ein Zellmodell etabliert, das die relevanten Genotypen dieser Beobachtungen modelliert. Das etablierte Zellmodell ist das erste zellbasierte Modell, in dem eine *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutation gleichzeitig exprimiert werden, um die Interaktion dieser beiden Mutationen bei der Entstehung der AML zu untersuchen. Die humane AML-Zelllinie OCI-AML3, die endogen die am häufigsten vorkommende *NPM1*-Mutation trägt, wurde hierzu ausgewählt. OCI-AML3 exprimieren zudem den *FLT3*-WT-Rezeptor. Mittels lentiviraler Transduktion wurde eine *FLT3*-ITD (NPOS) transgen in diesen Zellen exprimiert. Als Kontrollzelllinien dienten zum einen OCI-AML3 Zellen, die transgen den *FLT3*-WT-Rezeptor überexprimierten sowie eine Vektorkontrolle. Ausgehend von den mittels lentiviraler Transduktion generierten polyklonalen OCI-AML3 *FLT3*-NPOS Zellen wurden über Einzelzellsortierung monoklonale OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien hergestellt. Jede monoklonale Zelllinie besitzt ihr individuelles Verhältnis von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT. Es konnte gezeigt werden, dass sich dieses Verhältnis für eine monoklonale Zelllinie nicht ändert. Dies gilt auch für die polyklonalen OCI-AML3 *FLT3*-NPOS Zellen. So gelang es monoklonale OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien mit einem breiten Spektrum an ITD/WT-Verhältnissen zu erzeugen.

Zunächst wurden die polyklonalen Zelllinien des Zellmodells auf die Funktionalität des *FLT3*-Rezeptors und auf das Vorhandensein der *NPM1*-Mutation hin überprüft. Die *NPM1*-Mutation A wurde mittels Schmelzkurvenanalyse und durch Sequenzierung bestätigt. Die Folge einer *NPM1*-Mutation ist die Mislokalisierung des mutierten *NPM1*-Proteins ins Zytoplasma [221]. Die aberrante zytoplasmatische *NPM1*-Expression in OCI-AML3 wurde von Quentmeier *et al.* nachgewiesen [253]. Hierzu wäre der Nachweis von zytoplasmatischem *NPM1* in den transgenen OCI-AML3 Zelllinien des in dieser Arbeit etablierten Modells eine gute Ergänzung.

Die Expression des wildtypischen und mutierten FLT3-Rezeptors wurde sowohl an der Zelloberfläche als auch im Ganzzelllysate mittels Western Blot gezeigt. Ein Teil des in der Zelle vorkommenden FLT3 liegt als nicht-membrangebundene Form vor, der Rest als membrangebundene Form an der Zelloberfläche. Im Western Blot ist für FLT3 deshalb stets eine Doppelbande zu sehen. Die niedermolekulare der beiden Banden repräsentiert die schwach glykosylierte, nicht-membrangebundene Form des FLT3-Proteins, die höhermolekulare Bande die stärker glykosylierte, transmembranöse Form [62, 255]. Im Gegensatz zum wildtypischen FLT3 überwiegt bei FLT3 mit einer ITD die nicht-membrangebundene Form. Dies ist bei beiden Expressionsnachweisen deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 13). Einen weiteren Beweis liefert das Molekulargewicht. Die in dieser Arbeit verwendete *FLT3*-ITD führt zu einem FLT3-Protein, das im Vergleich zum Wildtyp 28 Aminosäuren größer ist, was zu einem höheren Molekulargewicht führt. Im Western Blot ist die Bande, die die nicht-membrangebundene Form repräsentiert deshalb für FLT3-ITD stärker und höhermolekular als bei FLT3-WT. Auch der Nachweis der Oberflächenexpression belegt, dass der FLT3-ITD-Rezeptor überwiegend in der schwächer glykosylierten, nicht-membrangebundenen Form vorliegt. Aufgrund der Überexpression des transgenen FLT3-ITD-Rezeptors in den OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen ist die Expressionstärke wie erwartet höher als bei nativen OCI-AML3 und der Vektorkontrolle (die endogen den FLT3-WT-Rezeptor exprimieren), aber deutlich niedriger als bei überexprimiertem, transgenem FLT3-WT-Rezeptor.

Charakteristisch für eine *FLT3*-ITD ist die Ligand-unabhängige Dimerisierung, Autophosphorylierung und folglich konstitutive Aktivierung des Rezeptors [82]. Dass der mutierte Rezeptor deshalb konstitutiv maximal aktiv ist und durch FL nicht mehr weiter stimuliert werden kann [74], wurde durch einen Phospho-FLT3-ELISA bestätigt. Für den FLT3-WT-Rezeptor hingegen führt die Bindung des FL zur Aktivierung des Rezeptors [74]. Die Stimulierbarkeit des FLT-WT-Rezeptors mit FL wurde ebenfalls mit Hilfe des Phospho-FLT3-ELISA demonstriert.

Ein weiterer Unterschied zwischen FLT3-WT- und FLT3-ITD-Rezeptor liegt in der Signalvermittlung. Während FLT3-WT den AKT- und MAPK-Signalweg aktiviert, zeichnet sich FLT3-ITD durch die zusätzliche Aktivierung des STAT5-Signalwegs aus [87]. Dies konnte per Western Blot verifiziert werden.

Zusammenfassend konnte die *NPM1*-Mutation sowie die Funktionalität des FLT3-WT- und FLT3-ITD-Rezeptors in nativen OCI-AML3 und den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien bestätigt werden.

5.1.2 Analyse des Proliferationsverhaltens

5.1.2.1 Proliferationsvorteil FLT3-ITD-exprimierender OCI-AML3 *in vitro*

Ein mechanistischer Zusammenhang zwischen beiden Mutationen wurde bisher nicht nachgewiesen. In Bezug auf klinische Merkmale, Überleben und Therapieansprechen lassen statistische Analysen jedoch eine Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen erkennen. Basierend auf den klinischen Daten von Döhner *et al.* wäre ein synergistisches Zusammenwirken denkbar. Im Vergleich zu Patienten ohne *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutation oder mit nur einer von beiden Mutationen, haben Patienten mit beiden Mutationen signifikant höhere Leukozytenzahlen, einen höheren Blastenanteil im peripheren Blut und im Knochenmark sowie höhere Laktat-Dehydrogenasewerte. Diese Merkmale weisen auf eine hohe proliferative Aktivität von leukämischen Blasten mit beiden Mutationen hin [26].

Die Untersuchung der proliferativen Aktivität der Zelllinien des in dieser Arbeit etablierten Zellmodells bestätigte, dass OCI-AML3, die beide Mutationen (*NPM1c+* und *FLT3-ITD*) besitzen in Kokultur einen Proliferationsvorteil gegenüber nativen OCI-AML3 hatten, die nur die *NPM1*-Mutation tragen. Dieser Proliferationsvorteil nahm mit zunehmendem ITD/WT-Verhältnis weiter zu. Dies deutet darauf hin, dass *NPM1*- und *FLT3-ITD*-Mutationen bei der Leukämogenese zusammenwirken. OCI-AML3 *FLT3-ITD* mit hohem ITD/WT-Verhältnis zeigten in Kokultur mit nativen OCI-AML3 einen stärkeren kompetitiven Wachstumsvorteil als OCI-AML3 *FLT3-ITD* mit einem in etwa ausgeglichenem ITD/WT-Verhältnis (polyklonale OCI-AML3 *FLT3-NPOS*). Das schnellere Wachstumsverhalten von Zellen mit hohem ITD/WT-Verhältnis könnte die in den Studien von Schneider *et al.* und Schnittger *et al.* beschriebene negative Auswirkung eines zunehmenden ITD/WT-Verhältnisses auf das Überleben von AML-Patienten [240, 284] begründen. Warum jedoch *FLT3-ITD*-low Zelllinien (mit niedrigem ITD/WT-Verhältnis) von nativen OCI-AML3 in Kokultur überwachsen wurden, konnte noch nicht geklärt werden. Zu erwarten war, dass *FLT3-ITD*-low Zelllinien native OCI-AML3 ebenfalls überwachsen, allerdings langsamer als die polyklonalen OCI-AML3 *FLT3-NPOS* Zellen dies tun.

Das Auftreten des Wachstumsvorteils erst in der Langzeitproliferation lässt zwei Ursachen vermuten. Zum einen wäre denkbar, dass die beiden Mutationen nicht direkt miteinander interagieren und folglich biologische und phänotypische Effekte nicht nach 72 Stunden sichtbar sind. Zum anderen fördern beide Mutationen, insbesondere jedoch die *FLT3-ITD* die Proliferation und dies in Zellen, die sich von sich aus bereits schnell teilen. Dies könnte die Proliferationskapazität der Zellen an ihre Grenzen bringen, so dass nur geringe Proliferationsunterschiede erzeugt werden, die erst nach einer gewissen Zeit messbar werden.

FLT3 spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen [285]. Die Folgen einer *FLT3-ITD* sind die konstitutive Aktivierung des mutierten *FLT3*-Rezeptors [82] und die daraus resultierende Ligand-unabhängige Zellproliferation [84, 85, 87]. In Folge mitogener Stimuli nimmt die *NPM1*-Expression zu [286, 287]. Stark proliferierende Zellen zeigen überdurchschnittlich hohe Mengen an *NPM1* [288]. Abhängig von der Gendosis, dem Expressionslevel, den Interaktionspartnern und der Kompartimentierung fungiert *NPM1* sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor [187, 190]. *NPM1* hat viele Funktionen und Interaktionspartner. Dies macht es schwierig zu beurteilen, was die Summe der durch eine *NPM1*-Mutation hervorgerufenen Veränderungen in der Zelle bewirkt. Zum Beispiel führt eine *NPM1*-Mutation zu einer gesteigerten Proliferation, indem sie die Ubiquitinierung und proteosomale Degradation des Transkriptionsfaktors *MYC* verhindert [289, 290]. In transgenen Mäusen wirkt sich die *NPM1*-Mutation auf die Myelopoese aus und begünstigt die Proliferation myeloischer Zellen [291]. Außerdem tragen *NPM1*-Mutationen zur Destabilisierung und Inaktivierung von *ARF* bei, dessen Aufgabe in der Inhibition des Zellzyklus liegt [190, 292]. Es liegt jedoch nahe, dass beim gleichzeitigen Auftreten beider Mutationen, die *FLT3-ITD*-induzierten anti-apoptotischen und proliferativen Signalwege, insbesondere der *STAT5*-Signalweg, den leukämischen Phänotyp dominieren.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Zellmodell wurde der Beitrag der *FLT3-ITD*-Mutation zum Proliferationsvorteil der OCI-AML3 *FLT3-NPOS* Zellen ermittelt. Um *FLT3* (ITD und WT) dauerhaft zu inaktivieren und zu kontrollieren, ob folglich der Proliferationsvorteil der OCI-AML3 *FLT3-NPOS* Zellen aufgehoben ist, wurden die kompetitiven Wachstumsversuche von nativen OCI-AML3 und OCI-AML3 *FLT3-ITD* Zelllinien unter ständiger Anwesenheit des selektiven *FLT3*-Inhibitors AC220 [257] wiederholt. Es konnte bestätigt werden, dass die *FLT3-ITD* ab einer bestimmten *FLT3-ITD*-Last den Phänotyp dominiert, da in den ersten Wochen der Behandlung mit AC220 die OCI-AML3

FLT3-ITD-high Zelllinien und OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen ihren Wachstumsvorteil gegenüber nativen OCI-AML3 Zellen verloren. Erst nach vier bis zehn Wochen unter AC220-Behandlung proliferierten OCI-AML3 FLT3-ITD-Zelllinien wieder stärker als native OCI-AML3. Dies lässt vermuten, dass die FLT3-ITD nicht alleine zum kompetitiven Wachstumsvorteil der OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien führt oder dass die Zellen eine Resistenzmutation ausgebildet haben. Das Verhalten von OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien wurde durch die Zugabe des FLT3-Inhibitors nicht beeinflusst. Dies war zu erwarten, da die OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien zuvor keinen Wachstumsvorteil gezeigt haben.

Bei längerer Therapie von FLT3-ITD-positiven Zellen mit Kinase-Inhibitoren treten häufig Resistenzmutationen auf [258, 293]. Dies erschwert ihre klinische Anwendbarkeit insbesondere in Form einer Monotherapie. Nach Beenden des Versuchs wurden die Zellen deshalb auf alle Resistenzmutationen in FLT3 hin untersucht, die in Folge einer Langzeitbehandlung mit dem eingesetzten FLT3-Inhibitor AC220 [257] bisher bekannt sind [259, 260]. Dazu wurde die Tyrosinkinasedomäne des FLT3-Gens, in denen sich die bisher bekannten FLT3-Resistenzmutationen befinden, sequenziert. Bisher bekannte Resistenzmutationen betreffen zum Beispiel die Aminosäuren N676, F691 oder D835 von FLT3. Es konnten keine bekannten oder neuen Resistenzmutationen im untersuchten Bereich von FLT3 detektiert werden. Die Entwicklung eines alternativen Resistenzmechanismus kann nicht ausgeschlossen werden.

Um den Beitrag einer NPM1-Mutation zur Proliferation der Zellen abzuschätzen, wäre ein direkter Vergleich mit NPM1-WT nötig, der mit dem vorliegenden Zellmodell nicht durchgeführt werden kann.

Neben den OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien zeigten auch die OCI-AML3, die den FLT3-WT-Rezeptor überexprimieren, einen Proliferationsvorteil gegenüber nativen OCI-AML3 in Kokultur. Dieser fiel jedoch weitaus schwächer aus und manifestierte sich erst nach sechs Wochen. Im Vergleich dazu war der Proliferationsvorteil der OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien schon nach zwei Wochen messbar. Eine Überexpression des wildtypischen FLT3-Rezeptors ist sehr häufig bei AML-Patienten zu beobachten [58, 62]. Spiekermann *et al.* haben gezeigt, dass eine hohe FLT3-Expression mit einer STAT5-Aktivierung in primären AML-Blasten assoziiert ist [87]. Eine STAT5-Aktivierung in den FLT3-WT-überexprimierenden OCI-AML3 Zellen konnte nicht festgestellt werden. Dennoch ist es möglich, dass die FLT3-Überexpression eine Rolle bei der Proliferation dieser Zellen spielt [62].

Die Evaluierung der Interaktion beider Mutationen bei der Pathogenese der AML anhand ihres proliferativen Phänotyps deutet auf eine Interaktion der beiden Mutationen bei der Entstehung der Leukämie hin. Die FLT3-ITD, die die Prognose NPM1-mutierter Patienten negativ beeinflusst [240], verschaffte den Zellen in Kokultur einen Proliferationsvorteil. Dies kann durchaus als Korrelat zu den klinischen Beobachtungen gelten.

5.1.2.2 Proliferationsvorteil FLT3-ITD-exprimierender OCI-AML3 *in vivo*

Quentmeier *et al.* haben ein gutes Anwachsen von OCI-AML3 Zellen bei subkutaner Applikation von $2-5 \times 10^7$ Zellen in NOD/SCID-Mäusen beschrieben. Nach 25-30 Tagen hatten sich tastbare Tumore gebildet. *Post mortem* Untersuchungen haben eine Infiltration von Knochenmark, Leber, Lunge sowie Muskelgewebe ergeben. In den leukämischen Zellen konnte die für NPM1-Mutationen typische zytoplasmatische NPM1-Expression nachgewiesen werden [253]. Im Gegensatz zu Quentmeier *et al.* wurde in dieser Arbeit mit dem immunkomprimierten Mausstamm NSG gearbeitet. Es wurden mehrere Applikationsrouten getestet (intravenös, intrafemorale, intraperitoneal und subkutan). Die gewünschte Infiltration von OCI-AML3 Zellen im Knochenmark wurde insbesondere

bei intravenöser Gabe der Zellen beobachtet. Da die verwendeten Zellen transgen ein Luciferasegen exprimierten, was eine *in vivo* Bildgebung der Tiere ermöglicht, konnte das Anwachsen der Zellen am lebenden Tier verfolgt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei intravenöser Applikation von mindestens 10^5 OCI-AML3 Zellen ein gutes, reproduzierbares Anwachsen der OCI-AML3 Zellen in NSG-Mäusen gewährleistet werden. Die Latenzzeit verkürzte sich mit zunehmender injizierter Zellzahl. Bei einer Applikation von 10^5 - 10^6 OCI-AML3 Zellen zeigten die Tiere nach vier bis sechs Wochen ausgeprägte Krankheitsanzeichen, die sich äußerlich vor allem durch Lähmungserscheinungen an den Hinterläufen bemerkbar machten. Dies deutet auf eine Infiltration des zentralen Nervensystems (ZNS) mit leukämischen Zellen hin. Nähere Untersuchungen bezüglich einer möglichen Infiltration des ZNS wurden allerdings nicht durchgeführt. Bei zwei untersuchten Mäusen wurde außerdem jeweils ein Tumor mit einem Durchmesser von circa 1,5 cm aus dem Bauchraum isoliert. Die Tumore bestanden zu 99% aus humanen leukämischen Zellen. Hierbei könnte es sich um ein Chlorom gehandelt haben. Chlorome treten mitunter bei akuter Leukämie auf.

Das Anwachsen von OCI-AML3 in NSG-Mäusen ermöglichte die Untersuchung des kompetitiven Wachstumsvorteils der *NPM1*-mutierten, *FLT3*-ITD-positiven OCI-AML3 im Vergleich zu nativen, nur *NPM1*-mutierten OCI-AML3 *in vivo*. Dazu wurden den Mäusen analog zur kompetitiven *in vitro* Proliferation, Mischungen aus diesen beiden Zelllinien i.v. in die Schwanzvene appliziert. Eine Mischung bestand entweder aus gleichen Mengen beider Zelllinien oder aus zehnmal mehr nativen OCI-AML3 als *FLT3*-ITD-positiven OCI-AML3 Zellen. Die Zellen waren in allen untersuchten Mäusen angewachsen. Beim Auftreten erster Lähmungserscheinungen wurden die Tiere getötet, die Zellen aus Knochenmark, Leber, Milz und ggf. Tumorgewebe isoliert und im FACS analysiert. Analog zum Ergebnis der kompetitiven Proliferation *in vitro* haben sich die Zellen auch bei der kompetitiven Proliferation in der Maus verhalten. Mit Ausnahme von einer Maus, konnte bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der kompetitive Wachstumsvorteil der OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zellen gegenüber nativen OCI-AML3 in allen drei untersuchten Geweben (Knochenmark, Leber und Milz) bestätigt werden. Dies untermauert das Ergebnis der *in vitro* Versuche. Das aggressivere Wachstumsverhalten der *NPM1*- und *FLT3*-ITD-mutierten OCI-AML3 aus dieser Arbeit ist mit Ergebnissen anderer Mausmodelle vergleichbar, die unter 5.1.5 beschrieben werden. Diese Modelle zeigten, dass Mäuse nur bei gleichzeitigem Auftreten beider Mutationen mit 100% Penetranz und signifikant kürzerer Latenzzeit eine Leukämie entwickelten [294]. Somit liefern insbesondere die Ergebnisse des *in vivo* durchgeführten kompetitiven Wachstumsversuchs einen wertvollen Hinweis auf die Kooperation der beiden Mutationen bei der Entstehung der Leukämie.

5.1.3 Apoptoseverhalten bei Therapie

AML-Patienten mit *NPM1*-Mutation sprechen gut auf die Induktionstherapie an [221]. Eine Studie von Schneider *et al.* zeigte, dass der prozentuale Anteil an Patienten mit adäquater Blastenreduktion eine Woche nach dem ersten Zyklus der Induktionstherapie und der Anteil an Patienten mit kompletter Remission in der Gruppe mit *NPM1*-Mutation signifikant höher war als in der Wildtyp-Gruppe [238]. Im Gegensatz zu Patienten mit *NPM1*-Mutation, sprechen Patienten mit einer *FLT3*-ITD schlecht auf die Standard-Chemotherapie an [264] und weisen eine hohe Rezidivrate auf [101]. Deshalb haben wir unser Zellmodell genutzt, um die apoptotische Wirkung verschiedener Zytostatika (Cytarabin, Daunorubicin) und Inhibitoren (Multikinase-Inhibitor Sorafenib und *FLT3*-Inhibitor AC220) auf OCI-AML3 mit *FLT3*-WT-Rezeptor im Vergleich zu OCI-AML3 mit *FLT3*-ITD-Rezeptor zu testen. Die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen orientierten sich an Plasmakonzentrationen, die im

Rahmen klinischer Studien gemessen wurden oder an publizierten *in vitro* Daten. Während keine Zellen auf AC220 und Sorafenib ansprachen, konnten mit den in der Induktionstherapie verwendeten Zytostatika Cytarabin und Daunorubicin hohe Apoptoseraten für alle Zelllinien erreicht werden. Diese Daten stimmen mit den Daten aus einer Studie von Schneider *et al.* überein, die zeigt, dass Blasten mit *NPM1*-Mutation unabhängig vom *FLT3*-ITD-Status *in vivo* eine hohe Sensitivität gegenüber der Induktionschemotherapie aufweisen [238]. Im kompetitiven Wachstumsversuch von nativen OCI-AML3 und OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien hatte AC220 die Proliferation von OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien über mehrere Wochen erfolgreich gehemmt.

Der Mechanismus, der hinter dem guten Ansprechen von *NPM1c+* Patienten auf die Induktionstherapie ist bisher nicht eindeutig geklärt. *NPM1*-WT schützt hämatopoetische Zellen vor p53-vermittelter Apoptose unter zellulärem Stress [295]. Es wird spekuliert, dass mutiertes *NPM1* die Zellen davor nicht mehr schützen kann und dies sie dadurch empfindlich macht gegenüber genotoxischem Stress, der von der Chemotherapie ausgeht [187]. Neue Therapieansätze sind insbesondere für *FLT3*-ITD-positive Patienten in der AML dringend erforderlich. Prognostisch besonders ungünstig sind bei diesen Patienten hohe ITD/WT-Verhältnisse. Eine wichtige Ergänzung an dieser Stelle wäre deshalb die Erweiterung des Apoptoseversuchs mit den monoklonalen OCI-AML3 *FLT3*-ITD-low und -high Zelllinien, weiteren therapeutischen Substanzen und die Kombination von Substanzen wie zum Beispiel die Kombination eines *FLT3*-Inhibitors mit einem Zytostatikum.

5.1.4 Genexpressionsanalyse in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses

Um das Zusammenspiel der *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen bei der Leukämogenese auf molekularer Ebene näher zu betrachten, wurde ein Genexpressionsprofil (GEP) *NPM1*-mutierter AML-Patienten mit normalem Karyotyp in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses mittels Genexpressionsanalyse erstellt. In Bezug auf Patienten mit *FLT3*-WT war bei Patienten mit hohem ITD/WT-Verhältnis die Expression von mehr Genen signifikant dereguliert als bei Patienten mit niedrigem ITD/WT-Verhältnis, aber der direkte Vergleich von Patienten mit hohem und niedrigem ITD/WT-Verhältnis erbrachte keine signifikant differentiell exprimierten Gene. Es waren mehr als 90% der bei Patienten mit niedrigem ITD/WT-Verhältnis signifikant deregulierten Gene auch bei Patienten mit hohem ITD/WT-Verhältnis signifikant dereguliert. Dies zeigte, dass das Vorhandensein einer *FLT3*-ITD einen stärkeren Einfluss auf das GEP nimmt als die absolute Höhe des ITD/WT-Verhältnisses. Gene, die ausschließlich bei Patienten mit hohem ITD/WT-Verhältnis signifikant dereguliert waren, könnten mit der schlechteren Prognose dieser Patienten assoziiert sein. Ein solches Gen könnte *MIR155 host gene (MIR155HG)* sein. *MIR155HG* codiert für die microRNA *miR-155* [296], die bei zahlreichen biologischen Prozessen, unter anderem der Hämatopoese, eine bedeutende Rolle spielt [297]. *miR-155* hat ein charakteristisches Expressionsmuster während verschiedener Phasen der hämatopoetischen Stammzellreifung [297] und blockiert die erythroide sowie myeloische Zelldifferenzierung [298, 299]. Eine *miR-155*-Expression in hämatopoetischen Stammzellen ruft *in vivo* eine myeloproliferative Erkrankung hervor [300]. Bei Lymphomen [301-304], CLL [305, 306] und AML wurden häufig hohe *miR-155*-Expressionslevel beobachtet. Bei AML-Patienten ist die Überexpression von *MIR155HG* oder *miR-155* insbesondere mit einer *FLT3*-ITD assoziiert [307-311]. Darüber hinaus zeigten sowohl diese Arbeit als auch eine Studie von Garzon *et al.*, dass *MIR155HG* bzw. *miR-155* ebenfalls in AML-Patienten überexprimiert war, die neben einer *FLT3*-ITD- auch eine *NPM1*-Mutation besitzen [307]. Marcucci *et al.* untersuchten in

Patienten mit *de novo* NK-AML die Expression von *miR-155* im Zusammenhang mit klinischen Parametern und assoziierten Patienten mit hoher *miR-155*-Expression mit einer schlechteren Prognose [296]. Die vorliegende Arbeit ist die erste Arbeit, die nach Höhe des ITD/WT-Verhältnisses unterschied und eine Assoziation hoher *miR-155*-Expression ausschließlich mit hohem ITD/WT-Verhältnis in *NPM1*-mutiertem Hintergrund fand.

Bei der Betrachtung der Heatmap signifikant deregulierter Gene in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses war aufgefallen, dass es innerhalb der Patientengruppe mit hohem ITD/WT-Verhältnis eine Untergruppe (21,7%) mit abweichendem GEP gab. Als Ursache konnte ausgeschlossen werden, dass in Patienten dieser Untergruppe mehr als eine *FLT3*-ITD-Mutation vorliegt. Es wäre denkbar, dass die Länge oder die Insertionsstelle der ITD in diesem Zusammenhang relevant ist. Beides ist in der Literatur beschrieben, dass es die Prognose beeinflussen kann [312, 313]. Etwa 30% der *FLT3*-ITDs inserieren außerhalb der JM-Domäne in der ersten TKD-Domäne [313, 314]. Mittels Sequenzierung von *FLT3* könnte die Länge und Insertionsstelle der ITD überprüft werden, insofern Patienten-DNA zum Diagnosezeitpunkt asserviert wurde.

Insgesamt stimmen die Genexpressionsdaten der vorliegenden Arbeit gut mit den Daten einer Studie von Huang *et al.* überein. Huang *et al.* haben in zwei unabhängigen Kohorten das GEP von NK-AML-Patienten mit *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutation analysiert und identifizierten 34 übereinstimmende differentiell exprimierte Gene im Vergleich zu *NPM1*-mutierten Patienten ohne *FLT3*-ITD. Auffällig war jedoch, dass alle differentiell exprimierten Gene überexprimiert waren. Unter Berücksichtigung derselben Signifikanzkriterien wie Huang *et al.* ($p < 0,001$; FC nicht eingegrenzt) stimmten 52,9% bzw. 11,8% der in dieser Arbeit signifikant deregulierten Gene bei Vergleich mit der Patientengruppe mit hohem bzw. niedrigem ITD/WT-Verhältnis überein. Manche dieser Gene, zum Beispiel *SOCS2* [315], *MMP2* [316] oder *ENPP2* [317], sind in der Literatur bereits im Zusammenhang mit *FLT3*, *NPM1* oder AML beschrieben.

Die von Patientenproben generierten Daten wurden mit dem GEP der in dieser Arbeit etablierten monoklonalen OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien verglichen. Beim Vergleich von OCI-AML3 *FLT3*-ITD-high mit OCI-AML3 *FLT3*-ITD-low Zelllinien waren neben *FLT3* drei Gene signifikant überexprimiert: *EGR1*, *IL-8* und *BCYRN1*. Folglich stimmten die aus Patienten und Zelllinien gewonnenen Daten nicht überein. Dies könnte zum einen daran liegen, dass für die Datenerhebung von Patienten (Microarray) und Zelllinien (RNA-Seq) unterschiedlich sensitive Verfahren angewandt wurden und zum anderen, dass die Komplexität der miteinander verglichenen biologischen Systeme divergiert.

5.1.5 Alternative Modelle

Der schwach ausgeprägte phänotypische Unterschied zwischen den untersuchten Zellen unseres Modellsystems erfordert ein alternatives Modell, um die Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen bei der Entstehung der AML eindeutig zu belegen. Das vorliegende Modell ist für weitere funktionelle Analysen nicht geeignet. Als generelle Möglichkeiten bieten sich andere zellbasierte Modelle, AML-Blasten oder ein transgenes Mausmodell an. Da bis zu 35% aller AML-Patienten eine *NPM1*-Mutation besitzen [223-225], ist es überraschend, dass humane myeloische Zelllinien mit einer endogenen *NPM1*-Mutation extrem selten sind. Gleiches gilt auch für *FLT3*-ITD-Mutationen. Diese sind ebenfalls häufig in AML-Patienten, aber nur selten in aus Patienten generierten Zelllinien zu finden [88]. Bisher sind nur zwei Zelllinien mit einer *NPM1*-Mutation beschrieben [253, 318]. Dies deutet darauf hin, dass diese nur schwer als Zellkultur wachsen [253]. Unter den 79 myeloischen Zelllinien, die Quentmeier *et al.* auf eine Exon 12-Mutation im *NPM1*-Gen hin untersuchten, trägt nur

die OCI-AML3 Zelllinie eine solche Mutation. Zahlreiche Versuche eine solche Zelllinie ausgehend von AML-Patienten mit *NPM1*-Mutation zu etablieren, blieben ohne Erfolg [253]. Die zweite *NPM1*-mutierte Zelllinie, IMS-M2, identifizierten Chi *et al.* [318]. Die beiden beschriebenen Zelllinien, OCI-AML3 und IMS-M2 tragen jeweils in Exon 12 des *NPM1*-Gens heterozygot eine TCTG-Duplikation, was der häufigsten *NPM1*-Mutation A entspricht [253, 318]. OCI-AML3 wurden 1987 aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen Patienten mit AML FAB M4 etabliert [319], IMS-M2 aus Knochenmarkzellen einer 59-jährigen Patientin mit AML FAB M2 [318]. Der große Vorteil dieser beiden Zelllinien ist die endogene Expression der *NPM1*-Mutation. Da die IMS-M2 Zelllinie nicht verfügbar ist, wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit der OCI-AML3 Zelllinie gearbeitet. Für die OCI-AML3 Zelllinie wurde nicht nur die Mutation, sondern auch das charakteristische phänotypische Merkmal einer *NPM1c+* AML bestätigt, die aberrante zytoplasmatische Expression des mutierten *NPM1*-Proteins. Dies macht sie zum geeigneten Modellsystem für die Untersuchung dieser Mutation. Nachteilig zu bewerten ist ihr Karyotyp. Wie IMS-M2, haben auch OCI-AML3 einen aberranten Karyotyp [253, 318]. Der Karyotyp der OCI-AML3 weist folgenden Veränderungen auf: 48(45-50)<2n>X/XY, +1, +5, +8, der(1)t(1;18)(p11;q11), i(5p), del(13)(q13q21), dup(17)(q21q25) – Seitenlinie mit r(Y)x1-2 – hemizygot für *RB1* [253]. Der Karyotyp zum Diagnosezeitpunkt des AML-Patienten, von dem ausgehend die OCI-AML3 Zelllinie etabliert wurde, ist nicht bekannt. Da *NPM1*-Mutationen insbesondere mit einem normalen Karyotyp assoziiert sind [220-222], wäre es naheliegend, diese Mutation in Zellen mit normalem Karyotyp zu untersuchen. Jedoch zeigen Zelllinien, die sich von Patienten mit akuten Leukämien ableiten, grundsätzlich vielfache zytogenetische Aberrationen [320, 321]. In seltenen Fällen wird von leukämischen Zellen mit normalem Karyotyp berichtet [320-322]. Zum Beispiel beschreiben Munker *et al.* eine myeloischen Leukämiezelllinie mit normalem Karyotyp ohne *NPM1*- und ohne *FLT3*-ITD-Mutation [323]. Für die Modellierung der für diese Arbeit relevanten Genotypen stellen Zelllinien ohne endogene *NPM1*-Mutation jedoch eine Schwierigkeit dar. Der Phänotyp einer *FLT3*-ITD-Mutation kann durch einfache Überexpression modelliert werden. Bei einer *NPM1*-Mutation handelt es sich allerdings um eine heterozygote Mutation, deren Phänotyp durch den Funktionsverlust eines Allels hervorgerufen wird. Durch einen aufwändigen Knock-down von wildtypischem *NPM1* und gleichzeitigem Knock-in von mutiertem *NPM1* müsste eine exakt gleichstarke Expression von *NPM1*-WT und mutiertem *NPM1* erzeugt werden, um die Situation von *NPM1c+* AML-Blasten zu erzielen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung primärer AML-Blasten von Patienten mit normalem Karyotyp, *NPM1*-Mutation und *FLT3*-WT oder *FLT3*-ITD. So wäre im Vergleich zu Zelllinien ein normaler Karyotyp gewährleistet und die *NPM1*- bzw. *FLT3*-Mutation bereits in den Zellen vorhanden. Mittels Fragmentlängenanalyse wäre auch die Ermittlung des ITD/WT-Verhältnis einer jeden *FLT3*-ITD-positiven Probe möglich. Es wird jedoch regelmäßig bei Patienten beobachtet, dass sich das ITD/WT-Verhältnis im Krankheitsverlauf ändert [100]. Es wäre also nicht garantiert, dass das ITD/WT-Verhältnis während der Kultivierung der Patientenzellen konstant bleibt. Ein Modell mit primären AML-Blasten käme dem Patienten zwar am nächsten, weist jedoch einige Limitationen auf. Eine Limitation für die Arbeit mit primären Proben stellt die Materialverfügbarkeit der Proben dar. Außerdem enthält jede Patientenprobe unterschiedliche zusätzliche Mutationen, deren Einfluss nur schwer abzuschätzen ist. Folglich ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse enorm erschwert. Die größte Hürde ist jedoch die *ex vivo* Kultivierung von AML-Blasten. Nur unter ganz speziellen optimierten Kulturbedingungen, bei Verwendung eines murinen Stromazell-Feederlayers und unter Zugabe eines Zytokincocktails, ist es überhaupt möglich, die Blasten *ex vivo* in Kultur zu halten. Die Teilungsrate ist

mit maximal vier Teilungen in 28 Tagen dennoch extrem gering [324]. Folglich wäre nur eine limitierte Auswahl an Versuchen und Methoden mit primären AML-Blasten möglich.

Schließlich käme als alternatives Modell ein Mausmodell in Betracht. Es sind mehrere Modelle bekannt, die das leukämogene Potential einer *NPM1*- oder *FLT3*-ITD-Mutation in Mäusen untersuchten. Übereinstimmend berichten Kelly *et al.* und Lee *et al.*, dass eine *FLT3*-ITD trotz ihres transformierenden Potentials in Zelllinien [82, 84, 85, 87], in Mäusen nur ein myeloproliferatives Syndrom hervorruft [37, 325], das sich durch eine kurze Latenzzeit (40-60 Tage) sowie Splenomegalie, Leukozytose und extramedulläre Hämatopoese in der Milz und Leber auszeichnet [37]. Dies deutet darauf hin, dass eine *FLT3*-ITD als alleinige Mutation keine Leukämie hervorruft. Lee *et al.* haben zudem Mäuse mit heterozygoter und homozygoter ITD miteinander verglichen und eine dosisabhängige Entwicklung einer progressiven Splenomegalie festgestellt. Zudem zeigten *Flt3*-mutierte Tiere verminderte Hämoglobinwerte und Blutplättchenzahlen. Homozygote Tiere wiesen außerdem eine Leukozytose und Monozytose auf [325]. Diese Beobachtung ist in Einklang mit einer schlechter werdenden Prognose bei zunehmender *FLT3*-ITD-Last wie sie von Schneider *et al.* und Schnittger *et al.* bei AML-Patienten gezeigt wurde [240, 284].

Mitunter abhängig von den experimentellen Gegebenheiten entwickeln transgene Mäuse mit einer *NPM1*-Mutation myeloproliferative Erkrankungen, lymphatische hämatologische Tumore, myeloische Neoplasien und myeloische Leukämien (AML) [291, 294, 326, 327]. Obwohl eine *NPM1*-Mutation in einigen Tieren eine Leukämie hervorrufen kann, so deutet die lange Latenzzeit und niedrige Penetranz mit der die Leukämie auftritt darauf hin, dass kooperierende Mutationen zur Entstehung der Leukämie notwendig sind und dass nicht alle Tiere solche Mutationen erwerben [294, 327]. In den Studien von Mallardo *et al.*, Sportoletti *et al.* und Vassiliou *et al.* traten Latenzzeiten von einem bis zwei Jahren auf und jeweils circa 30% der Mäuse mit *NPM1*-Mutation erkrankten [294, 326, 327]. Es wäre aufschlussreich, *NPM1c+* Mäuse, die an einer Leukämie erkranken, auf den Erwerb unterstützender Mutationen wie eine *Flt3*-ITD zu untersuchen. Die erkrankten Mäuse aus der Studie von Mallardo *et al.* wiesen entweder eine AML mit Ausreifung oder eine biphenotypische Leukämie auf. Zudem litten die Tiere an Splenomegalie, Leukozytose, Anämie und Thrombozytopenie [294]. Um die Frage zu klären, ob *NPM1*- und *FLT3*-Mutationen bei der Entstehung der Leukämie maßgeblich zusammenwirken, haben Mallardo *et al.* ihr transgenes *NPM1c+* Mausmodell mit einem Knock-in *FLT3*-ITD-Mausmodell [325] gekreuzt. Alle Mäuse mit beiden Mutationen entwickelten eine Leukämie und starben nach 35-161 Tagen (Median: 72 Tage) infolge der Erkrankung. Die Mäuse litten an Splenomegalie, Leukozytose, Anämie und Thrombozytopenie [294]. Die schnellere Kinetik und größere Häufigkeit, mit der *NPM1*- und *FLT3*-ITD mutierte Tiere im Vergleich zu Mäusen, die nur eine *NPM1*-Mutationen tragen, an einer Leukämie erkranken, beweist, dass beide Mutationen effizient bei der Entstehung einer Leukämie zusammenspielen.

Dazu korrelieren die Ergebnisse aus den in dieser Arbeit durchgeführten kompetitiven Wachstumsversuchen von nativen OCI-AML3 und OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien (*in vitro* und *in vivo*), in denen die Zellen mit zusätzlicher *FLT3*-ITD einen eindeutigen Proliferationsvorteil gegenüber den nur *NPM1*-mutierten Zellen zeigten. An dieser Stelle wäre eine sinnvolle Ergänzung, den NSG-Mäusen keine Kokultur, sondern entweder native OCI-AML3 oder OCI-AML3 *FLT3*-ITD Zelllinien zu injizieren und Latenzzeiten beider Gruppen miteinander zu vergleichen. Zu erwarten wäre eine kürzere Latenzzeit für die Mäuse, denen die *FLT3*-ITD-positiven Zellen injiziert wurden.

Aus heutiger Sicht stellt ein Mausmodell die beste Alternative zu unserem zellbasierten Modell dar. Das Mausmodell von Mallardo *et al.* wurde erst im Laufe dieser Arbeit (im Jahr 2013) publiziert und stand mir somit nicht zur Verfügung. Es ist ein gutes Modell humaner akuter Leukämien und liefert

einen eindeutigen Hinweis, dass *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen gemeinsam zur Entstehung einer AML beitragen. Diese Mäuse ermöglichen außerdem nicht nur die Untersuchung der Mechanismen der Leukämongese, sondern auch die Erprobung neuer Therapieansätze [294].

5.1.6 Interaktionen von Mutationen bei der Pathogenese der AML

„The Cancer Genome Atlas Research Network“ veröffentlichte 2013 die Daten von 150 Exom- und 50 Genom-Sequenzierungen von insgesamt 200 erwachsenen Patienten mit *de novo* AML und zeigte, dass einige für die AML typische Mutationen (z.B. in *DNMT3A*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*) nicht gleichzeitig mit Transkriptionsfaktor-Fusionen auftreten [29]. Da Mausmodelle gezeigt haben, dass Transkriptionsfaktor-Fusionen an der Initiation von AML beteiligt sind [328, 329], deutet es darauf hin, dass diese gängigen Mutationen eine ähnliche Funktion besitzen. Des Weiteren schließen sich Mutationen im *FLT3*-Rezeptor, anderen RTKs, Serin-Threonin-Kinasen, Protein-Tyrosin-Phosphatasen und Proteinen der RAS-Familie gegenseitig aus. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass eine Mutation im Kinasesignalweg ausreichend ist im Geflecht der Entstehung von AML [29]. Das „2-Hit“ Modell sollte also um die neu gewonnenen Erkenntnisse erweitert werden.

Diese Studie hat außerdem gezeigt, dass unter paarweise auftretenden Mutationen in der AML, am bedeutendsten das signifikant gemeinsame Vorkommen zwischen Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase *FLT3*, im nukleolären Phosphoprotein *NPM1* und in der Methyltransferase *DNMT3A* ist. Im Einzelnen hatten viele Patienten entweder Mutationen in *NPM1* und *DNMT3A* oder in *NPM1* und *FLT3*. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Mutationen zufällig zusammen auftreten ist extrem klein ($p < 6,3 \times 10^{-7}$ für *NPM1/DNMT3A* und $p < 1,9 \times 10^{-6}$ für *NPM1/FLT3*). Zudem stand ein Auftreten von Mutationen in allen drei Genen gleichzeitig im engen Zusammenhang mit spezifischen Expressionssignaturen von mRNA und miRNA sowie einem erheblichen Verlust an DNA-Methylierung. Das deutet darauf hin, dass Patienten mit Mutationen in allen drei Genen (*FLT3*, *NPM1* und *DNMT3A*) vermutlich eine neue AML-Subgruppe mit besonderen epigenetischen Eigenschaften darstellen [29].

Da OCI-AML3 in der Methyltransferase-Domäne von *DNMT3A* eine heterozygote Mutation besitzt [330], sollte dieser Zusammenhang insbesondere bei der Auswertung der RNA-Seq Daten berücksichtigt werden. Die Mutation betrifft das am häufigsten mutierte Codon von *DNMT3A* in der AML [331, 332] und führt zu einem Aminosäureaustausch (R882C) [330]. Das Vorliegen einer *DNMT3A*-Mutation in OCI-AML3 macht ein alternatives Modell notwendig, um eine Konzentrierung auf *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen zu gewährleisten.

5.2 Transkriptionelle Regulation der *FLT3*-Expression

Neben aktivierenden *FLT3*-Mutationen führen in der AML auch sehr hohe *FLT3*-WT-Expressionslevel zur Autophosphorylierung der *FLT3*-Kinase. Patienten mit *FLT3*-WT-Überexpression (>200.000 Kopien/μg RNA) sind mit einer niedrigeren kompletten Remissionsrate und einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert [265]. Aus diesem Grund wurde in diesem Teilprojekt mit der Untersuchung der transkriptionellen Regulierung von *FLT3* als mögliche Ursache begonnen. Hierzu wurde zunächst *in silico* nach Transkriptionsfaktorbindestellen gescreent, die sich im proximalen Promotor von *FLT3* befinden und dem hämatopoetischen System zugeordnet werden. Der proximale *Flt3*-Promotor wurde definiert als die -901 Basen *upstream* der *Flt3*-Transkriptionsstartstelle in Exon 1 [242]. Beim Vergleich der Ergebnisse aus zwei Analysen wurden zwei übereinstimmende, hämatopoetische Transkriptionsfaktoren identifiziert (PAX5, MYB), die in der proximalen Promotorregion von *FLT3* potentiell binden. Zu diesem Zeitpunkt war Pax5 bereits als Repressor der *Flt3*-Transkription in Vorläuferzellen von B-Zellen bekannt. Die Repression von *Flt3* durch Pax5 ist für die normale B-Lymphopoese von entscheidender Bedeutung [333]. Dass Pax5 an den *Flt3*-Promotor bindet wurde durch Holmes *et al.* mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay zum ersten Mal gezeigt [333]. In dieser Arbeit wurde mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay in HEK-293T Zellen bestätigt, dass PAX5 eine repressorische Aktivität auf *Flt3* ausübt. Dass die repressorische Aktivität von PAX5 auf *Flt3* in dieser Arbeit nur schwach ausfällt, könnte mit dem murinen Ursprung des *Flt3*-Promotors und dem humanen Ursprung des Transkriptionsfaktors PAX5 zusammenhängen. Im Laufe dieser Arbeit haben Volpe *et al.* 2013 mittels X-ChIP gezeigt, dass MYB direkt an den murinen und humanen *FLT3*-Promotor bindet. Bei Volpe *et al.* umspannt die definierte *FLT3*-Promotorregion mehrere Kilobasen *upstream* des Startcodons sowie das erste Intron. Sie haben außerdem gezeigt, dass sowohl die murine als auch die humane *FLT3*-Expression mit der Expression von *MYB* korreliert [268]. Wir haben die Wirkung der Transkriptionsvariante (TV) 1 und 2 des Transkriptionsfaktors MYB auf die *Flt3*-Promotoraktivität mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay in HEK-293T Zellen untersucht und konnten MYB als starken Aktivator der *Flt3*-Promotoraktivität bestätigen. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen den beiden TV.

Die Proteinexpressionslevel der für den Dual-Luciferase® Reporter Assay in HEK-293T Zellen transient exprimierten Transkriptionsfaktoren PAX5 und MYB (TV1, TV2) wurden mittels Western Blot kontrolliert und entsprachen den definierten Mengen.

Ein weiterführender Schritt wäre nun zum Beispiel, Patienten mit sehr hohem *FLT3*-Expressionslevel auf Mutationen in *PAX5* oder *MYB* hin zu untersuchen. Ebenso wäre eine deregulierte Expression von *PAX5* oder *MYB* als Ursache für eine *FLT3*-WT-Überexpression bei AML-Patienten denkbar. So könnte eine verminderte Expression von *PAX5*, ebenso wie Mutationen im *PAX5*-Gen, die eine Bindung an den *FLT3*-Promotor verhindern, dazu führen, dass *FLT3* im Verlauf der B-Zell-Entwicklung nicht herunterreguliert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass es in Pax5-defizienten pro-B-Zellen zur überschüssigen Expression von *Flt3* kommt, dass die anhaltende Expression von *Flt3* in Vorläuferzellen die B-Zell-Entwicklung signifikant beeinträchtigt [333] und Pax5-defiziente pro-B-Zellen unbegrenztes Selbsterneuerungspotential behalten [334]. Auch eine Überexpression von *MYB* oder mutiertes *MYB* mit einer höheren Bindungsaffinität an den *FLT3*-Promotor könnte zur Überexpression von wildtypischem *FLT3* bei AML-Patienten beitragen.

Neben Bindestellen für PAX5 und MYB enthält der proximale *Flt3*-Promotor auch eine potentielle CEBPA-Bindestelle. Der Transkriptionsfaktor CEBPA, der zur Familie der CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine gehört, spielt eine entscheidende Rolle im Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung myeloischer Zellen [335]. Volpe *et al.* haben gezeigt, dass CEBPA im ersten Intron von

murinem und humanem *FLT3* an cis-regulatorische Elemente bindet und dass das CEBPA-Expressionslevel die *Flt3*-Expression beeinflusst [268]. Wir konnten in dieser Arbeit in HEK-293T Zellen mittels Dual-Luciferase® Reporter Assay bestätigen, dass CEBPA als Aktivator der *Flt3*-Promotoraktivität fungiert.

In circa 8-18% der AML-Patienten mit normalem Karyotyp treten *CEBPA*-Mutationen auf [27, 97, 336]. Dies sind neben N-terminalen Frameshift-Mutationen, C-terminale in-frame Mutationen in der *basic Leucin-Zipper-* (bZIP-) Domäne [337]. Im Labor für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München wurden zwei Fälle einer familiären AML mit einem SNP in der bZIP-Domäne von CEBPA diagnostiziert (NM_004364.2:c.932A>C; NM_004364.2:p.(Gln311Pro)). Die bZIP-Domäne setzt sich zusammen aus einer basischen Region und der Leucin-Zipper Region, die die DNA-Bindung bzw. die Homo- und Heterodimerisierung vermittelt [338]. Da der SNP aufgrund seiner Lokalisation möglicherweise zu einer Veränderung der DNA-Bindung führt, haben wir die Auswirkung des SNPs auf die Promotoraktivität von *Flt3* untersucht und mit wildtypischem CEBPA verglichen. Dabei konnten wir eine bis zu 2,4-fach erhöhte *Flt3*-Promotoraktivität im mutiertem gegenüber dem wildtypischen Fall messen. Die Überprüfung der Proteinexpressionlevel mittels Western Blot von transient exprimiertem CEBPA-WT und CEBPA Q311P entsprachen den definierten Mengen und ergaben ein nahezu identisches nukleäres Expressionslevel beider Proteine. Im Gegensatz zu wildtypischem CEBPA zeigte die Punktmutante jedoch auch eine zytoplasmatische Expression, deren Ursache noch ungeklärt ist.

In einem nächsten Schritt wäre die Bestimmung des *FLT3*-Expressionslevels in den beiden Fällen der familiären AML von Interesse. Zur Ermittlung eines möglichen Zusammenhangs zwischen *CEBPA*-Mutationen der bZIP-Domäne und einer erhöhten *FLT3*-Promotoraktivität ist die Untersuchung der *FLT3*-Promotoraktivität in Abhängigkeit verschiedener *CEBPA*-Mutationen der bZIP-Domäne nötig.

5.3 Funktionelle Charakterisierung von *DDR*-Mutationen in der AML

5.3.1 *DDR*-Expression und *DDR*-Mutationen in der AML

Wie viele andere RTKs [45] spielen auch *DDRs* eine Rolle bei der Entstehung von Krebs und sind bisher vor allem im Zusammenhang mit soliden Tumoren beschrieben [121]. Bei einer ganzen Reihe von soliden Tumoren ist eine veränderte *DDR*-Expression auf mRNA- und Proteinebene bekannt [121]. In den meisten Fällen ist *DDR1* bzw. *DDR2* überexprimiert [121]. Die deregulierte Expression korreliert bei vielen Studien mit einer schlechten Prognose [339-343].

In dieser Arbeit wurde die *DDR1*- und *DDR2*-Expression in diversen AML-Patientengruppen untersucht. Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei soliden Tumoren lag bei allen untersuchten AML-Patientengruppen sowohl die mediane *DDR1*- als auch die mediane *DDR2*-Expression unterhalb des Medians der jeweiligen *DDR*-Expression von Knochenmark gesunder Kontrollproben. Die einzige Ausnahme stellte die *DDR1*-Expression bei der AML mit isolierter Trisomie 13 dar. Eine Erklärung für das höhere Expressionsniveau bei Patienten mit isolierter Trisomie 13 wurde noch nicht gefunden. Ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Expression besteht nicht, da *DDR1* nicht auf Chromosom 13, sondern auf Chromosom 6 (6p21.3) liegt. Ob bei Patienten mit Trisomie 13 eine Amplifikation des *DDR1*-Genlokus, wie bei einem in der Literatur beschriebenen AML-Patienten [276] vorliegt, wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht.

Studien zur *DDR*-Expression in anderen hämatopoetischen Erkrankungen zeigten eine erhöhte *DDR2*-Expression im Hodgkin-Lymphom [145, 146] und Chiaretti *et al.*, die die Genexpressionssignaturen von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) untersuchten, fanden *DDR1* unter den hochexprimierten Kinasen bei ALL-Patienten ohne molekulare Rearrangements und bei ALL-Patienten mit BCR/ABL-Rearrangement [144]. Ungeklärt bleibt, ob die deregulierte *DDR1*-Aktivierung an der Transformation bei diesen Patientengruppen beteiligt ist. Chiaretti *et al.* verwendeten bei der Untersuchung der Genexpressions-Signaturen der ALL ähnliche GeneChip Arrays, schlossen jedoch nur Patienten mit einem Blastenanteil von über 90% in die Untersuchung mit ein. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Chiaretti *et al.* das Expressionslevel nicht mit gesunden Kontrollproben verglichen haben, sondern innerhalb unterschiedlicher ALL-Subgruppen [144]. Beim Vergleich der *DDR*-Expressionsniveaus unterschiedlicher AML-Risikogruppen miteinander wurden in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die ALL und AML zeigen hinsichtlich der *DDR1*-Expressionslevel konträre Ergebnisse. Es handelt sich jedoch auch um zwei verschiedene hämatologische Erkrankungen.

Übereinstimmend zu unserer Beobachtung wiesen verschiedene AML-Zelllinien (EOL-1, HL-60, K-562, KASUMI-1, KG-1, MOLM-13, MV4-11, NB-4, OCI-AML3 und THP-1), die wir auf ihre *DDR1*-Proteinexpression hin untersucht haben, keine detektierbare *DDR1*-Proteinexpression auf. Nur die als Positivkontrolle verwendete CML (chronische myeloische Leukämie) Zelllinie K-562 zeigte sowohl im Western Blot als auch bei der CD167a-Oberflächenfärbung ein eindeutiges Signal. K-562 wurde von L'Hôte *et al.* als *DDR1*-exprimierende Zelllinie beschrieben [344]. Die Untersuchung von ALL-Zelllinien wäre an dieser Stelle ein sinnvoller Vergleich.

Neben einer häufig veränderten *DDR*-Expression in soliden Tumoren, findet sich beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) [345] und beim Gallengangskarzinom [346] außerdem eine deregulierte Phosphorylierung von *DDR1* und *DDR2*. Phosphoproteomic-Screens zeigten, dass sich die *DDRs* unter den am stärksten phosphorylierten RTKs befinden. *DDR1* war im NSCLC und im Gallengangskarzinom jeweils unter den drei am stärksten phosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen

[345, 346]. Für hämatologische Neoplasien wurde eine veränderte DDR-Phosphorylierung noch nicht beschrieben.

Mutationen in *DDR1* und *DDR2* hingegen wurden sowohl in soliden Tumoren [347, 348] als auch in der AML gefunden. Aus der Literatur sind bisher neun AML-Patienten mit einer *DDR1*- oder *DDR2*-Mutation bekannt [106, 273, 275, 276]. Diese Fälle sind in Tabelle 27 aufgeführt. Die *DDR1* A766V Mutation wurde von Tomasson *et al.* bei einer *high-throughput* Sequenzierung von Genen, die für Tyrosinkinasen kodieren, bei einem Patienten mit *de novo* AML gefunden [276]. Ebenfalls durch *high-throughput* Sequenzanalyse identifizierten Loriaux *et al.* die *DDR1*-Mutationen T460M, N502S und A533S in AML-Patienten ohne *FLT3*- oder *c-KIT*-Mutationen [275]. Welch *et al.* untersuchten Gene von Tyrosinkinasen in Genomen mit fehlender *FLT3*-Mutation und fanden unter anderem die beiden Mutationen *DDR2* G222R und *DDR2* M291I [106]. Aus unserer klinischen Kooperationsgruppe entdeckten Greif *et al.* mittels *Whole Exome Sequencing* die *DDR2* D854N Mutation in einem Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie [273]. Insgesamt sind sieben nicht-synonyme Mutationen in den Genen, die für die Rezeptortyrosinkinasen *DDR1* und *DDR2* kodieren, beschrieben. Eine dieser Mutationen (*DDR1* N502S) wurde bei drei Patienten gefunden, während alle anderen Mutationen jeweils nur einmal auftreten.

Tabelle 27: Bisher bekannte Fälle von AML-Patienten mit einer *DDR1*- oder *DDR2*-Mutation

Patient [Quelle]	FAB/WHO	Gen*	Mutation	Kategorie	Domäne
#1 [275]	nicht anders spezifiziert	<i>DDR1a</i>	T460M	missense	JM
#2 [275]	M1	<i>DDR1a</i>	N502S	missense	
#3 [275]	M4eo	<i>DDR1a</i>	N502S	missense	JM
#4 [275]	M2	<i>DDR1a</i>	N502S	missense	
#5 [275]	nicht klassifizierbar	<i>DDR1b</i>	A533S	missense	JM
#6 [276]	nicht angegeben	<i>DDR1a</i>	A766V (A803V: <i>DDR1b</i>)	missense	TKD
#7 [106]	M1	<i>DDR2</i>	G222R	missense	extrazellulär
#8 [106]	M3	<i>DDR2</i>	M291I	missense	extrazellulär
#9 [273]	M3	<i>DDR2</i>	D854N	missense	C-Terminus

*Im Gegensatz zu *DDR2* gibt es aufgrund von alternativem Spleißen von *DDR1* fünf Isoformen (a, b, c, d und e), die sich in ihrem zytoplasmatischen Teil voneinander unterscheiden. Isoform a und b sind die vorherrschenden Isoformen. Isoform d und e sind trunkierte Proteine mit fehlender oder nicht funktionstüchtiger Kinasedomäne [53]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Isoform a gearbeitet.

Da nur wenige *DDR*-Mutationen bisher funktionell charakterisiert wurden [275], wurden im Rahmen dieser Arbeit alle *DDR2*-Mutationen sowie die Mutation *DDR1* A766V näher untersucht. *DDR1* A766V befindet sich in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinasedomäne [276]. *DDR2* G222R und *DDR2* M291I sind in der Discoidin-ähnlichen Domäne im extrazellulären Bereich lokalisiert und *DDR2* D854N am C-Terminus des Proteins. Die Lokalisation der bisher in der AML gefundenen Mutationen ist in Abbildung 41 grafisch dargestellt.

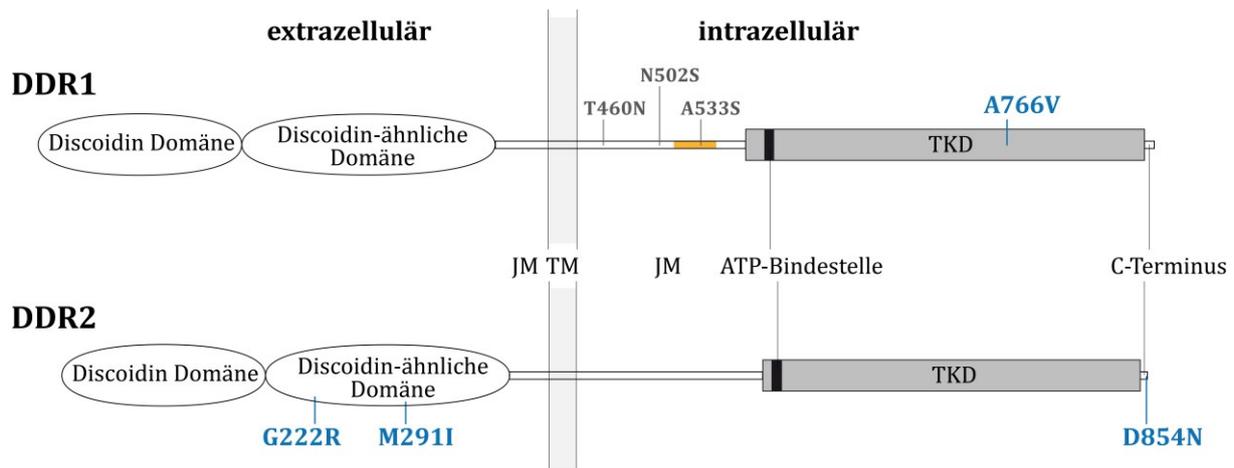


Abbildung 41: Lokalisation der in AML-Patienten gefundenen *DDR1*- und *DDR2*-Mutationen. Schematisch dargestellt sind *DDR1* und *DDR2* mit ihren funktionellen Domänen. *DDR1* stellt zugleich Isoform a und Isoform b dar. Die durch alternatives Spleißen verlängerte juxtamembranöse (JM-) Domäne in Isoform b ist farblich hervorgehoben. Die bisher in AML-Patienten gefundenen Mutationen sind eingezeichnet. In blauer Farbe hervorgehoben sind die in dieser Arbeit charakterisierten *DDR1*- und *DDR2*-Mutationen. ATP: Adenosinriphosphat; TKD: Tyrosinkinasedomäne; TM: transmembranöse Domäne

Bei soliden Tumoren treten *DDR2*-Mutationen beim NSCLC, Endometriumkarzinom, kolorektalen Karzinom, Nierenzellkarzinom und Glioblastom auf [347]. Generell wurden die *DDRs* im NSCLC bislang am besten charakterisiert [121]. *DDR*-Mutationen treten in einer Studie von Hammerman *et al.* beim primären Plattenepithelkarzinom mit einer Häufigkeit von 3,2% auf [347]. Im NSCLC sind bis heute insgesamt vier *DDR1*- und 14 *DDR2*-Mutationen bekannt, die sich wie in der AML über verschiedene Domänen erstrecken [121, 347-349]. Es gibt keine Überlappungen bei den im NSCLC und in der AML gefundenen Mutationen. Da manche der im NSCLC beschriebenen *DDR2*-Mutationen zu einem onkogenen „*gain-of-function*“ Phänotyp führen [347], lässt dies vermuten, dass das Auftreten von *DDR*-Mutationen auch bei der AML zu deren Entstehung beitragen könnte.

5.3.2 Evaluierung des transformierenden Potentials der *DDR*-Mutationen

Die bei AML-Patienten gefundenen und in dieser Arbeit charakterisierten *DDR1*- und *DDR2*-Mutanten (*DDR1* A766V, *DDR2* G222R, *DDR2* M291I, *DDR2* D854N) wurden auf ihr transformierendes Potential untersucht. Dazu wurden Ba/F3 Zelllinien hergestellt, die jeweils einen der Rezeptoren stabil exprimieren. Als IL-3-abhängige Zellen [277] stellen Ba/F3 ein geeignetes und gängiges Zellmodell zur Analyse transformierender Onkogene, z.B. Tyrosinkinasen dar. Transformierende Onkogene vermitteln Ba/F3 Zellen IL-3-unabhängiges Zellwachstum [84]. Keine der in dieser Arbeit untersuchten *DDR1*- sowie *DDR2*-Mutationen (oder Wildtyp) führte zu IL-3-unabhängigem Wachstum von Ba/F3 Zellen. Eine gesteigerte Proliferation in Gegenwart ihres Liganden Kollagen wurde ebenfalls nicht beobachtet. Somit haben die untersuchten *DDR1*- und *DDR2*-Mutanten, zumindest wenn sie alleine exprimiert werden, kein transformierendes Potential in Ba/F3 Zellen. Eine ergänzende Untersuchung an dieser Stelle wäre die Koexpression von *DDRs* und Integrinen. Wie in Abbildung 4 gezeigt, ist die Interaktion von *DDR1* und $\beta 1$ -Integrinen zur Erzeugung bestimmter zellulärer Antworten wie zum Beispiel zur Zellzyklus-Progression notwendig. Mehrere solcher Beispiele von interagierenden Rezeptortyrosinkinasen und Integrinen sind schon bekannt, wie beispielsweise die Interaktion von PDGFR und VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) mit $\beta 3$ -Integrin oder EGFR (*epidermal growth factor receptor*) mit $\beta 1$ -Integrin [350-354].

Loriaux *et al.* untersuchten ebenfalls das transformierende Potential zweier bei AML-Patienten gefundener *DDR1*-Mutationen. Hammerman *et al.* das transformierende Potential zahlreicher bei Patienten mit NSCLC gefundener *DDR2*-Mutationen. Dazu stellten sie Ba/F3 Zelllinien her, die die jeweiligen Rezeptormutanten oder den Wildtyp stabil exprimierten und kultivierten diese in Abwesenheit von IL-3 [275, 347]. Loriaux *et al.* untersuchten das Proliferationsvermögen von Ba/F3 Zellen, die die AML-assoziierten Mutationen *DDR1* T460S und *DDR1* N502S exprimierten. Ba/F3 Zellen, die diese Rezeptormutanten exprimierten, verhielten sich wie *DDR1*-Wildtyp-exprimierende Ba/F3 Zellen und zeigten keine Proliferation in Abwesenheit von IL-3. Wie die in dieser Arbeit untersuchten AML-assoziierten Mutationen, transformierten auch die von Loriaux *et al.* untersuchten Mutationen Ba/F3 Zellen nicht zu IL-3 unabhängigem Wachstum [275].

Bei Hammerman *et al.* hingegen bewiesen alle charakterisierten, NSCLC-assoziierten *DDR2*-Mutationen (*DDR2* L63V, *DDR2* L239R, *DDR2* G253C, *DDR2* G505S, *DDR2* I638F, *DDR2* G774V) transformierendes Potential in Ba/F3 Zellen. Die Transformationskinetik und die Rate der IL-3-unabhängigen Proliferation waren für alle untersuchten *DDR2*-Mutationen identisch. Der genaue Mechanismus, der in diesem Fall zur zellulären Transformation führt, ist unklar. Gezeigt wurde, dass das Überleben der Ba/F3 Zellen in Abwesenheit von IL-3 mit einer STAT5-Phosphorylierung verbunden war und dass in den Ba/F3 Zellen, die einen mutierten *DDR2*-Rezeptor exprimierten, die Tyrosinkinase Src auch in Abwesenheit von IL-3 phosphoryliert blieb [347].

Ein Zusammenhang zwischen *DDR2* und Src war zuvor auch in einer anderen Studie beschrieben worden [173]. Dies lässt darauf schließen, dass die koordinierte Aktivität von *DDR2* und Src für die IL-3-unabhängige Proliferation dieser Zellen erforderlich ist. Überraschenderweise zeigte bei Hammerman *et al.* auch der *DDR2*-Wildtyp in gleicher Weise wie die *DDR2*-Mutanten IL-3-unabhängiges Wachstum von Ba/F3 Zellen [347]. Dies wurde bisher in keiner anderen Studie beobachtet. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde wie bei Hammerman *et al.* Ba/F3 Zellen, die *DDR*-Rezeptoren exprimieren, über mehrere Tage IL-3 entzogen. Die Expression des *DDR2*-Wildtyp-Rezeptors in Ba/F3 Zellen führte allerdings nicht zur IL-3-unabhängigen Proliferation der Zellen. Während in der vorliegenden Arbeit der IL-3-Entzug schrittweise erfolgte, säten Hammerman *et al.* die Ba/F3 Zellen direkt ohne IL-3 aus. Die Ursache der unterschiedlichen Beobachtung könnte außerdem im Expressionslevel des wildtypischen *DDR2*-Rezeptors begründet liegen, da Hammerman *et al.* von einer hohen Expression des wildtypischen *DDR2* sprechen [347]. Ein direkter Vergleich der *DDR2*-Expression zwischen beiden Studien ist nicht möglich. Das Transformationspotential von *DDR2* untersuchten Hammerman *et al.* zudem mit einem „Colony-Formation-Assay“, über den die Anzahl an ausgebildeten Kolonien ermittelt wird. Dazu wurden die oben erwähnten *DDR2*-Mutationen in murinen Fibroblastenzellen (NIH-3T3) exprimiert und in Soft-Agar kultiviert. Bei diesem Versuch zeigten nur zwei der sechs untersuchten Mutationen (*DDR2* L63V, *DDR2* I638F) eine signifikant höhere Fähigkeit Kolonien auszubilden [347].

Der Phänotyp einer Mutation ist abhängig von der untersuchten Zellfunktion. Deshalb könnte die Untersuchung des Selbsterneuerungspotentials oder anderer *DDR*-relevanter Funktionen, wie die Zellmigration oder Zelladhäsion, weiteren Aufschluss über die Auswirkung der AML-assoziierten Mutationen geben.

5.3.3 Weitere Charakterisierung der *DDR*-Mutationen: Zelladhäsion

Mehrere Studien haben gezeigt, dass *DDR1* eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt [355-357]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Zelladhäsion unter Einfluss von wildtypischem und mutiertem

DDR-Rezeptor miteinander verglichen. Es wurden Ba/F3 Zellen, die wildtypischen oder mutierten DDR1- oder DDR2-Rezeptor stabil exprimierten, zunächst noch mit minimalen Mengen IL-3, dann ganz ohne IL-3 kultiviert und dabei das Adhäsionsverhalten beobachtet. Eine Adhäsion der Zellen war generell nur in Anwesenheit von Kollagen zu beobachten. Kollagen wurde in Form von humanen Kollagenmonomeren (Typ I) zur Kultur gegeben. Die Adhäsion wurde in Form von Zelltrauben sichtbar, die sich entlang des Kollagens bildeten. Eine Adhäsion wurde nur bei DDR1, sowohl beim Wildtyp-Rezeptor als auch bei der DDR1 A766V Mutante beobachtet. In abgeschwächter Form war eine Adhäsion auch bei der kinasetoten Mutante DDR1 K618A zu sehen. Die Trauben lösten sich nach 48 Stunden in IL-3-freiem Medium wieder auf. Es war kein Unterschied in der Stärke der Traubenbildung zwischen DDR1-Wildtyp und DDR1 A766V zu erkennen. Um dies zu bestätigen, sollte eine Quantifizierung durchgeführt werden. Eine geeignete Form der Quantifizierung konnte aktuell noch nicht etabliert werden.

Die Rolle von DDR1- oder DDR2-Wildtyp für die Zelladhäsion wurde auf andere Weise in einer Studie von Xu *et al.* untersucht. Dabei adhärten HEK-293T Zellen, die stabil DDR1- oder DDR2-Wildtyp überexprimierten, schneller an Kollagen (Typ I) als die Vektorkontrolle oder als untransfizierte HEK-293. Weitere Untersuchungen aus dieser Studie haben ergeben, dass die Überexpression von DDR1 oder DDR2 in HEK-293 Zellen, die von Kollagen-bindenden β 1-Integrinen vermittelte Adhäsion an Kollagen (Typ I) begünstigt [280]. Da HEK-293 adhärenz Zellen sind, stellen sie im Vergleich zu Ba/F3 Zellen für diese Fragestellung das bessere Modellsystem dar. Unterstützend kommt hinzu, dass native HEK-293 Zellen eine relativ schwache Adhäsion an Kollagen (Typ I) zeigen [358]. Der von Xu *et al.* durchgeführte Versuch befindet sich in unserer Arbeitsgruppe aktuell im Aufbau. Auf diese Weise soll das Adhäsionsverhalten an Kollagen (Typ I) von mutiertem im Vergleich zu wildtypischem DDR1 bzw. DDR2 analysiert werden.

5.3.4 Aktivierungskinetik wildtypischer und mutierter DDR-Rezeptoren

In dieser Arbeit konnte für wildtypisches DDR1 und DDR2 bestätigt werden, dass die Aktivierung der DDRs durch ihren Liganden langsam erfolgt und sehr langanhaltend ist [148, 149, 344]. Die maximale Phosphorylierung von DDR1- und DDR2-Wildtyp in HEK-293T Zellen wurde nach mindestens 60 Minuten erreicht. Drei Stunden nach Stimulierung war die Phosphorylierung noch immer sehr stark bzw. maximal. Erst 12 Stunden nach Ligandzugabe war sie fast völlig zurückgegangen. Dies steht im Gegensatz zu den meisten anderen RTKs, wo die maximale Ligand-induzierte Phosphorylierung schon innerhalb weniger Minuten erreicht ist und die Herunterregulierung ebenfalls im Zeitfenster von Minuten liegt [359-361]. Die in dieser Arbeit in HEK-293T Zellen ermittelte Aktivierungskinetik der wildtypischen DDRs bestätigt die Ergebnisse von Vogel *et al.*. Ein einziger Unterschied besteht in der Aktivierungsdauer. Die Verwendung von murinem statt humanem Kollagen zur Stimulation könnte dies begründen [149]. Eine Studie hatte gezeigt, dass Kollagene vom selben Typ aber aus verschiedenen Spezies den Rezeptor unterschiedlich stark binden und zu leichten Unterschieden bei der Phosphorylierung von DDR1 führen [148].

Wie der Wildtyp verhielt sich auch die DDR1 Mutante A766V. Dies war für diese TKD-Mutante nicht zu erwarten. Da sich die DDR1 A766V Mutation in der Aktivierungsschleife der TKD befindet, einer für die Transphosphorylierung und Aktivierung der Kinase wichtigen Struktur, lag die Annahme nahe, dass die Mutation den Bereich der ATP-Hydrolyse behindert und folglich die Kinasefunktion stört.

DDR2 D854N verhielt sich ähnlich wie der Wildtyp und erreichte nach 30 Minuten Stimulation mit Kollagen seine maximale Phosphorylierung, die jedoch nach 12 Stunden noch nahezu maximal blieb.

Die Ursache der länger als bei Wildtyp andauernden Phosphorylierung bleibt unklar. Es kann davon ausgegangen werden, dass die DDR2 D854N Mutation keine regulatorische Funktion besitzt. Sie befindet sich im C-terminalen Bereich, der bei DDR2 nur sechs Aminosäuren lang ist, bei DDR1 acht Aminosäuren, und keine Tyrosine besitzt. Von DDR1 ist bekannt, dass die C-terminalen Aminosäuren, die gewöhnlich der C-terminalen Domäne zugeordnet sind, Teil der Kinasedomäne sind. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass C-terminale Aminosäuren von DDR1 und DDR2 eine regulatorische Funktion besitzen [53].

Die Phosphorylierungskinetik des DDR1-Wildtyp-Rezeptors wurde in dieser Arbeit außerdem in einem zweiten, unabhängigen Zellmodell, den Ba/F3 Zellen, untersucht und verhält sich ähnlich wie in HEK-293T. In Ba/F3 Zellen nimmt die Phosphorylierung von wildtypischem DDR1 bis 90 Minuten nach der Stimulation stark zu und bleibt für mindestens zwei Stunden maximal (Daten nicht gezeigt). Längere Stimulationsintervalle wurden mit Ba/F3 Zellen nicht durchgeführt. Loriaux *et al.* haben ebenfalls die Aktivierungskinetik von DDR1-Wildtyp und der bei AML-Patienten gefundenen *DDR1*-Mutationen (DDR1 T460S, DDR1 N502S) im Ba/F3 Zellmodell untersucht. Sie haben keine Unterschiede bezüglich der Phospho-Tyrosinlevel zwischen Wildtyp und Mutanten festgestellt [275]. Im Kontrast zu unseren Daten und zu anderen Studien [148, 149] konnten Loriaux *et al.* keine starke und langanhaltende Phosphorylierung des DDR1-Wildtyp-Rezeptors zeigen. Loriaux *et al.* haben jedoch alle Phosphorylierungsanalysen mit Ganzzelllysaten statt mit Immunpräzipitaten durchgeführt. Daraus resultierten viele, teilweise unspezifische Antikörperbindungen [275]. Aus diesem Grund ist eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse von Loriaux *et al.* enorm erschwert.

Anders als bei der bisher beschriebenen Aktivierungskinetik in HEK-293T zeigten die beiden extrazellulären DDR2-Mutanten DDR2 G222R und DDR2 M291I bereits im unstimulierten Zustand eine sehr starke Rezeptorphosphorylierung. Die Phosphorylierung des Rezeptors konnte durch Ligandzugabe nur noch unwesentlich verstärkt werden. Die Mutationen DDR2 G222R und DDR2 M291I befinden sich in der Discoidin-ähnlichen Domäne und somit außerhalb der Ligandbindedomäne, die in der Discoidin-Domäne liegt [157, 158]. Ein direkter Einfluss dieser beiden DDR2-Mutanten auf die Kollagenbindung ist folglich unwahrscheinlich. Denkbar ist jedoch, dass sie die Glykosylierung des Rezeptors beeinflussen. Dafür spricht, dass sich im Western Blot das Glykosylierungsmuster der extrazellulären Mutanten DDR2 G222R und DDR2 M291I von dem des DDR2-Wildtyps und der C-terminalen Mutante DDR2 D854N unterscheidet. Für DDR2 sind im Western Blot mehrere Glykosylierungsformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht zu erkennen. Während bei wildtypischem DDR2 und der C-terminalen Mutante die Bande für die am stärksten glykosylierte Form am prominentesten ist, sind bei den extrazellulären Mutanten die Banden für niedermolekulare, weniger glykosylierte Formen stärker. Dies könnte darauf hindeuten, dass die extrazellulären Mutanten die Glykosylierung des Rezeptors beeinflussen. Am deutlichsten war dieser Unterschied in Ba/F3 Zellen zu beobachten (siehe hierzu Abbildung 33). Diese Beobachtung steht in Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie von Phan *et al.*, die mehrere Glykosylierungsformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht bei der Expression des DDR2-Proteins in HEK-293 Zellen beschrieben. Sie benannten die unterschiedlichen Formen als Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukt der N-Glykosylierung [362]. Darüber hinaus zeigten Fu *et al.*, dass die N-Glykosylierung von DDR1 eine kritische Rolle bei der Aufrechterhaltung der inaktiven Konformation des Rezeptordimers spielt und brachten Asn211 mit der Regulierung des Aktivitätszustands von DDR1 in Verbindung. Eine mutierte Glykosylierungsstelle Asn211 führte zur Ligand-unabhängigen Rezeptorphosphorylierung [363]. Neben der konservierten N-Glykosylierungsstelle Asn211 (DDR1) bzw. Asn213 (DDR2) [362] enthält die Discoidin-ähnliche

Domäne, sowie die JM Domäne weitere zahlreiche Glykosylierungsstellen [53, 362]. Die Mutanten DDR2 G222R und DDR2 M291I betreffen zwar keine Glykosylierungsstellen, liegen jedoch in deren unmittelbarer Nähe. Eine Hypothese für die konstitutive Phosphorylierung der extrazellulären Rezeptormutanten ist deshalb, dass DDR2 G222R und DDR2 M291I durch einen bisher unbekanntem Mechanismus die Glykosylierung des Rezeptors beeinflussen, dadurch die N-Glykosylierung verhindern und es folglich zur Ligand-unabhängigen Rezeptoraktivierung kommt. Es sind weitere Versuche notwendig, um diese Hypothese zu prüfen.

Die molekularen und zellulären Mechanismen hinter der langsamen DDR-Phosphorylierung sind noch nicht aufgeklärt. Zur Aktivierungskinetik gibt es jedoch mehrere Modelle. Zwei Studien haben unabhängig voneinander gezeigt, dass maximale DDR2-Phosphorylierung von der Tyrosinkinase Src abhängig ist [173, 364]. Auch Hammerman *et al.* (siehe 5.3.2) wiesen auf diesen Zusammenhang hin [347]. Ein hierauf basierendes Modell besagt, dass Src nach der Ligandbindung bestimmte Tyrosine in der Aktivierungsschleife von DDR2 phosphoryliert, was am intrazellulären DDR2-Rezeptor zur Autophosphorylierung weiterer Tyrosine führt. Die phosphorylierten Tyrosine ermöglichen schließlich die Bindung von zytoplasmatischen DDR2-Adaptor- und Signalproteinen [364]. Auf ähnliche Weise scheint Src in die Aktivierung von DDR1 involviert zu sein [163]. L'Hôte *et al.* vermuten, dass DDR im inaktiven Zustand an eine Phosphatase gebunden ist, welche erst vom Rezeptor entfernt werden muss, bevor Kollagen gebunden und die Phosphorylierung des Rezeptors stattfinden kann. Außerdem beschreiben L'Hôte *et al.* eine schnellere Ligand-induzierte Phosphorylierungskinetik bei nicht adhärenen im Vergleich zu adhärenen Zellen. Deshalb spekulieren L'Hôte *et al.*, dass DDR1 an der Adhäsion der Zellen beteiligt ist und, solange die Zellen adhären sind, für Kollagen weniger zugänglich ist [344]. Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit sind hierzu einerseits ident, andererseits konträr. Bei der Messung der DDR1-Oberflächenexpression von K-562, einer Suspensionszelllinie, die DDR1 endogen exprimiert, war die nach 30-minütiger Stimulation mit humanem Kollagen (Typ I) sichtbare DDR1-Oberflächenexpression nach 90-minütiger Stimulation fast vollständig verschwunden. Dies deutet auf eine Internalisierung des Rezeptors und somit auf eine generell rascher ablaufende Phosphorylierungskinetik hin (Daten nicht gezeigt). Im Gegenzug war bei der Untersuchung der DDR1-Phosphorylierungskinetik in einer DDR1 transgen exprimierenden Suspensionzelllinie (Ba/F3) die maximale Phosphorylierung auch erst nach 90 Minuten erreicht und nach 120 Minuten noch immer prominent (Daten nicht gezeigt). Für DDR2 liegt hierzu kein Ergebnis vor. Ein weiterer möglicher Mechanismus der langsamen DDR-Aktivierung wurde von Mihai *et al.* beschrieben, die mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem DDR1 gezeigt haben, dass es binnen Minuten nach der Stimulation mit Kollagen zur DDR1-Gruppierung und zytoplasmatischen Internalisierung in frühe Endosomen kommt. Ihr Modell geht von DDR1-Monomeren und -Dimeren an der Zelloberfläche aus. Die Interaktion mit Kollagen führt dann zur Internalisierung von DDR1-Dimeren und zur Aktivierung des endosomalen Signalweges, der die DDR1-Aktivierung herbeiführt, gefolgt vom Recycling des aktivierten DDR1-Rezeptors zurück an die Zelloberfläche. Das Recycling geschieht etwa binnen 60 Minuten [365]. Dieses Zeitfenster stimmt ungefähr mit der experimentell ermittelten Rezeptorphosphorylierung überein. Bezüglich der langanhaltenden Rezeptoraktivierung gibt es Berichte, dass die von RTKs vermittelte Signalübertragung auch von Endosomen aus fort dauern kann [366, 367].

Zudem ist wenig über die molekularen Mechanismen der transmembranösen Signalübertragung bekannt, also wie das Binden von Kollagen an den Rezeptor in die Aktivierung der Kinase übersetzt wird und ob die JM-Domänen an der Autoinhibition oder Aktivierung der Kinasedomäne beteiligt sind.

6 Ausblick

Der Stellenwert zahlreicher Mutationen in der Krankheitsentstehung der AML ist noch unbekannt. Zukünftig ist es deshalb von großem Interesse deren Rolle in der Pathogenese der AML und die prognostische Bedeutung von AML-assoziierten Mutationen zu ermitteln, die Interaktionen zwischen diesen Mutationen zu verstehen und neue therapeutische Zielstrukturen zu definieren. Bezüglich der häufigen Assoziation von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen deuteten bisher ausschließlich klinische Daten auf ihre Interaktion bei der Entstehung der AML hin. In der vorliegenden Arbeit wurde das erste zellbasierte AML-Modell entwickelt, das die gemeinsame Untersuchung von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen ermöglichte. Die Analyse des Proliferationsverhaltens der Zellen des Modellsystems deutet auf ein Zusammenwirken der beiden Mutationen bei der Leukämogenese hin. Der insgesamt jedoch nur schwach ausgeprägte Phänotyp des in dieser Arbeit etablierten Zellmodells erfordert zum eindeutigen Nachweis der Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen bei der Entstehung von AML ein alternatives Modellsystem. Die Nachteile und Hürden alternativer zellbasierter Modelle sind in 5.1.5 ausführlich erläutert. Aus einem weiteren Grund ist das vorliegende Zellmodell für weitere funktionelle Analysen zur gemeinsamen Untersuchung von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen weniger gut geeignet: Die für das Modell verwendete humane AML-Zelllinie OCI-AML3 besitzt eine Mutation in der Methyltransferase DNMT3A. Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass das gleichzeitige Auftreten von Mutationen in den Genen *NPM1*, *FLT3* und *DNMT3A* möglicherweise eine eigene, neue AML-Subgruppe darstellt [29]. Aus heutiger Sicht erweist sich deshalb das 2013 von Mallardo *et al.* publizierte Mausmodell [294] als das geeignetste Alternativmodell. Dieses Modell belegt die Kooperation von *NPM1*- und *FLT3*-ITD-Mutationen bei der Entstehung von AML *in vivo*. Es könnte in Zukunft für therapeutische Fragestellungen eingesetzt werden, denn trotz der enormen genetischen Heterogenität wird die Mehrheit der AML-Patienten nach wie vor nach demselben Therapieschema behandelt. Neue Therapieansätze sind dringend erforderlich, vor allem für die prognostisch ungünstigen und schlecht auf die Standard-Chemotherapie ansprechenden AML-Patienten mit *FLT3*-ITD-Mutation und insbesondere der Patienten mit hoher *FLT3*-ITD-Last. Erstrebenswert wäre folglich ein Mausmodell, das im *NPM1*-mutierten Hintergrund auch unterschiedliche ITD/WT-Verhältnisse modelliert. Die in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses im *NPM1*-mutierten Hintergrund untersuchten Genexpressionsprofile lieferten neue Einblicke auf molekularer Ebene sowie Hinweise auf Gene, die möglicherweise in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnten.

Die *FLT3*-Kinase wird nicht nur durch aktivierende Mutationen wie die ITD konstitutiv aktiviert. Auch hohe *FLT3*-WT-Expressionslevel führen diesen Zustand herbei und verschlechtern die Prognose der betroffenen AML-Patienten. Erste Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von *FLT3* in dieser Arbeit zeigen, dass ein mutierter Transkriptionsfaktor zur verstärkten Aktivierung des *Flt3*-Promotors führen kann. Um zukünftig den Zusammenhang zwischen transkriptioneller Regulation und Expression von *FLT3* als Ursache hoher *FLT3*-WT-Expressionslevel näher zu untersuchen, sollte nach der Identifikation *FLT3*-regulierender Transkriptionsfaktoren (TF) eine Korrelation zwischen mutierten bzw. deregulierten TF und der *FLT3*-Expression *in vitro* sowie insbesondere in AML-Patienten durchgeführt werden.

Zu Mutationen, die bei AML-Patienten auftreten, deren Rolle in der Erkrankung aber nach wie vor unbekannt ist, gehören unter anderem Mutationen in den Rezeptortyrosinkinasen DDR1 und DDR2. Erste Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung dieser Mutationen in dieser Arbeit haben keinen transformierenden Phänotyp im Ba/F3 Modell ergeben. Eine Koexpression von DDRs und

Integrinen, wie sie für bestimmte zelluläre Antworten erforderlich ist und wie sie von anderen RTKs bekannt ist, ebenso wie die Ermittlung des Selbsterneuerungspotentials wären bezüglich der Untersuchung des transformierenden Potentials mutierter DDRs eine sinnvolle Ergänzung. Für die weitere funktionelle Charakterisierung der wildtypischen und mutierten DDRs ist geplant die Zelladhäsion, als eine der Hauptaufgaben der DDR-Rezeptoren, näher zu untersuchen. Die Zelladhäsion könnte bei hämatopoetischen Zellen in der Stammzellnische oder bei der Leukozyten-Migration durch das Endothel von Bedeutung sein. Des Weiteren zeigten die extrazellulären DDR2-Mutanten in der vorliegenden Arbeit eine konstitutive Rezeptorphosphorylierung. Die zellulären Auswirkungen dieser Beobachtungen bleiben zu klären.

Da RTKs nicht nur eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer AML spielen, sondern zudem auch wichtige therapeutische Zielmoleküle darstellen, ist ihr Verständnis in der AML von besonderer Bedeutung.

7 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist aus genetischer Sicht eine sehr heterogene Erkrankung. Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) wie FLT3 sind in der Leukämogenese von zentraler Bedeutung. Durch Mutationen aktivierte RTKs sind allerdings alleine nicht in der Lage eine AML zu induzieren. Die Kooperation mit anderen Mutationen ist hierfür notwendig. Zu den am häufigsten gemeinsam auftretenden Mutationen in der AML gehören *NPM1*- und *FLT3*-ITD- (*internal tandem duplication*) Mutationen. Klinische Daten zeigen, dass eine *FLT3*-ITD die gute Prognose von *NPM1*-mutierten (*NPM1c+*) Patienten in Abhängigkeit des *FLT3*-ITD-mRNA-Levels in negativer Weise beeinflusst. Dies lässt auf ein pathogenes Zusammenwirken beider Genmutationen in der AML schließen, welches im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Dazu wurde basierend auf der humanen AML-Zelllinie OCI-AML3 mittels stabiler, lentiviraler Transduktion das erste zelluläre Modellsystem etabliert, das die relevanten Genotypen (*NPM1c+/FLT3*-ITD; *NPM1c+/FLT3*-WT) sowie unterschiedliche Verhältnisse von *FLT3*-ITD zu *FLT3*-WT (ITD/WT) im *NPM1*-mutierten Hintergrund modelliert. Zunächst wurde die *NPM1*-Mutation sowie die Funktionalität des *FLT3*-WT- und *FLT3*-ITD-Rezeptors in den nativen und transgenen Zellen bestätigt. Mit Hilfe des Zellmodells konnte gezeigt werden, dass Zellen, die beide Mutationen tragen, *in vitro* wie auch *in vivo* einen Wachstumsvorteil besitzen. Dieser vergrößerte sich zudem mit zunehmendem ITD/WT-Verhältnis. Ab einem bestimmten ITD/WT-Verhältnis konnte dieser Wachstumsvorteil *in vitro* mit einem *FLT3*-Inhibitor über eine gewisse Dauer gehemmt werden. Diese Ergebnisse könnten auf ein Zusammenwirken der beiden Mutationen bei der Leukämogenese hinweisen und eine Ursache für die schlechteren Überlebenskurven von Patienten mit beiden Mutationen und zunehmender *FLT3*-ITD-Last darstellen. Der insgesamt jedoch nur schwach ausgeprägte Phänotyp des etablierten Zellmodells erfordert zum eindeutigen Nachweis der funktionellen Interaktion von *NPM1*- und *FLT3*-ITD Mutationen ein alternatives Modellsystem.

In diesem Zellmodell zeigten Zellen, die den *FLT3*-WT-Rezeptor überexprimierten, ebenfalls einen schwachen Wachstumsvorteil gegenüber nativen Zellen mit endogener *FLT3*-WT-Expression. Neben aktivierenden *FLT3*-Mutationen wie einer ITD, führen auch hohe *FLT3*-WT-Expressionslevel zur konstitutiven Aktivierung der *FLT3*-Kinase und verschlechtern die Prognose der Patienten. Deshalb wurde in dieser Arbeit mit der Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *FLT3*, als mögliche Ursache hoher *FLT3*-WT-Expressionslevel, begonnen. *In silico* wurden im proximalen *FLT3*-Promotor Bindestellen für die hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren (TF) PAX5 und MYB identifiziert. Mit Hilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems wurden PAX5 als schwacher Repressor und MYB als Aktivator des *Flt3*-Promotors bestätigt. Auch der Transkriptionsfaktor CEBPA verhielt sich auf gleiche Weise als Aktivator der *Flt3*-Promotoraktivität. Eine Punktmutation im *CEBPA*-Gen, die aus zwei AML-Fällen bekannt ist, führte zu einer erhöhten *Flt3*-Promotoraktivität. Die Identifizierung weiterer mutierter, *FLT3*-regulierender TF und ihre Korrelation mit der *FLT3*-Expression sollen zukünftig tiefere Einblicke in die transkriptionelle Regulierung von *FLT3* als Ursache der *FLT3*-Überexpression in AML-Patienten gewähren.

Für eine Reihe von in AML-Patienten gefundenen Mutationen ist deren Rolle in der Pathogenese der AML noch unbekannt. Dazu gehören Mutationen in den Rezeptortyrosinkinasen DDR1 und DDR2. In der vorliegenden Arbeit wurden *DDR1*- und *DDR2*-Mutationen stabil in Ba/F3 Zellen und transient in HEK-293T Zellen exprimiert, um ihr transformierendes Potential zu untersuchen und diese funktionell zu charakterisieren. Transgene, *DDR1*- und *DDR2*-exprimierende Ba/F3 Zellen zeigten keinen transformierenden Phänotyp. Weitere Untersuchungen zeigten eine konstitutive Phosphorylierung

der extrazellulären *DDR2*-Mutanten (G222R, M291I) in HEK-293T Zellen und eine Adhäsion von Ba/F3 Zellen mit wildtypischem sowie mutiertem *DDR1*-Rezeptor in Anwesenheit des *DDR*-Liganden Kollagen. *DDR1*- und *DDR2*-Rezeptoren sind bisher vor allem in soliden Tumoren untersucht. Weitere funktionelle Analysen sind notwendig, um ihren Stellenwert bei der Entstehung von AML zu erfassen. Diese Arbeit zeigt, dass Rezeptortyrosinkinasen in der Leukämogenese auf unterschiedliche Weise eine wesentliche Rolle spielen können. Da Rezeptortyrosinkinasen zudem wichtige Zielmoleküle für therapeutische Ansätze darstellen, sind sie von besonderer Bedeutung.

8 Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a genetically heterogeneous clonal disorder. Receptor tyrosine kinases (RTKs) like FLT3 play an important role in leukemogenesis. However, constitutively activated RTKs (e.g. by mutations) alone are not sufficient to induce AML. Cooperating mutations are necessary. *NPM1* mutations and *FLT3* internal tandem duplications (ITD) represent the most frequent concomitant mutations in AML. Clinical data shows that a *FLT3*-ITD negatively modulates the favorable prognosis of *NPM1* mutated (*NPM1c+*) patients depending on the *FLT3*-ITD mRNA level. This indicates a pathogenic interaction of *NPM1* and *FLT3*-ITD mutations in AML which was analyzed in this thesis. Based on the human AML cell line OCI-AML3 the first cellular model system that models the relevant genotypes (*NPM1c+/FLT3*-ITD; *NPM1c+/FLT3*-WT) and different ratios of *FLT3*-ITD to *FLT3*-WT (ITD/WT) in a *NPM1* mutated background was established using stable, lentiviral transduction. The presence of the *NPM1* mutation and the functionality of the *FLT3*-WT and *FLT3*-ITD receptor in native and transgenic cells had been confirmed. Cells which carried both mutations had a proliferation advantage *in vitro* and *in vivo* that accelerated with increasing ITD/WT ratio. Starting from certain ITD/WT ratio the proliferation advantage could be inhibited *in vitro* for a period of time using a *FLT3* inhibitor. These results might indicate an interaction of both mutations in leukemogenesis and explain the poor survival curves of patients who harbor both mutations and increasing ITD/WT ratio. The overall weak phenotype of the cellular model system requires an alternate model system to clearly proof the functional interaction of *NPM1* and *FLT3*-ITD mutations. OCI-AML3 that overexpressed the *FLT3*-WT receptor also showed a slight proliferation advantage compared to cells with baseline *FLT3*-WT expression in native cells. In addition to activating *FLT3* mutations like an ITD, high *FLT3*-WT expression level also lead to constitutive activation of the *FLT3* kinase and worsen the prognosis of the patients. Therefore the transcriptional regulation of *FLT3* as a potential cause of high *FLT3*-WT expression level was investigated in this thesis. Binding sites for the haematopoietic transcription factors (TF) PAX5 and MYB in the proximal promoter of *FLT3* were identified *in silico*. With the aid of the Dual-Luciferase® Reporter Assay system PAX5 was confirmed as a weak repressor and MYB as an activator of the *Flt3* promoter. In addition the transcription factor CEBPA was analyzed. CEBPA activated the *Flt3* promoter in a similar manner as MYB. A point mutation in the *CEBPA* gene which is known from two familial AML cases approximately doubled the *Flt3* promoter activity compared to wild type CEBPA. The identification of more mutations in TF regulating *FLT3* and their correlation with the *FLT3* expression should provide insight into the transcriptional regulation of *FLT3* as a potential cause of the *FLT3* overexpression in AML patients. The role in the pathogenesis of AML is unknown for a number of AML related mutations e.g. mutations in the receptor tyrosine kinases DDR1 and DDR2. In this thesis *DDR1* and *DDR2* mutations were stably expressed in Ba/F3 cells and transiently expressed in HEK-293T cells to investigate their transforming potential and to functionally characterize them. Transgenic *DDR1* and *DDR2* expressing Ba/F3 cells did not reveal a transforming phenotype. The extracellular *DDR2* mutations (G222R, M291I) showed a constitutive phosphorylation in HEK-293T cells and the wild type *DDR1* receptor as well as the mutant *DDR1* receptor expressing Ba/F3 cells adhered to their ligand collagen. So far *DDR1* and *DDR2* receptors have been studied in solid tumors primarily. To determine their significance in the pathogenesis of AML further functional analysis need to be performed. This thesis shows that distinct receptor tyrosine kinases can play an important role in leukemogenesis. Furthermore, receptor tyrosine kinases are of particular importance because they represent crucial target molecules for therapeutic approaches.

9 Verzeichnisse

9.1 Literaturverzeichnis

1. Ehninger, G., H. Link, and W.E. Berdel, *Akute myeloische Leukämie*. 2008: Deutscher Ärzte-Verlag
2. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.
3. <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/leukaemien/ueberblick.php>.
4. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
5. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013.
6. Dores, G.M., et al., *Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007*. Blood, 2012. **119**(1): p. 34-43.
7. Rollig, C., et al., *Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system*. J Clin Oncol, 2011. **29**(20): p. 2758-65.
8. Marcucci, G., T. Haferlach, and H. Dohner, *Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications*. J Clin Oncol, 2011. **29**(5): p. 475-86.
9. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
10. Bennett, J.M., et al., *Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group*. Ann Intern Med, 1985. **103**(3): p. 460-2.
11. Bennett, J.M., et al., *Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0)*. Br J Haematol, 1991. **78**(3): p. 325-9.
12. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
13. Bloomfield, C.D., et al., *Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: a third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia*. Cancer, 1997. **80**(11 Suppl): p. 2191-8.
14. Grimwade, D., *The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2001. **14**(3): p. 497-529.
15. Byrd, J.C., et al., *Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4325-36.
16. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2322-33.
17. Grimwade, D. and R.K. Hills, *Independent prognostic factors for AML outcome*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 385-95.
18. Koristek, Z. and J. Mayer, *Leukemogenesis and therapy of acute promyelocytic leukemia: from the worse to the most favorable subtype of acute myeloid leukemia*. Vnitr Lek, 2008. **54**(7-8): p. 701-27.
19. <http://atlasgeneticsoncology.org>.
20. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.

21. Marcucci, G., K. Mrozek, and C.D. Bloomfield, *Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics*. *Curr Opin Hematol*, 2005. **12**(1): p. 68-75.
22. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, *Cytogenetics in acute leukemia*. *Blood Rev*, 2004. **18**(2): p. 115-36.
23. Rockova, V., et al., *Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers*. *Blood*, 2011. **118**(4): p. 1069-76.
24. Liersch, R., et al., *Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use*. *Br J Haematol*, 2014. **165**(1): p. 17-38.
25. Walker, A.R. and G. Marcucci, *Management of Patients With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Who Have Neither Favorable nor Unfavorable Markers*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2014. **12**(4): p. 527-34.
26. Dohner, K., et al., *Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations*. *Blood*, 2005. **106**(12): p. 3740-6.
27. Frohling, S., et al., *CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(4): p. 624-33.
28. Whitman, S.P., et al., *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study*. *Cancer Res*, 2001. **61**(19): p. 7233-9.
29. *Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia*. *New England Journal of Medicine*, 2013. **368**(22): p. 2059-2074.
30. Baldus, C.D., et al., *Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review*. *Br J Haematol*, 2007. **137**(5): p. 387-400.
31. Mrozek, K., K. Heinonen, and C.D. Bloomfield, *Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001. **14**(1): p. 19-47.
32. Renneville, A., et al., *Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature*. *Leukemia*, 2008. **22**(5): p. 915-31.
33. Schiffer, C.A., *Molecular characterization of AML: a significant advance or just another prognostic factor?* *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008. **21**(4): p. 621-8.
34. Martelli, M.P., et al., *Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications*. *Blood Rev*, 2013. **27**(1): p. 13-22.
35. de Guzman, C.G., et al., *Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(15): p. 5506-17.
36. Grisolan, J.L., et al., *Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences*. *Blood*, 1997. **89**(2): p. 376-87.
37. Kelly, L.M., et al., *FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model*. *Blood*, 2002. **99**(1): p. 310-8.
38. Schessl, C., et al., *The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2159-68.
39. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1532-42.
40. Kelly, L.M. and D.G. Gilliland, *Genetics of myeloid leukemias*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2002. **3**: p. 179-98.
41. Krebs, E.G., *Historical perspectives on protein phosphorylation and a classification system for protein kinases*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1983. **302**(1108): p. 3-11.

42. Hubbard, S.R., *Structural analysis of receptor tyrosine kinases*. Prog Biophys Mol Biol, 1999. **71**(3-4): p. 343-58.
43. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
44. Robinson, D.R., Y.M. Wu, and S.F. Lin, *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5548-57.
45. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
46. Gupta, R., C.L. Knight, and B.J. Bain, *Receptor tyrosine kinase mutations in myeloid neoplasms*. Br J Haematol, 2002. **117**(3): p. 489-508.
47. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Tyrosine kinases as targets for cancer therapy*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 172-87.
48. Bains, A., et al., *FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: Frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid leukemia*. Am J Clin Pathol, 2011. **135**(1): p. 62-9.
49. Yarden, Y. and A. Ullrich, *Growth factor receptor tyrosine kinases*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 443-78.
50. Choura, M. and A. Rebai, *Receptor tyrosine kinases: from biology to pathology*. J Recept Signal Transduct Res, 2011. **31**(6): p. 387-94.
51. Rosnet, O. and D. Birnbaum, *Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases*. Crit Rev Oncog, 1993. **4**(6): p. 595-613.
52. Agnes, F., et al., *Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III*. Gene, 1994. **145**(2): p. 283-8.
53. Leitinger, B., *Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions*. Int Rev Cell Mol Biol, 2014. **310**: p. 39-87.
54. Weinberg, R., *The biology of cancer*. Second Edition ed. 2014: Garland Science.
55. Heldin, C.H., *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell, 1995. **80**(2): p. 213-23.
56. Goh, L.K. and A. Sorkin, *Endocytosis of receptor tyrosine kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a017459.
57. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
58. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. Leukemia, 1996. **10**(2): p. 238-48.
59. Stirewalt, D.L. and J.P. Radich, *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(9): p. 650-65.
60. Dolence, J.J., et al., *Flt3 signaling regulates the proliferation, survival, and maintenance of multipotent hematopoietic progenitors that generate B cell precursors*. Exp Hematol, 2014. **42**(5): p. 380-393 e3.
61. Griessinger, E., et al., *Preclinical targeting of NF-kappaB and FLT3 pathways in AML cells*. Leukemia, 2008. **22**(7): p. 1466-9.
62. Carow, C.E., et al., *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood, 1996. **87**(3): p. 1089-96.
63. Zheng, R., et al., *FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells*. Blood, 2004. **103**(1): p. 267-74.
64. Lisovsky, M., et al., *Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells*. Leukemia, 1996. **10**(6): p. 1012-8.
65. Drexler, H.G., C. Meyer, and H. Quentmeier, *Effects of FLT3 Ligand on Proliferation and Survival of Myeloid Leukemia Cells*. Leukemia & Lymphoma, 1999. **33**(1-2): p. 83-91.
66. Birg, F., et al., *Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages*. Blood, 1992. **80**(10): p. 2584-93.

67. Birg, F., et al., *The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies*. Leuk Lymphoma, 1994. **13**(3-4): p. 223-7.
68. Kuchenbauer, F., et al., *Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2005. **90**(12): p. 1617-25.
69. Griffith, J., et al., *The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain*. Mol Cell, 2004. **13**(2): p. 169-78.
70. Abu-Duhier, F.M., et al., *Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 983-8.
71. Thiede, C., et al., *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4326-35.
72. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
73. Whitman, S.P., et al., *FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1552-9.
74. Janke, H., et al., *Activating FLT3 mutants show distinct gain-of-function phenotypes in vitro and a characteristic signaling pathway profile associated with prognosis in acute myeloid leukemia*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e89560.
75. Torrent, M., et al., *Analysis of the activating mutations within the activation loop of leukemia targets Flt-3 and c-Kit based on protein homology modeling*. J Mol Graph Model, 2004. **23**(2): p. 153-65.
76. Gale, R.E., et al., *No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3658-65.
77. Schnittger, S., et al., *Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease*. Blood, 2002. **100**(1): p. 59-66.
78. Yokota, S., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines*. Leukemia, 1997. **11**(10): p. 1605-9.
79. Schneider, F., et al., *Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML)*. Ann Hematol, 2012. **91**(1): p. 9-18.
80. Port, M., et al., *Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis*. Ann Hematol, 2014.
81. Nakao, M., et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(12): p. 1911-8.
82. Kiyoi, H., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product*. Leukemia, 1998. **12**(9): p. 1333-7.
83. Choudhary, C., et al., *Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD*. Blood, 2007. **110**(1): p. 370-4.
84. Hayakawa, F., et al., *Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines*. Oncogene, 2000. **19**(5): p. 624-31.
85. Mizuki, M., et al., *Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3907-14.

86. Nosaka, T., et al., *STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells*. EMBO J, 1999. **18**(17): p. 4754-65.
87. Spiekermann, K., et al., *Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 2140-50.
88. Quentmeier, H., et al., *FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 120-4.
89. Murata, K., et al., *Selective cytotoxic mechanism of GTP-14564, a novel tyrosine kinase inhibitor in leukemia cells expressing a constitutively active Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32892-8.
90. Tse, K.F., G. Mukherjee, and D. Small, *Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation*. Leukemia, 2000. **14**(10): p. 1766-76.
91. Rocnik, J.L., et al., *Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1339-45.
92. Coffey, P.J., L. Koenderman, and R.P. de Groot, *The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2511-22.
93. Vempati, S., et al., *Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential*. Blood, 2007. **110**(2): p. 686-94.
94. Vempati, S., et al., *Transformation by oncogenic mutants and ligand-dependent activation of FLT3 wild-type requires the tyrosine residues 589 and 591*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(14): p. 4437-45.
95. Frohling, S., et al., *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, 2002. **100**(13): p. 4372-80.
96. Estey, E.H., *Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management*. Am J Hematol, 2012. **87**(1): p. 89-99.
97. Bienz, M., et al., *Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(4): p. 1416-24.
98. Kainz, B., et al., *Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16)*. Hematol J, 2002. **3**(6): p. 283-9.
99. Schnittger, S., et al., *Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA*. Haematologica, 2011. **96**(12): p. 1799-807.
100. Schnittger, S., et al., *FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia*. Acta Haematol, 2004. **112**(1-2): p. 68-78.
101. Gale, R.E., et al., *The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2776-84.
102. Kottaridis, P.D., et al., *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, 2001. **98**(6): p. 1752-9.
103. Fitzgibbon, J., et al., *Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9152-4.
104. Griffiths, M., et al., *Acquired isodisomy for chromosome 13 is common in AML, and associated with FLT3-itd mutations*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2355-8.
105. Klco, J.M., et al., *Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2014. **25**(3): p. 379-92.

106. Welch, J.S., et al., *The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia*. Cell, 2012. **150**(2): p. 264-78.
107. Hovland, R., B.T. Gjertsen, and O. Bruserud, *Acute myelogenous leukemia with internal tandem duplication of the Flt3 gene appearing or altering at the time of relapse: a report of two cases*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(10): p. 2027-9.
108. Kottaridis, P.D., et al., *Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2393-8.
109. Shih, L.Y., et al., *Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2387-92.
110. Doepfner, K.T., D. Boller, and A. Arcaro, *Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **63**(3): p. 215-30.
111. Fathi, A.T. and B.A. Chabner, *FLT3 inhibition as therapy in acute myeloid leukemia: a record of trials and tribulations*. Oncologist, 2011. **16**(8): p. 1162-74.
112. Fiedler, W., et al., *A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease*. Blood, 2005. **105**(3): p. 986-93.
113. Smith, B.D., et al., *Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3669-76.
114. Stone, R.M., et al., *Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412*. Blood, 2005. **105**(1): p. 54-60.
115. DeAngelo, D.J., et al., *Phase 1/2 study of tandutinib (MLN518) plus standard induction chemotherapy in newly diagnosed acute myelogenous leukemia (AML)*. 48th ASH Annual Meeting, 2006. **Abstract 158**.
116. Ravandi, F., et al., *Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2010. **28**(11): p. 1856-62.
117. Serve, H., et al., *Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(25): p. 3110-8.
118. Stone, R.M., et al., *Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2012. **26**(9): p. 2061-8.
119. Levis, M., et al., *A Randomized, Open-Label Study of Lestaurtinib (CEP-701), an Oral FLT3 Inhibitor, Administered in Sequence with Chemotherapy in Patients with Relapsed AML Harboring FLT3 Activating Mutations: Clinical Response Correlates with Successful FLT3 Inhibition*. 47th ASH Annual Meeting, 2005. **Abstract 403**.
120. Cortes, J., et al., *AC220, a Potent, Selective, Second Generation FLT3 Receptor Tyrosine Kinase (RTK) Inhibitor, in a First-in-Human (FIH) Phase 1 AML Study*. 51st ASH Annual Meeting, 2009. **Abstract 636**.
121. Valiathan, R.R., et al., *Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression*. Cancer Metastasis Rev, 2012. **31**(1-2): p. 295-321.
122. Noordeen, N.A., et al., *A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22744-51.
123. Olaso, E., et al., *Impaired dermal wound healing in discoidin domain receptor 2-deficient mice associated with defective extracellular matrix remodeling*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2011. **4**(1): p. 5.

124. Alves, F., et al., *Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer*. *Oncogene*, 1995. **10**(3): p. 609-18.
125. Kawai, I., et al., *Discoidin domain receptor 2 (DDR2) regulates proliferation of endochondral cells in mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **427**(3): p. 611-7.
126. Vogel, W.F., et al., *Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(8): p. 2906-17.
127. Labrador, J.P., et al., *The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism*. *EMBO Rep*, 2001. **2**(5): p. 446-52.
128. Ali, B.R., et al., *Trafficking defects and loss of ligand binding are the underlying causes of all reported DDR2 missense mutations found in SMED-SL patients*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(11): p. 2239-50.
129. Bargal, R., et al., *Mutations in DDR2 gene cause SMED with short limbs and abnormal calcifications*. *Am J Hum Genet*, 2009. **84**(1): p. 80-4.
130. Ahmad, P.J., et al., *Discoidin domain receptor-1 deficiency attenuates atherosclerotic calcification and smooth muscle cell-mediated mineralization*. *Am J Pathol*, 2009. **175**(6): p. 2686-96.
131. Franco, C., et al., *Increased cell and matrix accumulation during atherogenesis in mice with vessel wall-specific deletion of discoidin domain receptor 1*. *Circ Res*, 2010. **106**(11): p. 1775-83.
132. Franco, C., et al., *Discoidin domain receptor 1 on bone marrow-derived cells promotes macrophage accumulation during atherogenesis*. *Circ Res*, 2009. **105**(11): p. 1141-8.
133. Franco, C., et al., *Discoidin domain receptor 1 (ddr1) deletion decreases atherosclerosis by accelerating matrix accumulation and reducing inflammation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Circ Res*, 2008. **102**(10): p. 1202-11.
134. Flamant, M., et al., *Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertension-induced renal disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(12): p. 3374-81.
135. Gross, O., et al., *Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease*. *Matrix Biol*, 2010. **29**(5): p. 346-56.
136. Hahn, W.H., et al., *Linkage and association study of discoidin domain receptor 1 as a novel susceptibility gene for childhood IgA nephropathy*. *Int J Mol Med*, 2010. **25**(5): p. 785-91.
137. Avivi-Green, C., M. Singal, and W.F. Vogel, *Discoidin domain receptor 1-deficient mice are resistant to bleomycin-induced lung fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(4): p. 420-7.
138. Zhang, X.H., et al., *Expression of discoidin domain receptors (DDR2) in alcoholic liver fibrosis in rats*. *Arch Med Res*, 2010. **41**(8): p. 586-92.
139. Hu, K., et al., *Pathogenesis of osteoarthritis-like changes in the joints of mice deficient in type IX collagen*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(9): p. 2891-900.
140. Sunk, I.G., et al., *Increased expression of discoidin domain receptor 2 is linked to the degree of cartilage damage in human knee joints: a potential role in osteoarthritis pathogenesis*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(11): p. 3685-92.
141. Xu, L., et al., *Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(8): p. 2663-73.
142. Xu, L., et al., *Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(1): p. 548-55.
143. Su, J., et al., *Discoidin domain receptor 2 is associated with the increased expression of matrix metalloproteinase-13 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis*. *Mol Cell Biochem*, 2009. **330**(1-2): p. 141-52.
144. Chiaretti, S., et al., *Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(20): p. 7209-19.

145. Renne, C., et al., *Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4051-9.
146. Willenbrock, K., et al., *Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma*. *Haematologica*, 2006. **91**(5): p. 596-604.
147. Poole, S., et al., *Sequence and expression of the discoidin I gene family in Dictyostelium discoideum*. *J Mol Biol*, 1981. **153**(2): p. 273-89.
148. Shrivastava, A., et al., *An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors*. *Mol Cell*, 1997. **1**(1): p. 25-34.
149. Vogel, W., et al., *The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen*. *Mol Cell*, 1997. **1**(1): p. 13-23.
150. Kadler, K.E., et al., *Collagens at a glance*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 12): p. 1955-8.
151. Ricard-Blum, S., *The collagen family*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(1): p. a004978.
152. Konitsiotis, A.D., et al., *Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(11): p. 6861-8.
153. Xu, H., et al., *Collagen binding specificity of the discoidin domain receptors: binding sites on collagens II and III and molecular determinants for collagen IV recognition by DDR1*. *Matrix Biol*, 2011. **30**(1): p. 16-26.
154. Hou, G., W. Vogel, and M.P. Bendeck, *The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(6): p. 727-35.
155. Leitinger, B., A. Steplewski, and A. Fertala, *The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, DDR2*. *J Mol Biol*, 2004. **344**(4): p. 993-1003.
156. Leitinger, B. and A.P. Kwan, *The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen*. *Matrix Biol*, 2006. **25**(6): p. 355-64.
157. Ichikawa, O., et al., *Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2*. *EMBO J*, 2007. **26**(18): p. 4168-76.
158. Leitinger, B., *Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16761-9.
159. Finger, C., C. Escher, and D. Schneider, *The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions*. *Sci Signal*, 2009. **2**(89): p. ra56.
160. Abbonante, V., et al., *Discoidin domain receptor 1 protein is a novel modulator of megakaryocyte-collagen interactions*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(23): p. 16738-46.
161. Ghosh, S., et al., *Regulation of adipose oestrogen output by mechanical stress*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 1821.
162. Lin, K.L., et al., *Transcriptional upregulation of DDR2 by ATF4 facilitates osteoblastic differentiation through p38 MAPK-mediated Runx2 activation*. *J Bone Miner Res*, 2010. **25**(11): p. 2489-503.
163. Lu, K.K., D. Trcka, and M.P. Bendeck, *Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src*. *Cardiovasc Pathol*, 2011. **20**(2): p. 71-6.
164. Ongusaha, P.P., et al., *p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop*. *EMBO J*, 2003. **22**(6): p. 1289-301.
165. Poudel, B., et al., *Induction of IL-12 production by the activation of discoidin domain receptor 2 via NF-kappaB and JNK pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **434**(3): p. 584-8.
166. Shintani, Y., et al., *Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(6): p. 1277-89.
167. Zhang, K., et al., *The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(6): p. 677-87.

168. Zhang, Y., et al., *An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(3): p. 604-17.
169. Suh, H.N. and H.J. Han, *Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through alpha2beta1 integrin- and DDR1-dependent Bmi-1*. J Cell Physiol, 2011. **226**(12): p. 3422-32.
170. Das, S., et al., *Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kappaB pathway activation*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8123-30.
171. Kim, H.G., et al., *DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 17672-81.
172. Clementz, A.G., et al., *Collagen XV inhibits epithelial to mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma cells*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72250.
173. Ikeda, K., et al., *Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 19206-12.
174. Iwai, L.K., et al., *Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild-type DDR2 and its lung cancer mutants*. Biochem J, 2013. **454**(3): p. 501-13.
175. Lemeer, S., et al., *Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1*. J Proteomics, 2012. **75**(12): p. 3465-77.
176. Vogel, W., et al., *Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5779-84.
177. Popova, S.N., et al., *Physiology and pathology of collagen receptors*. Acta Physiol (Oxf), 2007. **190**(3): p. 179-87.
178. Yeh, Y.C., C.Z. Wang, and M.J. Tang, *Discoidin domain receptor 1 activation suppresses alpha2beta1 integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity*. J Cell Physiol, 2009. **218**(1): p. 146-56.
179. Wang, C.Z., Y.M. Hsu, and M.J. Tang, *Function of discoidin domain receptor I in HGF-induced branching tubulogenesis of MDCK cells in collagen gel*. J Cell Physiol, 2005. **203**(1): p. 295-304.
180. Wang, C.Z., et al., *A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(6): p. 2839-52.
181. Neuhaus, B., et al., *Migration inhibition of mammary epithelial cells by Syk is blocked in the presence of DDR1 receptors*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(22): p. 3757-70.
182. Frehlick, L.J., J.M. Eirin-Lopez, and J. Ausio, *New insights into the nucleophosmin/nucleoplamin family of nuclear chaperones*. Bioessays, 2007. **29**(1): p. 49-59.
183. Borer, R.A., et al., *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm*. Cell, 1989. **56**(3): p. 379-90.
184. Lam, Y.W., L. Trinkle-Mulcahy, and A.I. Lamond, *The nucleolus*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 7): p. 1335-7.
185. Spector, D.L., R.L. Ochs, and H. Busch, *Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23*. Chromosoma, 1984. **90**(2): p. 139-48.
186. Grummitt, C.G., et al., *Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia*. J Biol Chem, 2008. **283**(34): p. 23326-32.
187. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features*. Blood, 2007. **109**(3): p. 874-85.
188. Wang, D., H. Umekawa, and M.O. Olson, *Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells*. Cell Mol Biol Res, 1993. **39**(1): p. 33-42.
189. Hingorani, K., A. Szebeni, and M.O. Olson, *Mapping the functional domains of nucleolar protein B23*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24451-7.

190. Grisendi, S., et al., *Nucleophosmin and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 493-505.
191. Herrera, J.E., et al., *Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23*. Biochemistry, 1996. **35**(8): p. 2668-73.
192. Chan, P.K. and F.Y. Chan, *Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1262**(1): p. 37-42.
193. Okuwaki, M., et al., *Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone*. FEBS Lett, 2001. **506**(3): p. 272-6.
194. Nishimura, Y., et al., *Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. **66**(10): p. 2239-42.
195. Tokuyama, Y., et al., *Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21529-37.
196. Negi, S.S. and M.O. Olson, *Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 17): p. 3676-85.
197. Tarapore, P., et al., *Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing*. FEBS Lett, 2006. **580**(2): p. 399-409.
198. Wang, W., et al., *Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 823-30.
199. Yu, Y., et al., *Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(10): p. 3798-809.
200. Fukuda, M., et al., *CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal*. Nature, 1997. **390**(6657): p. 308-11.
201. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
202. Kutay, U. and S. Guttinger, *Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(3): p. 121-4.
203. Dumber, T.S., G.A. Gentry, and M.O. Olson, *Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids*. Biochemistry, 1989. **28**(24): p. 9495-501.
204. Wang, D., et al., *The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end*. J Biol Chem, 1994. **269**(49): p. 30994-8.
205. Maggi, L.B., Jr., et al., *Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(23): p. 7050-65.
206. Herrera, J.E., R. Savkur, and M.O. Olson, *The ribonuclease activity of nucleolar protein B23*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(19): p. 3974-9.
207. Szebeni, A. and M.O. Olson, *Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities*. Protein Sci, 1999. **8**(4): p. 905-12.
208. Lee, S.Y., et al., *A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks*. Biochem J, 2005. **388**(Pt 1): p. 7-15.
209. Poletto, M., et al., *Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(10): p. 1641-52.
210. Okuda, M., et al., *Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication*. Cell, 2000. **103**(1): p. 127-40.
211. Budhu, A.S. and X.W. Wang, *Loading and unloading: orchestrating centrosome duplication and spindle assembly by Ran/Crm1*. Cell Cycle, 2005. **4**(11): p. 1510-4.
212. Grisendi, S., et al., *Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 147-53.
213. Ye, K., *Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(9): p. 918-23.
214. Kurki, S., K. Peltonen, and M. Laiho, *Nucleophosmin, HDM2 and p53: players in UV damage incited nucleolar stress response*. Cell Cycle, 2004. **3**(8): p. 976-9.

215. Oren, M., *Regulation of the p53 tumor suppressor protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36031-4.
216. Colombo, E., et al., *Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(7): p. 529-33.
217. Weber, H.O., et al., *Human p14(ARF)-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways*. Oncogene, 2002. **21**(20): p. 3207-12.
218. Colombo, E., et al., *Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(20): p. 8874-86.
219. Kuo, M.L., et al., *N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor*. Genes Dev, 2004. **18**(15): p. 1862-74.
220. Boissel, N., et al., *Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype*. Blood, 2005. **106**(10): p. 3618-20.
221. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
222. Schnittger, S., et al., *Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3733-9.
223. Suzuki, T., et al., *Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2854-61.
224. Thiede, C., et al., *Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2006. **107**(10): p. 4011-20.
225. Verhaak, R.G., et al., *Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3747-54.
226. Rau, R. and P. Brown, *Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity*. Hematol Oncol, 2009. **27**(4): p. 171-81.
227. Albiero, E., et al., *Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation*. Leukemia, 2007. **21**(5): p. 1099-103.
228. Mariano, A.R., et al., *Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal*. Oncogene, 2006. **25**(31): p. 4376-80.
229. Caudill, J.S., et al., *C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders*. Br J Haematol, 2006. **133**(6): p. 638-41.
230. Oki, Y., et al., *Mutations and promoter methylation status of NPM1 in myeloproliferative disorders*. Haematologica, 2006. **91**(8): p. 1147-8.
231. Zhang, Y., et al., *NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype*. Leuk Res, 2007. **31**(1): p. 109-11.
232. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?* Blood, 2011. **117**(4): p. 1109-20.
233. Falini, B., et al., *Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4514-23.
234. Chou, W.C., et al., *Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3310-6.
235. Kronke, J., et al., *Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group*. J Clin Oncol, 2011. **29**(19): p. 2709-16.
236. Papadaki, C., et al., *Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor*. Br J Haematol, 2009. **144**(4): p. 517-23.

237. Jain, P., et al., *Mutated NPM1 in patients with acute myeloid leukemia in remission and relapse*. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(6): p. 1337-44.
238. Schneider, F., et al., *NPM1 but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS)*. *Blood*, 2009. **113**(21): p. 5250-3.
239. Gallagher, R.E., *Dueling mutations in normal karyotype AML*. Vol. 106. 2005. 3681-3682.
240. Schneider, F., et al., *The FLT3ITD mRNA level has a high prognostic impact in NPM1 mutated, but not in NPM1 unmutated, AML with a normal karyotype*. *Blood*, 2012. **119**(19): p. 4383-6.
241. Lifson, J.D., D.T. Sasaki, and E.G. Engleman, *Utility of formaldehyde fixation for flow cytometry and inactivation of the AIDS associated retrovirus*. *J Immunol Methods*, 1986. **86**(1): p. 143-9.
242. Nin, D.S., et al., *Role of misfolded N-CoR mediated transcriptional deregulation of Flt3 in acute monocytic leukemia (AML)-M5 subtype*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e34501.
243. Blankenberg, D., et al., *Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2010. **Chapter 19**: p. Unit 19 10 1-21.
244. Giardine, B., et al., *Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis*. *Genome Res*, 2005. **15**(10): p. 1451-5.
245. Goecks, J., et al., *Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences*. *Genome Biol*, 2010. **11**(8): p. R86.
246. Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber, *HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data*. *Bioinformatics*, 2014.
247. Anders, S. and W. Huber, *Differential expression analysis for sequence count data*. *Genome Biol*, 2010. **11**(10): p. R106.
248. Li, Z., et al., *Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(9): p. 1172-81.
249. Smyth, G.K., *Limma: linear models for microarray data*. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, ed. C.V. In Gentleman R, Dudoit S, Irizarry R and Huber W (eds.). 2005, New York: Springer.
250. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. *Biostatistics*, 2003. **4**(2): p. 249-64.
251. Johnson, W.E., C. Li, and A. Rabinovic, *Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods*. *Biostatistics*, 2007. **8**(1): p. 118-27.
252. Carter, B.Z., et al., *Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5*. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3742-50.
253. Quentmeier, H., et al., *Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin*. *Leukemia*, 2005. **19**(10): p. 1760-7.
254. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells*. *Blood*, 1993. **82**(4): p. 1110-9.
255. Lyman, S.D., et al., *Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene*. *Oncogene*, 1993. **8**(4): p. 815-22.
256. Turner, A.M., et al., *FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells*. *Blood*, 1996. **88**(9): p. 3383-90.
257. Zarrinkar, P.P., et al., *AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML)*. *Blood*, 2009. **114**(14): p. 2984-92.
258. Smith, C.C., et al., *Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia*. *Nature*, 2012. **485**(7397): p. 260-3.
259. Kesarwani, M., E. Huber, and M. Azam, *Overcoming AC220 resistance of FLT3-ITD by SAR302503*. *Blood Cancer J*, 2013. **3**: p. e138.
260. Pauwels, D., B. Sweron, and J. Cools, *The N676D and G697R mutations in the kinase domain of FLT3 confer resistance to the inhibitor AC220*. *Haematologica*, 2012. **97**(11): p. 1773-4.

261. Kim, K.T., M. Levis, and D. Small, *Constitutively activated FLT3 phosphorylates BAD partially through pim-1*. *Br J Haematol*, 2006. **134**(5): p. 500-9.
262. Minami, Y., et al., *Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia*. *Blood*, 2003. **102**(8): p. 2969-75.
263. Spiekermann, K., et al., *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*, 2003. **101**(4): p. 1494-504.
264. Brunet, S., R. Martino, and J. Sierra, *Hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia with internal tandem duplication of FLT3 gene (FLT3/ITD)*. *Curr Opin Oncol*, 2013. **25**(2): p. 195-204.
265. Ozeki, K., et al., *Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1901-8.
266. Kiyoi, H., M. Yanada, and K. Ozekia, *Clinical significance of FLT3 in leukemia*. *Int J Hematol*, 2005. **82**(2): p. 85-92.
267. Ward, A.C., et al., *Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals*. *Leukemia*, 2000. **14**(6): p. 973-90.
268. Volpe, G., et al., *C/EBPalpha and MYB regulate FLT3 expression in AML*. *Leukemia*, 2013. **27**(7): p. 1487-96.
269. Lin, F.T., et al., *A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimetabolic activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(20): p. 9606-10.
270. Ossipow, V., P. Descombes, and U. Schibler, *CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(17): p. 8219-23.
271. Pabst, T. and B.U. Mueller, *Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(17): p. 5303-7.
272. Pabst, T., et al., *Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia*. *Nat Genet*, 2001. **27**(3): p. 263-70.
273. Greif, P.A., et al., *Somatic mutations in acute promyelocytic leukemia (APL) identified by exome sequencing*. *Leukemia*, 2011. **25**(9): p. 1519-22.
274. Stirewalt, D. and S. Meshinchi, *Receptor Tyrosine Kinase Alterations in AML – Biology and Therapy*, in *Acute Myelogenous Leukemia*, L. Nagarajan, Editor. 2010, Springer New York. p. 85-108.
275. Loriaux, M.M., et al., *High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2008. **111**(9): p. 4788-96.
276. Tomasson, M.H., et al., *Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2008. **111**(9): p. 4797-808.
277. Palacios, R., et al., *Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro*. *Nature*, 1984. **309**(5964): p. 126-31.
278. Warmuth, M., et al., *Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery*. *Curr Opin Oncol*, 2007. **19**(1): p. 55-60.
279. Vogel, W.F., R. Abdulhussein, and C.E. Ford, *Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function*. *Cell Signal*, 2006. **18**(8): p. 1108-16.
280. Xu, H., et al., *Discoidin domain receptors promote alpha1beta1- and alpha2beta1-integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e52209.
281. Day, E., et al., *Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **599**(1-3): p. 44-53.
282. Rix, U., et al., *Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets*. *Blood*, 2007. **110**(12): p. 4055-63.

283. Kim, H.G., et al., *Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(10): p. 2145-50.
284. Schnittger, S., et al., *Prognostic impact of FLT3-ITD load in NPM1 mutated acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2011. **25**(8): p. 1297-304.
285. Small, D., et al., *STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(2): p. 459-63.
286. Feuerstein, N., P.K. Chan, and J.J. Mond, *Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals*. J Biol Chem, 1988. **263**(22): p. 10608-12.
287. Feuerstein, N. and P.A. Randazzo, *In vivo and in vitro phosphorylation studies of numatrin, a cell cycle regulated nuclear protein, in insulin-stimulated NIH 3T3 HIR cells*. Exp Cell Res, 1991. **194**(2): p. 289-96.
288. Dergunova, N., et al., *A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes*. Immunol Lett, 2002. **83**(1): p. 67-72.
289. Bonetti, P., et al., *Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma*. J Cell Biol, 2008. **182**(1): p. 19-26.
290. Di Fiore, P.P., *Playing both sides: nucleophosmin between tumor suppression and oncogenesis*. J Cell Biol, 2008. **182**(1): p. 7-9.
291. Cheng, K., et al., *The cytoplasmic NPM mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3341-5.
292. Colombo, E., et al., *Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3044-50.
293. Moore, A.S., et al., *Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD+ acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a model for emerging clinical resistance patterns*. Leukemia, 2012. **26**(7): p. 1462-70.
294. Mallardo, M., et al., *NPMc+ and FLT3_ITD mutations cooperate in inducing acute leukaemia in a novel mouse model*. Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2248-51.
295. Li, J., et al., *Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells*. Leuk Res, 2005. **29**(12): p. 1415-23.
296. Marcucci, G., et al., *Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients*. J Clin Oncol, 2013. **31**(17): p. 2086-93.
297. Faraoni, I., et al., *miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(6): p. 497-505.
298. Georgantas, R.W., et al., *MicroRNA hsa-mir-155 Blocks Myeloid and Erythroid Differentiation of Human CD34+ Cells*. 48th ASH Annual Meeting 2006. **Abstract 1337**.
299. Georgantas, R.W., 3rd, et al., *CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p. 2750-5.
300. O'Connell, R.M., et al., *Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder*. J Exp Med, 2008. **205**(3): p. 585-94.
301. Eis, P.S., et al., *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3627-32.
302. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol, 2005. **207**(2): p. 243-9.
303. Metzler, M., et al., *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **39**(2): p. 167-9.
304. van den Berg, A., et al., *High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **37**(1): p. 20-8.

305. Fulci, V., et al., *Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4944-51.
306. Marton, S., et al., *Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis*. Leukemia, 2008. **22**(2): p. 330-8.
307. Garzon, R., et al., *Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3945-50.
308. Garzon, R., et al., *MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3183-9.
309. Huang, L., et al., *FLT3-ITD-associated gene-expression signatures in NPM1-mutated cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Int J Hematol, 2012. **96**(2): p. 234-40.
310. Jongen-Lavrencic, M., et al., *MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(10): p. 5078-85.
311. Whitman, S.P., et al., *FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. Blood, 2010. **116**(18): p. 3622-6.
312. Stirewalt, D.L., et al., *Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3724-6.
313. Kayser, S., et al., *Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome*. Blood, 2009. **114**(12): p. 2386-92.
314. Breitenbuecher, F., et al., *Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor*. Blood, 2009. **113**(17): p. 4074-7.
315. Kazi, J.U. and L. Ronnstrand, *Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) associates with FLT3 and negatively regulates downstream signaling*. Mol Oncol, 2013. **7**(3): p. 693-703.
316. Chang, T.P., et al., *Tumor suppressor HLJ1 binds and functionally alters nucleophosmin via activating enhancer binding protein 2alpha complex formation*. Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1656-67.
317. Ortlepp, C., et al., *Autotaxin is expressed in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia and hematopoietic stem cells and promotes cell migration and proliferation*. Exp Hematol, 2013. **41**(5): p. 444-461 e4.
318. Chi, H.T., et al., *Detection of exon 12 type A mutation of NPM1 gene in IMS-M2 cell line*. Leuk Res, 2010. **34**(2): p. 261-2.
319. Wang, C., et al., *Expression of a retinoic acid receptor gene in myeloid leukemia cells*. Leukemia, 1989. **3**(4): p. 264-9.
320. Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Lines FactsBook*. 2000, San Diego, CA: Academic Press.
321. Drexler, H.G., A.Y. Matsuo, and R.A. MacLeod, *Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research*. Leuk Res, 2000. **24**(11): p. 881-911.
322. Kawano-Yamamoto, C., et al., *Establishment and characterization of a new erythroblastic leukemia cell line, EEB: phosphatidylglucoside-mediated erythroid differentiation and apoptosis*. Leuk Res, 2006. **30**(7): p. 829-39.
323. Munker, R., et al., *Characterization of a new myeloid leukemia cell line with normal cytogenetics (CG-SH)*. Leuk Res, 2009. **33**(10): p. 1405-8.
324. Krupka, C., et al., *CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330*. Blood, 2014. **123**(3): p. 356-65.
325. Lee, B.H., et al., *FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia*. Cancer Cell, 2007. **12**(4): p. 367-80.

326. Sportoletti, P., et al., *Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3859-62.
327. Vassiliou, G.S., et al., *Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice*. Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 470-5.
328. Higuchi, M., et al., *Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 63-74.
329. Kelly, L.M., et al., *PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8283-8.
330. Tiacci, E., et al., *The NPM1 wild-type OCI-AML2 and the NPM1-mutated OCI-AML3 cell lines carry DNMT3A mutations*. Leukemia, 2012. **26**(3): p. 554-7.
331. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2010. **363**(25): p. 2424-33.
332. Yan, X.J., et al., *Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 309-15.
333. Holmes, M.L., et al., *Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment*. Genes Dev, 2006. **20**(8): p. 933-8.
334. Rolink, A.G., et al., *Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 603-6.
335. Leroy, H., et al., *CEBPA point mutations in hematological malignancies*. Leukemia, 2005. **19**(3): p. 329-34.
336. Benthous, T., et al., *Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2008. **143**(2): p. 230-9.
337. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., et al., *Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML*. Hematol J, 2003. **4**(1): p. 31-40.
338. Ramji, D.P. and P. Foka, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 3): p. 561-75.
339. Miao, L., et al., *Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition*. Med Oncol, 2013. **30**(3): p. 626.
340. Quan, J., et al., *Identification of receptor tyrosine kinase, discoidin domain receptor 1 (DDR1), as a potential biomarker for serous ovarian cancer*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(2): p. 971-82.
341. Valencia, K., et al., *Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces cell survival, homing, and colonization in lung cancer bone metastasis*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(4): p. 969-80.
342. Yang, S.H., et al., *Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas*. Oncol Rep, 2010. **24**(2): p. 311-9.
343. Ren, T., et al., *Increased expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2): a novel independent prognostic marker of worse outcome in breast cancer patients*. Med Oncol, 2013. **30**(1): p. 397.
344. L'Hote C, G., P.H. Thomas, and T.S. Ganesan, *Functional analysis of discoidin domain receptor 1: effect of adhesion on DDR1 phosphorylation*. FASEB J, 2002. **16**(2): p. 234-6.
345. Rikova, K., et al., *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1190-203.
346. Gu, T.L., et al., *Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15640.
347. Hammerman, P.S., et al., *Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer*. Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 78-89.
348. Davies, H., et al., *Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7591-5.

349. Ding, L., et al., *Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1069-75.
350. Baron, W., S.J. Shattil, and C. French-Constant, *The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of alpha(v)beta3 integrins*. EMBO J, 2002. **21**(8): p. 1957-66.
351. Comoglio, P.M., C. Boccaccio, and L. Trusolino, *Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 565-71.
352. Borges, E., Y. Jan, and E. Ruoslahti, *Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 39867-73.
353. Schneller, M., K. Vuori, and E. Ruoslahti, *Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF*. EMBO J, 1997. **16**(18): p. 5600-7.
354. Moro, L., et al., *Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6622-32.
355. Curat, C.A. and W.F. Vogel, *Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(11): p. 2648-56.
356. Ram, R., et al., *Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2*. J Neurooncol, 2006. **76**(3): p. 239-48.
357. Yoshida, D. and A. Teramoto, *Enhancement of pituitary adenoma cell invasion and adhesion is mediated by discoidin domain receptor-1*. J Neurooncol, 2007. **82**(1): p. 29-40.
358. Taherian, A., et al., *Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 293.
359. Glass, D.J., et al., *Agrin acts via a MuSK receptor complex*. Cell, 1996. **85**(4): p. 513-23.
360. Sturani, E., et al., *Kinetics and regulation of the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor in intact A431 cells*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(3): p. 1345-51.
361. Downing, J.R., C.W. Rettenmier, and C.J. Sherr, *Ligand-induced tyrosine kinase activity of the colony-stimulating factor 1 receptor in a murine macrophage cell line*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(4): p. 1795-9.
362. Phan, T.N., et al., *Low stability and a conserved N-glycosylation site are associated with regulation of the discoidin domain receptor family by glucose via post-translational N-glycosylation*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(9): p. 1907-16.
363. Fu, H.L., et al., *Glycosylation at Asn211 regulates the activation state of the discoidin domain receptor 1 (DDR1)*. J Biol Chem, 2014. **289**(13): p. 9275-87.
364. Yang, K., et al., *Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular autophosphorylation and Shc signaling complex formation*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39058-66.
365. Mihai, C., et al., *Mapping of DDR1 distribution and oligomerization on the cell surface by FRET microscopy*. J Mol Biol, 2009. **385**(2): p. 432-45.
366. Murphy, J.E., et al., *Endosomes: a legitimate platform for the signaling train*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17615-22.
367. von Zastrow, M. and A. Sorkin, *Signaling on the endocytic pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(4): p. 436-45.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Klasse III und Klasse XIII der Rezeptortyrosinkinasen.	4
Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung verschiedener <i>FLT3</i> -ITDs.	6
Abbildung 3: Darstellung verschiedener Allelverhältnisse von <i>FLT3</i> -ITD zu <i>FLT3</i> -WT.	7
Abbildung 4: Interaktion von DDR1 und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin bei der intrazellulären Signaltransduktion nach Aktivierung durch Kollagen.	10
Abbildung 5: Aufbau und funktionelle Domänen des wildtypischen <i>NPM1</i>	11
Abbildung 6: Einfluss der <i>FLT3</i> -ITD-Last auf das Gesamtüberleben (A) und das Rezidiv-freie Überleben (B) bei NK-AML-Patienten mit mutiertem bzw. wildtypischem <i>NPM1</i>	14
Abbildung 7: Vektorkarten der im Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendeter Vektoren.	47
Abbildung 8: Biolumineszierende Reaktionen, katalysiert von der <i>firefly</i> - und <i>Renilla</i> -Luciferase.	48
Abbildung 9: Beispiele von Elektropherogrammen von Fragmentlängenanalyse nach <i>FLT3</i> -ITD spezifischer PCR.	62
Abbildung 10: Arbeitsablauf zum Aufbau des OCI-AML3 Modellsystems.	69
Abbildung 11: ITD/WT-Verhältnis der monoklonalen OCI-AML3 <i>FLT3</i> -ITD Zelllinien.	70
Abbildung 12: Bestätigung der <i>NPM1</i> -Mutation A in nativen OCI-AML3 und den transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien.	71
Abbildung 13: Oberflächenexpression des <i>FLT3</i> -Rezeptors (A) und Nachweis der <i>FLT3</i> -Proteinexpression (B).	72
Abbildung 14: Änderung der Phosphorylierung von <i>FLT3</i> nach Stimulation nativer OCI-AML3 und der transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien mit FL.	73
Abbildung 15: Aktivierung von <i>STAT5</i> in <i>FLT3</i> -NPOS exprimierenden OCI-AML3 Zellen.	74
Abbildung 16: Konstantes ITD/WT-Verhältnis der monoklonalen OCI-AML3 <i>FLT3</i> -ITD Zelllinien und der polyklonalen OCI-AML3 <i>FLT3</i> -NPOS Zellen.	76
Abbildung 17: 72-Stunden-Proliferation nativer OCI-AML3 und der transgenen, poly- sowie monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien.	77
Abbildung 18: Versuchsaufbau der kompetitiven Langzeitproliferation von nativen OCI-AML3 versus der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien.	78
Abbildung 19: Wöchentliche Zunahme des prozentualen Anteils der OCI-AML3 <i>FLT3</i> -NPOS Zellen an der Gesamtmenge der Zellen in Mischungen mit nativen OCI-AML3.	79
Abbildung 20: Kompetitive Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 mit transgenen, polyklonalen OCI-AML3 Zelllinien.	80
Abbildung 21: Zunahme des kompetitiven Wachstumsvorteils der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 <i>FLT3</i> -ITD Zelllinien gegenüber nativen OCI-AML3 mit steigendem ITD/WT-Verhältnis.	81
Abbildung 22: Kompetitives Wachstumsverhalten der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 <i>FLT3</i> -ITD Zelllinien gegenüber nativen OCI-AML3 bei ständiger Anwesenheit des <i>FLT3</i> -Inhibitors AC220.	82
Abbildung 23: Versuchsaufbau der kompetitiven Langzeitproliferation von nativen OCI-AML3 versus polyklonaler OCI-AML3 <i>FLT3</i> -NPOS Zellen <i>in vivo</i>	84
Abbildung 24: Kompetitiver Wachstumsvorteil der polyklonalen OCI-AML3 <i>FLT3</i> -NPOS Zellen gegenüber nativen OCI-AML3 <i>in vivo</i>	85
Abbildung 25: Heatmap der 50 signifikantesten differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses in <i>NPM1</i> -mutierten AML-Patienten mit normalem Karyotyp.	87

Abbildung 26: Heatmap aller signifikanten Gene vor Adjustierung der p-Werte bei der Genexpressionsanalyse der monoklonalen OCI-AML3 FLT3-ITD Zelllinien.....	89
Abbildung 27: <i>Flt3</i> -Promotoraktivität in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors PAX5 oder MYB in HEK-293T.	92
Abbildung 28: Expressionsnachweis der Transkriptionsfaktoren PAX5 und MYB in HEK-293T.	93
Abbildung 29: Überprüfung der endogenen PAX5- und MYB-Expression von HEK-293T.	94
Abbildung 30: <i>Flt3</i> -Promotoraktivität in Anwesenheit des wildtypischen oder mutierten Transkriptionsfaktors CEBPA oder der p30 Isoform in HEK-293T.	95
Abbildung 31: Expressionsnachweis von CEBPA-WT, CEBPA p30 und CEBPA Q311P im Zytosol und Zellkern von HEK-293T.	96
Abbildung 32: Quantitativer Expressionsnachweis von CEBPA-WT, CEBPA p30 und CEBPA Q311P in HEK-293T.	96
Abbildung 33: Oberflächenexpression des DDR1-Rezeptors in Ba/F3 (A) und Nachweis der DDR1- und DDR2-Proteinexpression in Ba/F3.	98
Abbildung 34: Wachstumsverhalten der DDR1- und DDR2-exprimierender Ba/F3 mit und ohne Kollagen.....	99
Abbildung 35: Wachstumsverhalten der DDR1- und DDR2-exprimierenden Ba/F3 bei langsamem IL-3 Entzug.	100
Abbildung 36: Nachweis der DDR1- und DDR2-Proteinexpression in HEK-293T.....	101
Abbildung 37: Zeitkinetik der DDR1- und DDR2-Phosphorylierung in HEK-293T.....	102
Abbildung 38: Quantifizierung der relativen Phosphorylierung der wildtypischen und mutierten DDR1- bzw. DDR2-Rezeptoren bei Stimulation mit Kollagen.....	103
Abbildung 39: Adhäsionsverhalten der nativen und transgenen Ba/F3 in Anwesenheit von Kollagen.	105
Abbildung 40: <i>DDR1</i> - bzw. <i>DDR2</i> -Expressionlevel in AML-Patienten.....	107
Abbildung 41: Lokalisation der in AML-Patienten gefundenen <i>DDR1</i> - und <i>DDR2</i> -Mutationen.....	123

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prognostische Risikogruppen nach der ELN-Klassifikation.....	2
Tabelle 2: Die häufigsten <i>NPM1</i> -Mutationen.....	12
Tabelle 3: Verwendete Laborausstattung.....	16
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien.....	18
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 7: Verwendete Kits.....	22
Tabelle 8: Verwendete Plasmide.....	23
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide.....	25
Tabelle 10: Verwendete Enzyme.....	29
Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB).....	29
Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB) ..	31
Tabelle 13: Verwendete Bakterienstämme.....	31
Tabelle 14: Verwendete Zelllinien.....	31
Tabelle 15: Verwendete Zusätze für Zell- und Bakterienkultur.....	32
Tabelle 16: Verwendete Nährmedien für Bakterienkultur.....	32
Tabelle 17: Verwendete Kulturmedien für Zellkultur.....	33
Tabelle 18: Verwendete Inhibitoren und Zytostatika.....	34
Tabelle 19: Verwendete Software und Datenbanken.....	34
Tabelle 20: Immunphänotyp vor und nach der lentiviralen Transduktion der OCI-AML3.....	75
Tabelle 21: Übersicht über alle untersuchten Mischungen und deren Verhältnisse im Rahmen der kompetitiven Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 versus der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien.....	78
Tabelle 22: Übersicht über alle untersuchten Mischungen und deren Verhältnisse im Rahmen der kompetitiven Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 versus der transgenen, polyklonalen oder monoklonalen OCI-AML3 Zelllinien mit AC220.....	82
Tabelle 23: Übersicht über alle <i>in vivo</i> untersuchten Mischungen und deren Verhältnisse im Rahmen der kompetitiven Langzeitproliferation nativer OCI-AML3 versus polyklonaler OCI-AML3 FLT3-NPOS Zellen.....	84
Tabelle 24: Liste der verwendeten Substanzen und Konzentrationen.....	86
Tabelle 25: Liste der differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit des ITD/WT-Verhältnisses bei <i>NPM1</i> -mutierten AML-Patienten mit normalem Karyotyp.....	88
Tabelle 26: Liste der differentiell exprimierten Gene bei Vergleich der OCI-AML3 FLT3-ITD-high mit den OCI-AML3 FLT3-ITD-low Zelllinien.....	89
Tabelle 27: Bisher bekannte Fälle von AML-Patienten mit einer <i>DDR1</i> - oder <i>DDR2</i> -Mutation.....	122

9.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin; Alanin
aa	Aminosäuren
abnl	abnormal
ACTR6	engl. „ <i>ARP6 actin-related protein 6 homolog</i> “
ad	auffüllen auf
adj.	adjustiert
ADK	engl. „ <i>adenosine kinase</i> “
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AHSP	engl. „ <i>alpha hemoglobin stabilizing protein</i> “
AKT; Akt	Proteinkinase B
AIF1L	engl. „ <i>allograft inflammatory factor 1-like</i> “
ALAS2	engl. „ <i>5^L-aminolevulinat synthase 2</i> “
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMLCG	engl. „ <i>Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group</i> “
AML1 = RUNX1	engl. „ <i>acute myeloid leukemia 1</i> “
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenzgen
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
APL	akute Promyelozytenleukämie
APS	Ammoniumpersulfat; Ammoniumperoxidsulfat
ARF	engl. „ <i>alternate reading frame</i> “
Asn	Asparagin
ATCC	engl. „ <i>American Type Culture Collection</i> “
ATP	Adenosintriphosphat
AXI	Ampicillin, X-Gal, IPTG
AXIN1	engl. „ <i>axin 1</i> “
α	Anti; Alpha
BCAT1	engl. „ <i>branched chain amino-acid transaminase 1</i> “
Bcl-xL	Mitglied der „ <i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i> “ Proteinfamilie
BCR-ABL	engl. „ <i>Breakpoint Cluster Region-Abelson</i> “
BCYRN1	engl. „ <i>brain cytoplasmic RNA 1</i> “
BGH	engl. „ <i>bovine growth hormone</i> “
BIVM	engl. „ <i>basic, immunoglobulin-like variable motif containing</i> “
Bmi-1	engl. „ <i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i> “
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	engl. „ <i>basic Leucin-Zipper</i> “
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin; Cystein; Carboxy-
C3orf58	engl. „ <i>chromosome 3 open reading frame 58</i> “

C13orf27	engl. „ <i>chromosome 13 open reading frame 27</i> “
Ca	Calcium
CABLES1	engl. „ <i>Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) and Abl (Abelson) enzyme substrate 1</i> “
CA1	engl. „ <i>carbonic anhydrase I</i> “
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBF	engl. „ <i>core binding factor</i> “
CBFB	engl. „ <i>core binding factor, beta subunit</i> “
CD	engl. „ <i>cluster of differentiation</i> “
Cdc42	engl. „ <i>cell division cycle 42</i> “
CDFs	engl. „ <i>chip definition files</i> “
cDNA	komplementäre DNA
CEBPA	engl. „ <i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i> “
CFH	engl. „ <i>complement factor H</i> “
CIP	Alkalische Phosphatase, <i>Calf Intestinal</i>
c-KIT = KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CLU	engl. „ <i>clusterin</i> “
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
c-Myc	engl. „ <i>myelocytomatosis oncogene</i> “
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMMD7	engl. „ <i>COMM domain containing 7</i> “
copGFP	engl. „ <i>copepod green fluorescent protein</i> “
COX-2	Cyclooxygenase-2
Crk2	engl. „ <i>CT10-related kinase 2</i> “
CRM1	engl. „ <i>chromosome region maintenance 1 homolog</i> “
CSF1R	engl. „ <i>colony stimulating factor 1 receptor</i> “
Csk	engl. „ <i>c-src tyrosine kinase</i> “
c-Src	engl. „ <i>cellular; sarcoma</i> “; Kinase der Src-Familie
CTSC	engl. „ <i>cathepsin C</i> “
CXCL3	engl. „ <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i> “
cy	zytoplasmatisch
CYTL	engl. „ <i>cytokine-like 1</i> “
Cy7	Cyanin 7
D	Asparaginsäure
<i>dam</i>	engl. „ <i>DNA adenine methylase</i> “
DAPK1	engl. „ <i>death-associated protein kinase 1</i> “
DAPL1	engl. „ <i>death associated protein-like 1</i> “
DDR(s)	engl. „ <i>discoidin domain receptor(s)</i> “
DDR1	engl. „ <i>discoidin domain receptor tyrosine kinase 1</i> “
DDR1a	DDR1 Isoform a

DDR1b	DDR1 Isoform b
DDR2	engl. „ <i>discoidin domain receptor tyrosine kinase 2</i> “
DEK	DEK Proto-Onkogen
del	Deletion
d.h.	das heißt
Dipl.-Math.	Diplom-Mathematiker/in
DLR	Dual-Luciferase® Reporter
DMEM	engl. „ <i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	engl. „ <i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha</i> “
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOCK1	engl. „ <i>dedicator of cytokinesis 1</i> “
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dT	Desoxythymidine
E	Glutaminsäure
EB	engl. „ <i>elution buffer</i> “
ECL	engl. „ <i>enhanced chemiluminescence</i> “
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA-2Na-2H ₂ O = Na ₂ EDTA	Titriplex® III
EF1	engl. „ <i>elongation factor 1α</i> “
EGFR	engl. „ <i>epidermal growth factor receptor</i> “
EGR1	engl. „ <i>early growth response 1</i> “
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	engl. „ <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> “
ELN	engl. „ <i>European LeukemiaNet</i> “
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
engl.	Englisch
ENPP2	engl. „ <i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i> “
EPB42	engl. „ <i>erythrocyte membrane protein band 4.2</i> “
Erk1/2	engl. „ <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> “
<i>et al.</i>	und andere
ETO = RUNX1T1	engl. „ <i>eight twenty one</i> “
e.V.	eingetragener Verein
EVI1	engl. „ <i>ecotropic virus integration site 1 protein homolog</i> “
EYFP	engl. „ <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> “
F	Durchflusszytometrie; Phenylalanin; prozentualer Anteil GFP-positiver Zellen
FAB	engl. „ <i>French-American-British</i> “
FACS	engl. „ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “
FAIM	engl. „ <i>Fas apoptotic inhibitory molecule</i> “
FAK	engl. „ <i>Focal adhesion kinase</i> “
FAM92A1	engl. „ <i>family with sequence similarity 92, member A1</i> “

FC	engl. „ <i>Fold Change</i> “
FHL1	engl. „ <i>four and a half LIM (Lin11, Isl-1, Mec-3) domains 1</i> “
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FL	FLT3-Ligand
FLT3; Flt3	engl. „ <i>FMS-related tyrosine kinase 3</i> “
FLT3-ITD(s)	„ <i>internal tandem duplication(s)</i> “ in der juxtamembranösen Domäne von FLT3
FLT3-TKD(s)	Punktmutation(en) in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinase-domäne von FLT3
FL-2	Fluoreszenzkanal 2
FL-3	Fluoreszenzkanal 3
FMS	engl. „ <i>fibroblast-macrophage stimulating factor receptor</i> “
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
fwd; FW; fw; F	engl. „ <i>forward</i> “
Fyn	Kinase der Src-Familie
f1 ori	phagenbasierter Replikationsursprung (engl. „ <i>origin of replication</i> “)
G	Guanin; Glycin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GAPDH	engl. „ <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> “
GAS2	engl. „ <i>growth arrest-specific 2</i> “
GEP	Genexpressionsprofil
GFP	engl. „ <i>green fluorescent protein</i> “
ggf.	gegebenenfalls
Gli-1	engl. „ <i>glioma-associated oncogene family zinc finger 1</i> “
Gln	Glutamin
GOLGA8A	engl. „ <i>golgin A8 family, member A</i> “
GOLGA8B	engl. „ <i>golgin A8 family, member B</i> “
GPR56	engl. „ <i>G protein-coupled receptor 56</i> “
GPR114	engl. „ <i>G protein-coupled receptor 114</i> “
GUCY1A3	engl. „ <i>guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3</i> “
h	Stunde
H19	engl. „ <i>H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)</i> “
HBA1	engl. „ <i>hemoglobin, alpha 1</i> “
HBA2	engl. „ <i>hemoglobin, alpha 2</i> “
HBM	engl. „ <i>hemoglobin, mu</i> “
HBS	engl. „ <i>hepes-buffered saline solution</i> “
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
Hes1	engl. „ <i>hairy and enhancer of split-1</i> “
HF	engl. „ <i>high fidelity</i> “
HIST1H3D	engl. „ <i>histone cluster 1, H3d</i> “
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HIV-1	Virenstamm des HIV

HIV-2	Virenstamm des HIV
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. „ <i>horseradish peroxidase</i> “)
I	Isoleucin
IDH1	engl. „ <i>isocitrate dehydrogenase 1</i> “
IDH2	engl. „ <i>isocitrate dehydrogenase 2</i> “
Ig	Immunglobulin
IL-3	Interleukin-3
IL-8	Interleukin-8
INK4a	engl. „ <i>inhibitor of CDK4</i> “
inv	Inversion
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
ITD	engl. „ <i>internal tandem duplication</i> “
ITD/WT (-Verhältnis)	(Allel-) Verhältnis von FLT3-ITD zu FLT3-WT
i.v.	intravenös
JM	juxtamembranös
JNK1	engl. „ <i>c-Jun N-terminal protein kinase 1</i> “
K	Lysin; Kilo; Konstante
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KCM	KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂
kDa	Kilodalton
KDEL1	engl. „ <i>KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1</i> “
kg	Kilogramm
KIAA0125	KIAA0125
KIT = c-KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
L	Leucin
l	Liter
LAPTM4B	engl. „ <i>lysosomal protein transmembrane 4 beta</i> “
LARII	engl. „ <i>Luciferase Assay Reagent II</i> “
LB	engl. „ <i>lysogeny broth</i> “
LM	Längenmutation(en)
LOC401097	LOC401097
log	Logarithmus
LTR	engl. „ <i>long terminal repeat</i> “
luc+	<i>firefly</i> -Luciferasegen
Lyn	Kinase der Src-Familie
M	Methionin; Molar (mol/l); Marker
mA	Milliampere
MAGED1	engl. „ <i>melanoma antigen family D, 1</i> “
MAPK	engl. „ <i>mitogen-activated protein kinase</i> “
MCS	engl. „ <i>multiple cloning site</i> “
MDCK	engl. „ <i>Madin Darby canine kidney</i> “

MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEM α	engl. „ <i>Minimum Essential Medium α</i> “
MFI	engl. „ <i>median fluorescence intensity</i> “
Mg; Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
miRNA	microRNA
MIR155HG	engl. „ <i>MIR155 host gene (non-protein coding)</i> “
miR-155	microRNA-155
MIY	pMSCV-IRES-EYFP
ml	Milliliter
MLL	engl. „ <i>mixed lineage leukemia</i> “
MLLT3	engl. „ <i>mixed lineage leukemia, translocated to, 3</i> “
mM	Millimolar
MMP2	engl. „ <i>matrix metalloproteinase 2</i> “
MnCl ₂	Mangandichlorid
mol	Mol
MPO	Myeloperoxidase
MRC1	engl. „ <i>mannose receptor, C type 1</i> “
mRNA	engl. „ <i>messenger RNA</i> “
MSCV	engl. „ <i>murine stem cell virus</i> “
Mut	Mutagenese
MYB	engl. „ <i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog</i> “
MYC	engl. „ <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> “
MYH11	engl. „ <i>myosin, heavy chain 11</i> “
MYO5C	engl. „ <i>myosin VC</i> “
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
N	Asparagin; Amino-
n	Anzahl
N/A	nicht annotiert
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ EDTA = EDTA-2Na-2H ₂ O	Titriplex® III
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
Na ₄ P ₂ O ₇ x10H ₂ O	Tetranatriumdiphosphat
Nck1	engl. „ <i>non-catalytic region of tyrosine kinase adapter protein 1</i> “
Nck2	engl. „ <i>non-catalytic region of tyrosine kinase adapter protein 2</i> “
NES	nukleäres Exportsignal
NF κ B	engl. „ <i>nuclear factor-kappaB</i> “
ng	Nanogramm

NK-AML	akute myeloische Leukämie mit normalem Karyotyp
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NOD/SCID	engl. „ <i>Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i> “
NPMc+ = NPM1c+	engl. „ <i>NPM-cytoplasmic positive</i> “
NPM1	Nukleophosmin
NPTX2	engl. „ <i>neuronal pentraxin II</i> “
Nr.	Nummer
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NSG	NOD scid gamma
NuLS	nukleoläres Lokalisationssignal
NUP214	engl. „ <i>nucleoporin 214 kDa</i> “
NYNRIN	engl. „ <i>NYN domain and retroviral integrase containing</i> “
NZY ⁺	engl. „ <i>NZ amine, yeast extract</i> “
O ₂	Sauerstoff
OBFC1	engl. „ <i>oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1</i> “
OD	optische Dichte
ori	Replikationsursprung (engl. „ <i>origin of replication</i> “)
OS	Gesamtüberleben (engl. „ <i>overall survival</i> “)
OV	Natriumorthovanadat
P	Prolin
p	Phospho-; Plasmid; engl. „ <i>probability</i> “ (p-Wert)
p53	Tumorsuppressor p53 (p: Protein, 53 kDa)
p130CAS	engl. „ <i>Crk-associated substrate</i> “
PAX5	engl. „ <i>paired box 5</i> “
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCDH	pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP
pcDNA3.1	pcDNA3.1/Zeo ⁽⁺⁾
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	engl. „ <i>platelet-derived growth factor receptor</i> “
PDGFRA	engl. „ <i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i> “
PDGFRB	engl. „ <i>platelet-derived growth factor receptor beta</i> “
PDLIM1	engl. „ <i>PDZ and LIM (Lin11, Isl-1, Mec-3) domain 1</i> “
PDZ	engl. „ <i>PSD95/SAP90 (Post synaptic density), Discs large, Zonula occludentes-1</i> “
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHYH	engl. „ <i>phytanoyl-CoA 2-hydroxylase</i> “
PI	Propidiumiodid
PI3K; PI3-K	engl. „ <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i> “
PIK3C2A	engl. „ <i>phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2α</i> “

Pim-1	engl. „ <i>proviral integration site 1</i> “
PLCL2	engl. „ <i>phospholipase C-like 2</i> “
PLC- γ 1	engl. „ <i>phospholipase C, gamma 1</i> “
PML	engl. „ <i>promyelocytic leukemia</i> “
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Pyrophosphate
Pro	Prolin
pStat1	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 1</i> “, phosphoryliert
pStat3	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> “, phosphoryliert
pSyk	engl. „ <i>spleen tyrosine kinase</i> “, phosphoryliert
PTB	engl. „ <i>phosphotyrosine-binding</i> “
PTP4A3	engl. „ <i>protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3</i> “
Pyk2	engl. „ <i>protein tyrosine kinase 2 beta</i> “
P2RY14	engl. „ <i>purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14</i> “
Q	Glutamin
R	Arginin
RAB38	engl. „ <i>RAB38, member RAS oncogene family</i> “
RARA	engl. „ <i>retinoic acid receptor alpha</i> “
RAS; Ras	engl. „ <i>Rat sarcoma</i> “
RB1	engl. „ <i>retinoblastoma 1</i> “
rcf	engl. „ <i>relative centrifugal force</i> “
rev; RV; REV; R	engl. „ <i>reverse</i> “
RFS	Rezidiv-freies Überleben (engl. „ <i>relapse-free survival</i> “)
RFTN1	engl. „ <i>raftlin, lipid raft linker 1</i> “
Rluc	Renilla-Luciferasegen
RMA	engl. „ <i>Robust Multichip Average</i> “
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROI	engl. „ <i>region of interest</i> “
ROX	X-Rhodamin
rpm	engl. „ <i>rounds per minute</i> “
RPMI 1640	engl. „ <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> “
RPN1	engl. „ <i>ribophorin 1</i> “
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
RTKs	Rezeptortyrosinkinasen
RUNX1 = AML1	engl. „ <i>runt-related transcription factor 1</i> “
RUNX1T1 = ETO	engl. „ <i>runt-related transcription factor 1; translocated to, 1</i> “
S	Serin; Anzahl der Schnittstellen
s	Sekunden
S1	Sicherheitsstufe 1
S2	Sicherheitsstufe 2
SCN9A	engl. „ <i>sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit</i> “

SDS-PAGE	engl. „ <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> “
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELENBP1	engl. „ <i>selenium binding protein 1</i> “
Sequ; Seq; SEQ	Sequenzierung
Ser	Serin
Shc	engl. „ <i>Src homology 2 domain containing</i> “
Shc1 = ShcA	engl. „ <i>Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i> “
ShcA = Shc1	engl. „ <i>Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i> “
SHIP-1	engl. „ <i>SH2 (Src homolgy 2)-domain-containing inositol phosphatase 1</i> “
SHIP-2	engl. „ <i>SH2 (Src homolgy 2)-domain-containing inositol phosphatase 2</i> “
SHP-1	engl. „ <i>Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1</i> “
SHP-2	engl. „ <i>Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2</i> “
SH2	engl. „ <i>Src homology 2</i> “
SH3	engl. „ <i>Src homology 3</i> “
SLC4A1	engl. „ <i>solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1</i> “
SLC6A8	engl. „ <i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 8</i> “
SNAP47	engl. „ <i>synaptosomal-associated protein, 47kDa</i> “
SNP	engl. „ <i>single nucleotide polymorphism</i> “
S.O.C.	engl. „ <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> “
SOCS2	engl. „ <i>suppressor of cytokine signaling 2</i> “
Src	engl. „ <i>sarcoma</i> “
ST7	engl. „ <i>suppression of tumorigenicity 7</i> “
STATs	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription</i> “
STAT1a	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 1</i> “
STAT1b	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 1b</i> “
STAT3	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> “
STAT5; Stat5	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 5</i> “
STAT5a	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 5A</i> “
STAT5b	engl. „ <i>signal transducer and activator of transcription 5B</i> “
SV40	Simian-Virus 40
T	Thymin; Threonin, Virustiter
t	Translokation; Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	engl. „ <i>transformation buffer</i> “
TBS	engl. „ <i>Tris buffered saline</i> “
TBST	engl. „ <i>Tris buffered saline and Tween 20</i> “
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TET2	engl. „ <i>tet methylcytosine dioxygenase 2</i> “
TF	Transkriptionsfaktoren
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestellen

Thr	Threonin
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TKIs	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TM	transmembranös
T _m	Schmelztemperatur
TM4SF1	engl. „ <i>transmembrane 4 L six family member 1</i> “
TOM1L1	engl. „ <i>target of myb1 (chicken)-like 1</i> “
TRBV27	engl. „ <i>T cell receptor beta variable 27</i> “
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	engl. „ <i>technical unit</i> “
TUBB2A	engl. „ <i>tubulin, beta 2A class IIa</i> “
TV	Transkriptionsvariante
Tyr	Tyrosin
T2A	engl. „ <i>Thosea asigna virus 2A</i> “
U	engl. „ <i>enzyme unit</i> “
UCSC	University of California, Santa Cruz
UV	Ultraviolett
V	Valin; Volt; Volumen; Verdünnungsfaktor
v	variabel
Vav1	engl. „ <i>vav 1 guanine nucleotide exchange factor</i> “
Vav2	engl. „ <i>vav 2 guanine nucleotide exchange factor</i> “
VEGFR	engl. „ <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> “
VP	Verpackungsplasmide
W	Tryptophan
WB	Western Blot
WHO	engl. „ <i>World Health Organization</i> “
WT	Wildtyp
X-ChIP	engl. „ <i>cross-linked Chromatin Immunoprecipitation</i> “
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Y	Tyrosin
Yes	Kinase der Src-Familie
Z	Zellzahl zum Infektionszeitpunkt
z.B.	zum Beispiel
Zeo	Zeocin
ZMYND12	engl. „ <i>zinc finger, MYND-type (myeloid, Nery, and DEAF-1) containing 12</i> “
ZNS	zentrales Nervensystem
6FAM	6-Carboxyfluorescein
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
7.1	NG2-Antigen (engl. „ <i>neural/glial antigen 2</i> “)
°C	Grad Celcius
%	Prozent
Σ	Summe

10 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Karsten Spiekermann für die Möglichkeit bedanken, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich möchte mich insbesondere für seine Betreuung, seine Unterstützung, den wissenschaftlichen Rat und die Korrektur dieser Arbeit bei ihm bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Irmela Jeremias und ihrer Arbeitsgruppe, die durch ihre enge Kooperation zum Gelingen der Etablierung des Zellmodells beigetragen hat und die Durchführung der *in vivo* Versuche ermöglicht hat. Dank sagen möchte ich auch meinen Kooperationspartnern Dr. Helmut Blum, Dipl.-Math. Vindi Jurinovic und Dr. Tobias Herold für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Genexpressionanalysen. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors für Leukämiediagnostik des Klinikums der Universität München, allen voran Bianka und Evelyn, für ihre methodische Unterstützung sehr bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an meine aktuellen sowie ehemaligen Laborkollegen Anna, Belay, Daniel, Diana, Hanna, Harald, Judith H., Judith L., Julia B., Julia G., Jutta, Nadine, Sayan, Steffi und Werner für die freundschaftliche Atmosphäre, hervorragende gegenseitige Unterstützung im Labor und gemeinsamen Aktivitäten außerhalb der Arbeit. Ebenso danke ich allen Kollegen der KKG „Leukämie“, der AG Jeremias und AG Eick für die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, das angenehme Arbeitsklima und Miteinander.

Gebührend danken möchte ich Nadine, Hans und Wolfgang für das geduldige Lesen, Korrigieren und Diskutieren über diese Seiten.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Freunde und Familie richten, die mich in den letzten Jahren unterstützt und motiviert haben.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank Steffen, der mich wie kein anderer während dieser Arbeit unterstützt hat und stets geduldig zur Seite stand.