

Untersuchung der Rolle von FLT3
Mutanten in der akuten
lymphoblastischen Leukämie mit Hilfe
eines *in vivo* Modells in *Mus musculus*
(Linnaeus, 1758)



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am
Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Diplom-Biologin Anneke Nina Werk, geb. Lehmann

geboren in Buxtehude

Hamburg, Januar 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. T. DOBNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. B. FEHSE
Tag der Disputation: 11. Dezember 2009

Hamburg, den 27. November 2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Dissertation eingereicht am: 08.10.2009
Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner
Zweitgutachter: Prof. Dr. Boris Fehse
Betreuer: Dr. Carol Stocking
Disputation: 11.12.2009 im Department Biologie /
Biozentrum Klein Flottbek / Uni HH

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	11
Zusammenfassung.....	12
1 Einleitung	14
1.1 Hämatopoese.....	14
1.2 Die B-Zellentwicklung.....	16
1.2.1 Entwicklung des Prä-B Zell- und des B-Zell-Rezeptors	18
1.2.2 Signaltransduktion des Prä-B Zell Rezeptors	20
1.3 Rolle des Interleukin 7- und des FLT3 Rezeptors in der frühen B-Zellentwicklung	22
1.3.1 Der Interleukin 7 Rezeptor (IL7R).....	23
1.3.2 Der FLT3-Rezeptor	26
1.4 Leukämie	30
1.5 Aktivierende FLT3 Mutationen in Leukämien.....	35
1.6 Fragestellung	38
2 Material und Methoden	39
2.1 Material	39
2.1.1 Geräte.....	39
2.1.2 Kits.....	40
2.1.3 Oligonukleotide und Enzyme.....	40
2.1.4 Medien	42
2.1.5 Bakterienstämme	44
2.1.6 Mausstämme.....	44
2.1.7 Zellen	44
2.1.8 Puffer	45
2.1.9 Antikörper und Inhibitoren	47
2.1.10 Plasmide	49

2.2	Methoden	50
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	50
2.2.2	Mausversuche.....	54
2.2.3	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	56
2.2.4	Nukleinsäure-analytische Methoden.....	58
2.2.5	Southern Blot Analyse.....	63
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden – Western Blot Analyse.....	65
3	Ergebnisse	68
3.1	Die FLT3-ITD Tumorzellen sind retransplantierbar	68
3.2	Analyse der für die FLT3-ITD Tumorzellen wichtigen Signalwege	70
3.3	FLT3-ITD Tumorzellen ließen sich in Methylzellulose supplementiert mit murinem IL7 aber nicht in Flüssigkultur kultivieren	72
3.4	Inhibition von verschiedenen Signalwegen in FLT3-ITD Tumorzellen.....	75
3.4.1	Spezifität der Inhibitoren.....	75
3.4.2	Einfluss der Inhibition verschiedener Signalwege auf die Proliferation und Apoptose der FLT3-ITD B-ALL Tumorzellen	81
3.4.3	Analyse des Einflusses von Inhibitoren auf die Apoptose der FLT3-ITD Tumorzellen	84
3.5	Inhibition von STAT5 durch Infektion der FLT3-ITD Tumorzellen mit dominant negativen STAT5 Mutanten.....	88
3.5.1	Mit DN STAT5 Mutanten infizierte FLT3-ITD Tumorzellen zeigten eine verminderte Proliferation	90
3.5.2	Funktionalität der DN STAT5 Mutanten.....	94
3.6	Klonalität der FLT3-ITD Tumore	95
3.6.1	Untersuchung der Klonalität und Rekombination auf der Ebene der schweren Kette des Prä-B-Zell Rezeptors in FLT3-ITD –Tumoren	99
3.7	Identifizierung retroviraler Integrationsstellen in FLT3-ITD Tumorzellen	101
3.7.1	LM-PCR	101
3.7.2	LM-PCR von Experiment 15 Maus #6	102
3.7.3	Überprüfung der Integrationsseiten per Southern Blot Analyse	110

3.7.4	Analyse der mRNA Expression von <i>Ptpn1/Cebpb</i> und <i>STAT4</i> in FLT3-ITD Tumoren.....	112
3.7.5	LM-PCR von Experiment 21 Maus #11 und #13.....	114
3.7.6	Analyse der relativen mRNA Expression von <i>Mrv1</i> in den Runx1/FLT3-ITD Tumoren.....	119
3.7.7	LM-PCR von Experiment 42 Maus #6, #7, #8 und #9.....	120
3.7.8	Analyse der relativen mRNA Expression in Maus #7 Experiment 42	125
4	Diskussion	127
4.1	Mausmodelle, die dazu beigetragen haben, die Rolle und Funktion der internen Tandem Duplikation in der B-Zell ALL zu charakterisieren	128
4.2	Charakterisierung von Signalwegen, die durch die FLT3-ITD Mutation aktiviert werden	129
4.3	FLT3 und dessen stromabwärts aktivierte Signalwege als Ziel von Therapien mit Inhibitoren in Leukämiepatienten.....	131
4.4	Bedeutung der PI3K/AKT und RAS/RAF/MEK/ERK Signalwege und aktiviertem STAT5 in akuten Leukämien und anderen Krebserkrankungen.....	134
4.4.1	RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT Signalweg	134
4.4.2	Aktivierung von STAT5.....	135
4.5	FLT3-ITD Tumore sind klonal, was die Selektion auf kooperierenden Mutationen aufzeigt	137
4.5.1	Kooperieren die Gene, die durch die retrovirale Insertion dysreguliert wurden mit FLT3-ITD in der Tumorgenese?	139
4.5.2	Entwicklung eines Modells für die Entstehung der B-Zell ALL in dem hier analysierten Mausmodell.....	143
4.6	Kann diese Arbeit zur weiteren Therapie von B-Zell ALL-Patienten, die eine FLT3-ITD Mutation aufweisen, beitragen?	145
5	Anhang	147
5.1	LM-PCR Fragmente aus Experiment 15#6 und 18 #10	147
5.2	LM-PCR Gelbild aus Experiment 35 #4, #5 und #6	149
5.2.1	LM-PCR Fragmente aus Experiment 35 #4, #5 und #6	150
5.3	Gelbild der LM-PCR von Experiment 20 Maus #11	150

5.3.1	LM-PCR Fragmente aus Experiment 20 #11	151
5.4	Gelbild der LM-PCR von Experiment 20 Maus #13	151
5.4.1	Sequenzdaten der in Experiment 20 #11 und #13 identifizierten Integrationen	152
5.5	Gelbild der LM-PCR aus Experiment 42.....	154
5.5.1	LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #6	154
5.5.2	LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #7	155
5.5.3	LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #8	156
5.5.4	LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #9	157
Literaturverzeichnis		158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Blutbildung ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark.	15
Abbildung 1.2: Die B-Zell Differenzierung. Dargestellt wurde die Entwicklung der B-Zelllinie von der HSC bis zur reifen B-Zelle.	17
Abbildung 1.3: Aufbau des Prä-B Zellrezeptors und des B Zell Rezeptors.	19
Abbildung 1.4: Signaltransduktion des Prä-B Zell Rezeptors.	21
Abbildung 1.5: Aufbau des Interleukin 7 Rezeptors (IL7R).	24
Abbildung 1.6: Signaltransduktion des Interleukin 7 Rezeptors (IL7R).	25
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der FLT3 Rezeptor Tyrosinkinase.	27
Abbildung 1.8: Signaltransduktion des FLT3-wt Rezeptors.	28
Abbildung 1.9: Entstehung einer Leukämie: akute lymphatische Leukämie (ALL) und akute myeloische Leukämie (AML) aus frühen Vorläufern der jeweiligen Blutzelllinie im Knochenmark.	32
Abbildung 1.10: Entstehung einer leukämischen Zelle.	35
Abbildung 1.11: Versuchsaufbau der FLT3-ITD Mausversuche.	37
Abbildung 2.1: Prinzip der LM-PCR.	60
Abbildung 3.1: FACS Analyse der Knochenmarkzellen aus retransplantierten FLT3-ITD Mäusen.	68
Abbildung 3.2: Sortieren von Pro-B Zellen aus C57BL/6 Knochenmarkzellen.	69
Abbildung 3.3: Western Blot Analyse zur Signaltransduktion von FLT3-ITD.	71
Abbildung 3.4: FACS Analyse von FLT3-ITD Zellen, die in Flüssigkultur gehalten wurden.	74
Abbildung 3.5: Strukturformel des FLT3-Inhibitors PKC412.	76
Abbildung 3.6: Hemmung von FLT3 durch den Inhibitor PKC412.	77
Abbildung 3.7: Strukturformel des MEK Inhibitors U0126.	78
Abbildung 3.8: Hemmung der MEK durch den Inhibitor U0126.	79
Abbildung 3.9: Strukturformel des PI3K-Inhibitors Ly294002.	80
Abbildung 3.10: Hemmung der PI3K mittels Ly294002 in FLT3-ITD Tumorzellen.	80

Abbildung 3.11: % Inhibition der FLT3-ITD Tumorzellen, die mit verschiedenen Inhibitoren (PKC412 – FLT3, U0126 – MEK, Ly294002 – PI3K, PP2 – Src-Kinase) sieben Tage in Methylzellulose kultiviert wurden..	83
Abbildung 3.12: FACS Analyse der GFP positiven FLT3-ITD Tumorzellen, die mit verschiedenen Inhibitoren behandelt wurden..	86
Abbildung 3.13: Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mit Hilfe der Apoptosemarker Annexin 5 und 7AAD.	88
Abbildung 3.14: Retrovirale MPSV-Vektoren mit dominant negativen STAT5 Konstrukten, die für die Infektion von FLT3-ITD Tumorzellen verwendet wurden..	89
Abbildung 3.15: Inhibition von FLT3-ITD Tumorzellen, die mit dominant negativen STAT5 Mutanten infiziert wurden (Kolonien)..	92
Abbildung 3.16: Inhibition von FLT3-ITD Tumorzellen, die mit dominant negativen STAT5 Mutanten infiziert wurden (lebende Zellen)..	93
Abbildung 3.17: Western Blot Analyse der mit den dominant negativen STAT5 Mutanten und dem G418 (neo)-Leervektor infizierten FLT3-ITD Tumorzellen.	95
Abbildung 3.18: Southern Blot Analyse der voneinander unabhängigen FLT3-ITD Tumore..	97
Abbildung 3.19: Klonalität der Sekundärtumore verschiedener an der B-Zell ALL erkrankten Mäuse. I.	98
Abbildung 3.20: Somatische Rekombination der schweren Kette des Prä-B-Zell-Rezeptors.	100
Abbildung 3.21: Übersicht der Retransplantation von FLT3-ITD Tumoren.	103
Abbildung 3.22: LM-PCR Gelbild der erhaltenen Fragmente für Maus #6 Experiment 15.	104
Abbildung 3.23: Identifizierte Integration in der Nähe des <i>Ptpn1</i> Gens und des <i>Cebpb</i> Gens.	108
Abbildung 3.24: Identifizierte Integration in STAT4 ermittelt via LM-PCR von Maus #6 aus Experiment 15.	109
Abbildung 3.25: Southern Blot Analyse der <i>Ptpn1/Cebpb</i> -Integration.	110
Abbildung 3.26: Nachweis der retroviralen Integrationsseite STAT4.	111
Abbildung 3.27: Realtime PCR Ergebnisse für die relative mRNA Expression von <i>STAT4</i> .	113
Abbildung 3.28: Gelbild der <i>Ptpn1</i> und der <i>Cebpb</i> -RT-PCR von verschiedenen Sekundärtumoren.	114

Abbildung 3.29: Retransplantationsschema von FLT3-ITD/Runx1 Mäusen.	115
Abbildung 3.30: Integration des Provirus in die CIS Mrvi1.....	117
Abbildung 3.31: Southern Blot Analyse der mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdauten genomischen DNA von verschiedenen FLT3-ITD Sekundärtumoren.....	118
Abbildung 3.32: Southern Blot Analyse der mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdauten genomischen DNA von verschiedenen, voneinander unabhängigen FLT3-ITD Primärtumoren.....	119
Abbildung 3.33: RT-PCR von Sekundärtumoren, die eine Mrvi1 Integration aufwiesen. ...	120
Abbildung 3.34: A: Vergleich der erhaltenen Sequenz des LM-PCR Fragments für <i>Tob2</i> anhand der RTCG-Datenbank. B: Vergleich der erhaltenen Sequenz des LM-PCR Fragments für <i>Dgkd</i> anhand der RTCG Datenbank.	123
Abbildung 3.35: Southern Blot Analyse zur Untersuchung der Tob2 Integration.	124
Abbildung 3.36: Analyse der retroviralen Integration in DGKD.....	125
Abbildung 3.37: Tob2 Expression in FLT3-ITD Tumoren mit und ohne Tob2 Integration. .	126
Abbildung 4.1: Modellentwicklung von Mechanismen und Signalkaskaden, die bei der Entstehung der B-Zell ALL eine Rolle gespielt haben könnten.	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genutzte Oligonukleotide (Primer)	41
Tabelle 2: Western Blot Antikörper.....	47
Tabelle 3: Sekundär-Antikörper für die Western Blot Analysen	48
Tabelle 4: Antikörper anti-Maus	48
Tabelle 5: Inhibitoren	49
Tabelle 6: Anzahl von Kolonien und lebenden Zellen von FLT3-ITD Tumorzellen, die in Methylzellulose supplementiert mit IL7 kultiviert wurden.....	72
Tabelle 7: Zählen von Kolonien und Bestimmung der Lebendzellzahl von FLT3-ITD Zellen in Methylzellulose ohne IL7.	73
Tabelle 8: Zählung der Kolonien sowie der lebenden Zellen nach Inhibitorbehandlung der Tumorzellen zeigt eine deutliche Abnahme in der Anzahl der Kolonien sowie der lebenden Zellen im Vergleich zu der DMSO Kontrolle.....	82
Tabelle 9: Mit DN Mutanten infizierte FLT3-ITD Tumorzellen zeigten eine verringerte Anzahl an Kolonien sowie lebenden Zellen im Vergleich zu der Neo-Kontrolle.	90
Tabelle 10: Identifikation der viralen Integrationsstellen von Experiment 15 Maus #6.	104
Tabelle 11: Zusammenfassung der per LM-PCR identifizierten retroviralen Integrationsseiten von dem FLT3-ITD Primärtumor und den retransplantierten Tumoren.....	105
Tabelle 12 Detaillierte Daten der retroviralen Integrationen von Experiment 15#6, Experiment 18#10 und Experiment 35 #4, #5 und #6.	106
Tabelle 13: Durch LM-PCR identifizierte Integrationsstellen in den Runx1/FLT3-ITD Mäusen Nummer 11 und 13 aus Experiment 21.	115
Tabelle 14: Detaillierte Daten der retroviralen Integrationen von Experiment 21#11 und 21#13.....	116
Tabelle 15: Zusammenfassung der LM-PCR Ergebnisse für die analysierten Mäuse aus Experiment 42.....	121
Tabelle 16: Detaillierte Daten der retroviralen Integrationen von Experiment 42#6, 7, 8 und 9.	121

Zusammenfassung

Die FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) Rezeptor-Tyrosinkinase beeinflusst die Differenzierung, Zellteilung und Apoptose früher hämatopoetischer Zellen, die sowohl der myeloiden als auch der lymphoiden Linie angehören. Aktivierende Mutationen dieser Kinase werden häufig in Patienten mit akuten myeloiden sowie lymphoiden Leukämien gefunden. Zwei besonders häufig auftretende Mutationen des FLT3 Rezeptors sind zum einen Punktmutationen in der Kinasedomäne und zum anderen Insertionen einer internen Tandem-Duplikation in der Juxtamembrandomäne des Rezeptors, die in Patienten häufiger identifiziert wurden. Beide Mutationen führen zu der Liganden-unabhängigen konstitutiven Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase und den stromabwärts davon gelegenen Signaltransduktionswegen. Da diese FLT3 Mutationen relativ häufig in Patienten mit akuten Leukämien identifiziert werden konnten, stellt der Rezeptor ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Behandlung mit Inhibitoren dar.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu charakterisieren welche Signalwege in den zu analysierenden murinen FLT3-ITD Tumorzellen aktiviert sind. Für die Beantwortung dieser Frage stand ein bereits in der Arbeitsgruppe Molekulare Pathologie am Heinrich-Pette-Institut etabliertes Mausmodell zur Verfügung. Dabei wurde murines Knochenmark mit retroviralen Vektoren, die FLT3-ITD exprimieren, infiziert und in konditionierte Mäuse transplantiert. Die Analyse der erkrankten Tiere ergab, dass diese an einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) erkrankt waren. Weitere Analysen zeigten, dass die leukämischen Blasten zwischen dem Pro- und Prä-B Zellstadium in ihrer Differenzierung blockiert waren. Die Untersuchung der Signaltransduktion der FLT3-ITD Tumorzellen ergab, dass der RAS/RAF/MAPK/ERK- und PI3K-Signalweg sowie STAT5 und FLT3 im Gegensatz zu vorher aus C57BL/6 Mäusen isolierten murinen Wildtyp Pro-B Zellen, konstitutiv aktiviert waren. In dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal FLT3-ITD Tumorzellen in sekundäre Rezipienten zu transplantieren, um weiteres FLT3-ITD Tumormaterial zu erhalten. Diese Mäuse erkrankten nach einer sehr kurzen Latenzphase von 21 Tagen ebenfalls an einer lymphoblastischen Leukämie, was die Aggressivität dieser Leukämie hervorhebt. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit ein *ex vivo* System zu entwickeln, in dem FLT3-ITD Tumorzellen in semi-liquider Methylzellulose, supplementiert mit murinem Interleukin 7 (mIL7), kultiviert werden konnten. Mithilfe dieser Zellen konnten Inhibitorversuche durchgeführt werden, um die Wichtigkeit und den Einfluss der verschiedenen Signalwege auf die Proliferation und die Apoptose der FLT3-ITD Tumorzellen zu charakterisieren. Für die Versuche wurden niedermolekulare Inhibitoren (PKC412-FLT3-Inhibitor, Ly294002-PI3K Inhibitor, U0126-MEK Inhibitor, PP2-Src Kinase-Inhibitor) oder dominant negative Formen des STAT5-Proteins (DN

STAT5) eingesetzt. Es zeigte sich, dass alle Inhibitoren sowie die Expression von DN STAT5 Mutanten die Proliferation der FLT3-ITD Tumorzellen verringerte und einen Einfluss auf die Fähigkeit der Tumorzellen, Kolonien in der Methylzellulose auszubilden, hatten. Die Tumorzellen, die mit den vorher genannten Inhibitoren behandelt wurden, zeigten keinen Hinweis auf eine erhöhte Apoptose im Vergleich zu der mit DMSO behandelten Kontrolle. Folglich konnte jeder eingesetzte Inhibitor und die DN STAT5 Mutanten einen negativen Einfluss auf die Proliferation der FLT3-ITD bewirken, was die Wichtigkeit aller aufgeführten Signalwege für die Tumorzellen unterstreicht.

Bisher wurde in Mausmodellen anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass FLT3-ITD allein nicht in der Lage ist, eine Leukämie auszulösen. Da diese Ergebnisse im Gegensatz zu unserem Mausmodell stehen, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu analysieren, ob die FLT3-ITD Expression allein ausreichend ist, um die ALL auszulösen, oder ob sekundäre Mutationen in den Tumoren vorlagen, die die Leukämogenese erhöht haben könnten. Dabei könnte es sich um Mutationen handeln, die durch die Integration des Provirus in das Mausgenom zustande gekommen sind. Es konnte gezeigt werden, dass die FLT3-ITD Tumore klonal waren und multiple Integrationsstellen besaßen. Bei vier der identifizierten Integrationsstellen handelt es sich um sogenannte *CIS* („*common integration sites*“). Diese Integrationsstellen wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen Tumoren identifiziert. Alle in dieser Arbeit charakterisierten CIS sind in den Kalziumsignalweg eingebunden. Dieser spielt unter anderem in der Signalwirkung des Prä-B Zellrezeptors eine Rolle. Da die FLT3-ITD Tumorzellen zwischen dem Pro- und Prä-B Zellstadium in ihrer Differenzierung blockiert sind, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Funktionalität des Prä-B Zell Rezeptors durch die Dysregulation des Kalzium-Signalweges, beeinträchtigt wurde.

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Signaltransduktion können zur Beantwortung der Frage beitragen, ob die Behandlung von FLT3-ITD positiven Leukämiepatienten mit niedermolekularen Kinase-Inhibitoren erfolgsversprechend ist. Durch die Charakterisierung kooperierender Mutationen können neue Strategien zur Behandlung der Leukämiepatienten entwickelt werden. So können die Erkenntnisse zur Heilung von FLT3-ITD B-Zelleukämien mit schlechter Prognose beitragen.

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese bezeichnet den stark hierarchischen und komplexen Prozess der Blutbildung. Abstammend aus dem Mesoderm, findet die Hämatopoese embryonal im Dottersack und in der Leber, im adulten Menschen schließlich hauptsächlich im Knochenmark statt. Die Aufgabe der Blutzellen in Säugern beinhaltet den Sauerstoff- und Wärmetransport, die Verteilung von Nährstoffen sowie die Abwehr von im Organismus befindlichen Krankheitserregern. Das Blut besteht aus dem Serum, in dem Salze und Proteine gelöst sind, und dem „festen“ Bestandteil, dem sogenannten Hämatokrit, in dem sich die Blutzellen befinden.

Die Blutzellen entwickeln sich im Knochenmark aus den hämatopoetischen Stammzellen, die in der Lage sind, den Organismus lebenslang mit sämtlichen Blutzellen durch die Fähigkeit des sogenannten ‚*self-renewal*‘, d.h. dem Vermögen sich unbegrenzt zu teilen, zu versorgen. Eine zweite Fähigkeit der Stammzellen ist es, zu jeder der verschiedenen Blutzellen differenzieren zu können (Pluripotenz) (Osawa, 1996) (siehe Abbildung 1.1). Durch Retransplantationsversuche im Maussystem konnten zwei verschiedene Typen an hämatopoetischen Stammzellen charakterisiert werden. Die Langzeit-Stammzellen (LT-HSC - ‚*Long Term-Haematopoietic Stem Cells*‘) sind in der Lage sich selbst zu erneuern und das hämatopoetische System selbst in Mäusen mit einer letalen Bestrahlung vollständig zu rekonstituieren. Bei den Kurzzeit-Stammzellen (ST-HSC - ‚*Short Term-Haematopoietic Stem Cells*‘) dagegen ist die Fähigkeit der Rekonstruktion und des Selbsterhalts zeitlich begrenzt bzw. nur noch eingeschränkt möglich. Die Differenzierung der LT-HSC über die ST-HSC geht über zu multipotenten Vorläuferzellen (MPP), deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung stark eingeschränkt ist. Mit jedem Schritt der Differenzierung verlieren die Zellen in der normalen Hämatopoese einen Teil ihrer Pluripotenz durch irreversible Reifungsvorgänge, die sich auch in stark veränderten, für den jeweiligen Zelltypus spezifischen Genexpressionsmustern ausdrücken (Miyamoto, 2002).

Aus den multipotenten Vorläuferzellen bilden sich wiederum zwei Klassen der Vorläuferzellen: Auf der einen Seite für die myeloide Linie (CMP – ‚*common myeloid progenitor*‘ Myeloische Vorläuferzelle), auf der anderen Seite für die lymphoide Linie (CLP – ‚*common lymphoid progenitor*‘ Lymphatische Vorläuferzelle). Das Differenzierungspotential dieser Vorläuferzellen ist bereits stark auf die jeweiligen Linien begrenzt (Weismann 2000).

Aus den CMPs entwickeln sich einerseits Vorläuferzellen der Megakaryozyten/Erythrozyten (MEP- ‚Megakaryocytic/Erythroid Progenitor‘) und andererseits Vorläuferzellen der Granulozyten und Monozyten (GMP - ‚Granulo Monocytic Progenitor‘). Aus MEPs entwickeln sich dementsprechend Megakaryozyten, die Thrombozyten freisetzen, die für die Blutgerinnung unabdingbar sind, und Erythrozyten, die für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich sind. Aus den GMPs entwickeln sich Granulozyten und Monozyten, die bei der unspezifischen/angeborenen Immunantwort eine große Rolle spielen.

In der lymphoiden Linie entwickeln sich aus den CLPs über einige unreife Zwischenstadien (Pro-B, Pro-T und Pro-NK) die B-Lymphozyten, die T-Lymphozyten und die Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen). Diese Zellen sind essentiell für die spezifische Immunantwort.

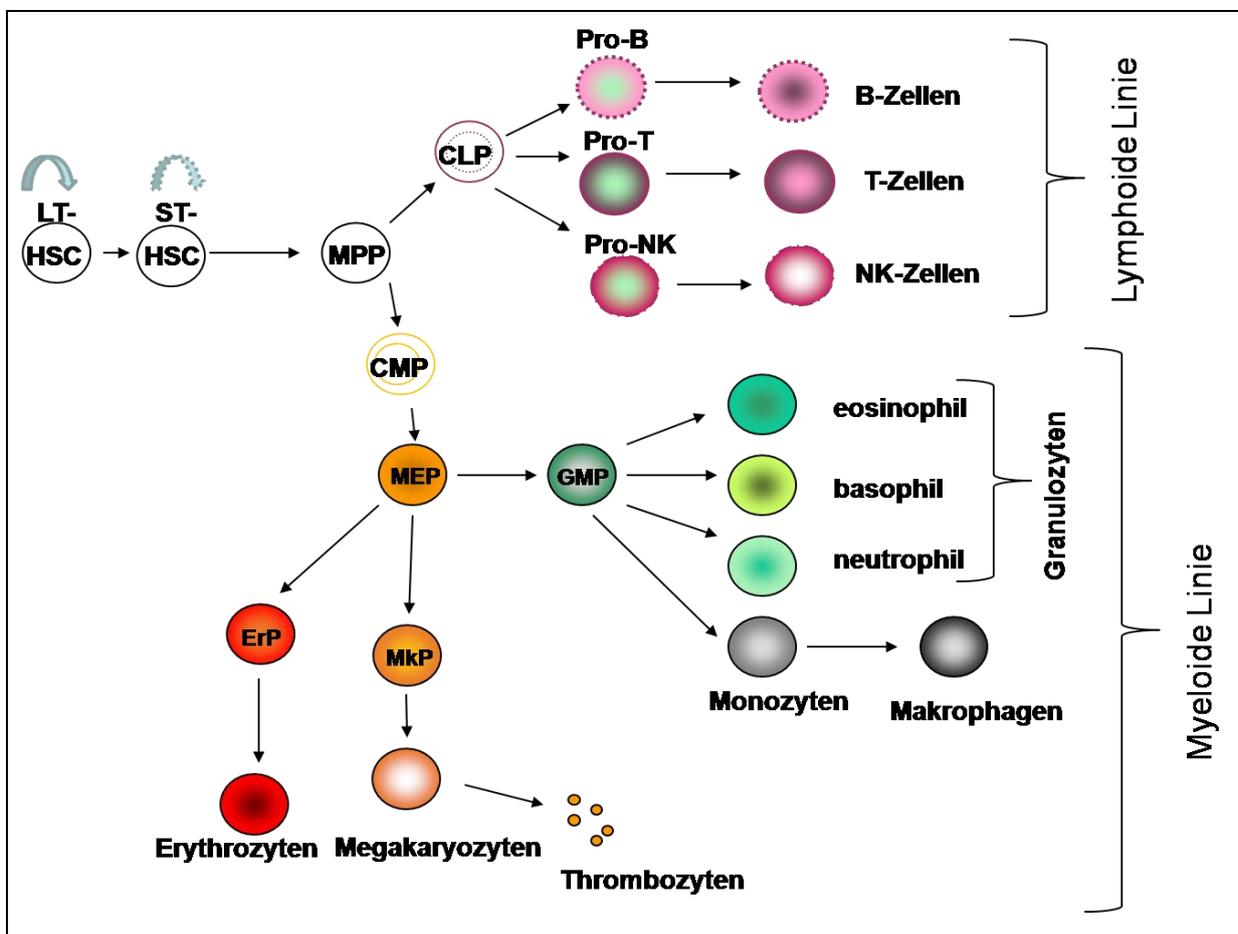


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Blutbildung ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. (LT-HSC: Langzeit hämatopoetische Stammzelle; ST-HSC: Kurzzeit hämatopoetische Stammzelle; MPP: Multipotente Vorläuferzellen; CLP: lymphoide Vorläufer, CMP: myeloide Vorläufer, Pro-B, Pro-T und Pro-NK: Vorläufer der jeweiligen Zellen; GMP: Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer; MEP: Megakaryozyten/Erythrozyten-Vorläufer, MkP: Megakaryozyten-Vorläufer; ErP: Erythrozyten-Vorläufer) Die blauen Pfeile zeigen die Fähigkeit der Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen an. Schema abgewandelt nach Passegue et al., 2003.

Dieses hierarchische Modell der Hämatopoese entspricht der gängigen Lehrmeinung (Passegue et al., 2003). Jedoch werden immer wieder neue Modelle der Hämatopoese durch die stetige Forschung am Blutsystem entwickelt, in denen neue Modifikationen des hier dargestellten Grundsystems einfließen (Adolfsson et al., 2005 und Katsura et al., 2009).

Zur Differenzierung der hämatopoetischen Zellen gehören ebenfalls das Zusammenspiel und die Veränderungen der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF) sowie die Aktivierung bzw. die Inaktivierung von Signalkaskaden, die wiederum über Rezeptoren aktiviert werden und deren Expression sich in einer differenzierenden Zelle stetig verändert. Ein Beispiel dafür ist die Differenzierung der B-Zellen, die in der Abb. 1.2 dargestellt ist.

1.2 Die B-Zellentwicklung

Da die Entwicklung der frühen Zellen der B-Zelllinie in dieser Arbeit besonders wichtig ist, soll im Weiteren auf die B-Zellentwicklung aus den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark eingegangen werden. Die Entwicklung der B-Zellen ist ein wichtiger Prozess für die spezifische Immunantwort. Der B-Zell Rezeptor (BZR) vermittelt die Prozessierung von Antigenen, die im Folgenden den T-Zellen präsentiert werden, was zu einer vollständigen Aktivierung der B-Zelle führt (Nirro und Clark 2002). Im Laufe der Entwicklung zum vollständig funktionsfähigen BZR, wird zuerst der Prä-BZR gebildet. Er besteht aus einer schweren Immunoglobulinkette (IgH) und einer Immunoglobulinkette, die als Ersatz für die leichte Kette gebildet wird, der sogenannten „surrogate light chain“. Erst wenn die Prä-B Zellen den Kontrollpunkt passiert haben, an dem getestet wird, ob der Prä-BZR, der auf der Zelloberfläche exprimiert wird, funktional ist, tritt eine klonale Expansion der Prä-B Zellen ein und die Gene des Locus der leichten Immunoglobulinkette (IgL) des BZR können rekombiniert werden. Nach der erfolgreichen Expression des BZR leitet der BZR regulatorische Signale weiter, die über die Zukunft der jeweiligen B-Zelle entscheiden. Durch die geordnete Umlagerung der Gene, die für die Antigen-Rezeptoren kodieren, entsteht letzten Endes die große Vielfalt der B Zellrezeptoren, die für die spezifische Immunantwort eine wichtige Rolle spielt.

Die Bildung des BZR ist über die eben genannten Kontrollpunkte der B-Zell Entwicklung bestimmt und wird durch ein Netzwerk komplexer Regulationsmechanismen kontrolliert. Die verschiedenen Stadien der B-Zell Entwicklung vom CLP-Stadium bis zur reifen B-Zelle, sind durch die Expression von Rezeptoren, wie dem Interleukin 7 Rezeptor oder aber dem FLT3-Rezeptor sowie der Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern gekennzeichnet (Hardy et al., 2007, Melchers et al., 2003) (siehe Abb.1.2). Aber auch die

Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, die für die B-Zell Entwicklung wichtig sind, wie PAX5 oder IKAROS, ist in den komplexen Regulationsmechanismus der B-Zelldifferenzierung mit eingebunden (Nutt und Kee; 2007, Fuxa und Skok, 2007; Medina und Singh, 2005; Hardy et al., 2007).

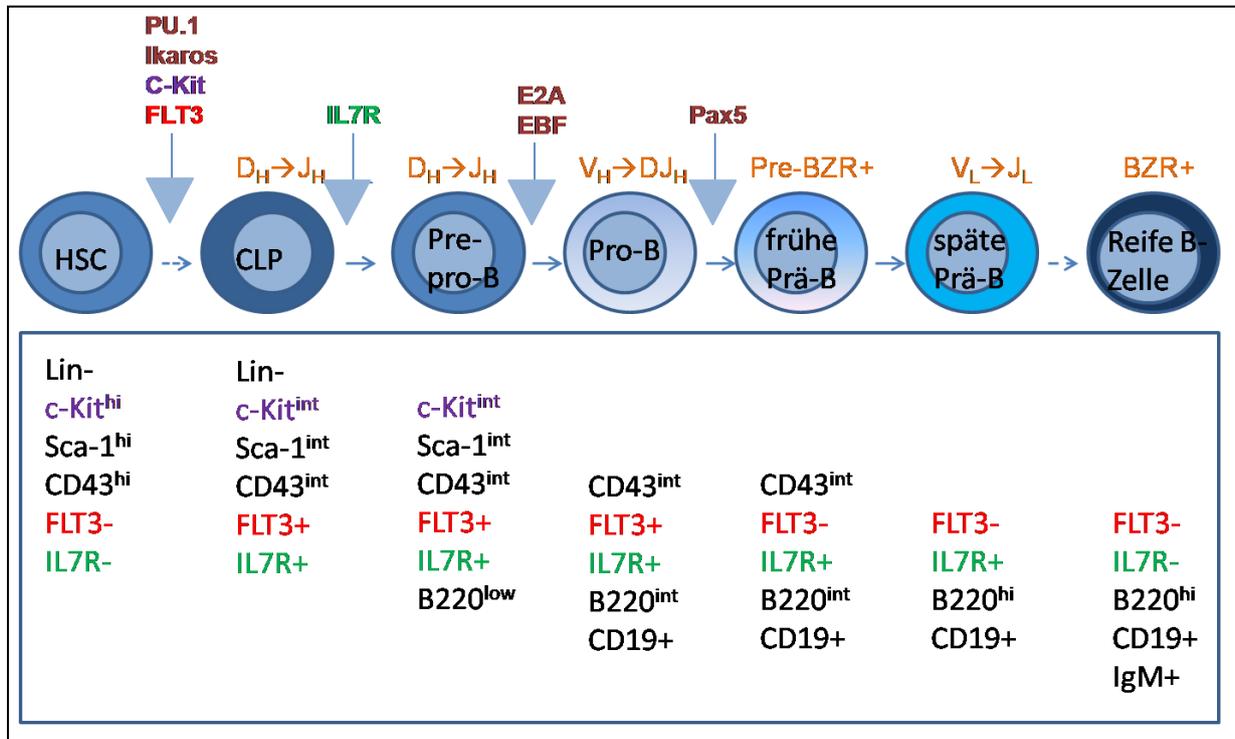


Abbildung 1.2: Die B-Zell Differenzierung. Dargestellt wurde die Entwicklung der B-Zelllinie von der HSC bis zur reifen B-Zelle. In braun sind die Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet, die für die Differenzierung in verschiedenen Stadien (durch blaue Pfeile gekennzeichnet) essentiell sind. Die drei Rezeptoren c-Kit, FLT3 und der Interleukin 7 Rezeptor, deren Expression ebenfalls für die B-Zell Differenzierung wichtig sind, sind der Reihe nach in den Farben violett, rot und grün gekennzeichnet. In orange sind die Rekombinationsschritte der schweren und der leichten Kette des Prä-B und B-Zellrezeptors gezeigt. Ausgewählte Oberflächenmarker, deren Expression verschiedene Stadien der B-Zellentwicklung charakterisieren, wurden unter den entsprechenden Stadien in schwarz bzw. für die Rezeptoren c-Kit, FLT3 und den IL7R farbig dargestellt. Die blauen Pfeile zeigen die Differenzierung an, während die gestichelten blauen Pfeile anzeigen, dass zwischen der gezeigten und der nächsten Entwicklungsstufe weitere Stadien liegen. Abbildung von Fuxa und Skok 2007 wurde mit Daten von Hardy et al. (2007) in diesem Schema modifiziert.

1.2.1 Entwicklung des Prä-B Zell- und des B-Zell-Rezeptors

Für die spezifische Immunantwort ist die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle zur reifen B-Zelle und somit das Bereitstehen einer Vielzahl verschiedener BZRs ein essentieller Vorgang. In dem Rekombinationsprozess, der letzten Endes zur Expression eines funktionalen BZRs führt, sind wie vorher beschrieben zwei Kontrollpunkte entscheidend: zum einen die Rekombination der schweren Immunoglobulinkette und die Expression der „surrogate light chain“ des Prä-BZRs und zum anderen, wenn diese erfolgreich war, die anschließende Rekombination der leichten Immunoglobulinkette des BZRs. Um die Rekombination überhaupt zu ermöglichen, ist ein Komplex aus den beiden Rag-Proteinen nötig. Dabei handelt es sich um Proteine, die von den Rekombinations-aktivierenden Genen 1 und 2 kodiert werden. Sie sind in der Lage, in einem Komplex Doppelstrangbrüche in der DNA zwischen Loci der Immunoglobulingenen (Ig) und spezifischen Erkennungssequenzen zu verursachen. Die freien Enden werden anschließend ungeachtet ihrer Sequenzhomologie miteinander verbunden.

Die Rekombination der schweren Kette des Prä B-Zellrezeptors und des B-Zellrezeptors nennt man V(D)J-Rekombination, da drei verschiedene Gensegmente der V (*Variability*), D (*Diversity*) und J (*Joining*) Gene miteinander verknüpft werden und so eine Vielfalt an B-Zellrezeptoren erzeugt wird. Die Verknüpfung der Gensegmente für die schwere Kette (IgH) beginnt bereits im frühen Stadium der CLP- Vorläuferzellen (siehe 1.2) mit dem Zusammenfügen eines D_H-Fragments mit einem J_H-Fragment. Darauf folgt die Umlagerung des D_H-J_H-Fragments mit einem V_H-Fragment im späten Pro-B Zellstadium. War die Rekombination aller Fragmente miteinander erfolgreich, so wird das IgH exprimiert. Der Prä-BZR allerdings besteht nicht nur aus zwei schweren Ketten, sondern auch aus einer Ersatz-leichten-Kette, einer sogenannten ‚surrogate light chain‘, die später in der Entwicklung des BZRs durch leichte Ketten ersetzt wird. Die ‚surrogate light chain‘ setzt sich aus den beiden Segmenten VpreB und λ5 zusammen. Dabei handelt es sich um Produkte von den nicht-rekombinierten Genen *VpreB2* und *Igll1* (Le Bien und Tedder 2008, Herzog, 2009). Der membranständige Prä-BZR wird erst durch die beiden für die Signaltransduktion des Rezeptors unabdingbaren Polypeptiden Igα und Igβ komplettiert (siehe Abb.1.3). Sie werden von den Genen *Cd79a* und *Cd79b* kodiert.

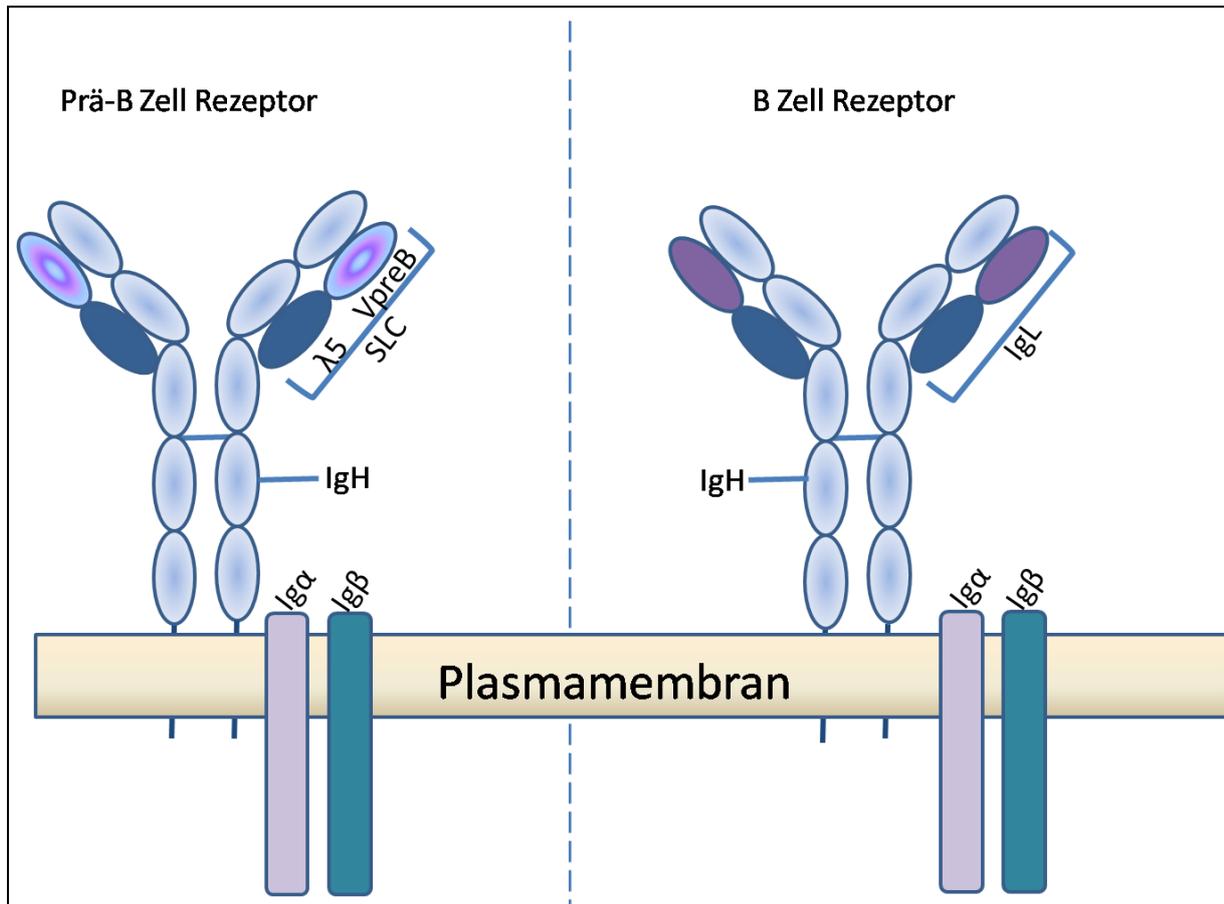


Abbildung 1.3: Aufbau des Prä-B Zellrezeptors und des B Zell Rezeptors. Die Abbildung zeigt auf der linken Seite den Aufbau des Prä-B Zell Rezeptors und auf der rechten Seite den Aufbau des B Zell Rezeptors. (IgH: Immunoglobulin schwere Kette, IgL: Immunoglobulin leichte Kette, SLC: ‚surrogate light chain‘).

Ist der Prä-BZR nun zusammengesetzt, wird er auf der Oberfläche der Prä-B Zellen exprimiert. Durch die Signalgebung des Rezeptors, die im Folgenden beschrieben wird, wird getestet, ob der Rezeptor funktional ist. Ist dieser Prä-BZR nicht funktional, so leitet die entsprechende Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose, ein. Sollte der Prä-BZR funktional sein, so tritt diese Zelle in eine sogenannte klonale Expansions-Phase ein, in der sie sich häufig teilt (Holmes et al., 2006). Im späten Prä-B Zellstadium wird die Expression der Komponenten der ‚surrogate light chain‘ stark reduziert, bis im Weiteren die ‚surrogate light chain‘ durch eine normale leichte Kette ersetzt werden kann, um den BZR zu bilden. Die leichte Kette des BZR muss bereits im späten Prä-B Zellstadium rekombiniert werden, damit in den weiteren Differenzierungsstadien der unreifen und reifen B-Zellen der vollständige BZR auf der Oberfläche exprimiert werden kann (Fuxa und Skok 2007).

1.2.2 Signaltransduktion des Prä-B Zell Rezeptors

Die Signaltransduktion des Prä-B Zellrezeptors zu verstehen, ist für diese Arbeit von Bedeutung und soll im Folgenden erklärt werden. Bisher ist die Signaltransduktion des Prä-BZR noch nicht vollständig charakterisiert. Die bisherigen Daten weisen aber darauf hin, dass dieselben Signalwege sowie die gleichen gebildeten Komplexe von dem Prä-BZR und von dem BZR genutzt werden. Der Unterschied zwischen den beiden Rezeptoren liegt allerdings in der Initiierung der Signaltransduktion. Beim BZR steht fest, dass durch die Antigenbindung die Signalweiterleitung in das Zellinnere beginnt, während bei dem Prä-BZR noch kein eindeutiger Ligand identifiziert werden konnte. Es wird angenommen, dass die Initiierung der Signalgebung durch die autonome Aggregation von Prä-BZR-Komplexen an der Zelloberfläche zustande kommt (Guo et al., 2000, Bankovich et al., 2007).

Diese Aggregation mehrerer Prä-BZREN resultiert in der Aktivierung der ‚Spleen Tyrosine Kinase‘ (SYK), die mit anderen Proteinen der Src-Kinasen Familie wie LYN diverse stromabwärts vom Rezeptor gelegene Substrate phosphoryliert (siehe Abb. 1.4). SYK bindet an die Tyrosinreste der ‚immunoreceptor tyrosine –based activation motifs‘ (ITAMs) der Polypeptide Ig α und Ig β . Diese unterstützen die Autophosphorylierung von SYK und die Phosphorylierung von anderen Src-Kinasen (Lassoued et al., 1993, Sanz et al., 1996). Sie lösen verschiedene Signalkaskaden aus, die in die Proliferation und Differenzierung der Prä-B Zellen eingebunden sind. Ein für die Proliferation und das Überleben wichtiger Signalweg ist der PI3K/AKT-Signalweg, der durch SYK angeschaltet wird. SYK und andere Src-Kinasen phosphorylieren den Co-Rezeptor CD19 und/oder das Adapterprotein BCAP (*B-cell PI3K adaptor*), welches dann die PI3K rekrutiert (Novobrantseva et al., 1999, Boekel et al., 1997). Die Aktivierung der PI3K führt zur Bildung des Signalüberträgers (second messenger) Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃), der wiederum Signalmoleküle zur Zytoplasmamembran rekrutiert (Shiokawa et al., 1999). Diese Moleküle schließen die Serin/Threoninkinase B (PKB bzw. AKT) mit ein, die dafür bekannt ist stromabwärts der PI3K die Proliferationsprozesse der Zelle zu regulieren, indem sie unter anderem die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) aktiviert.

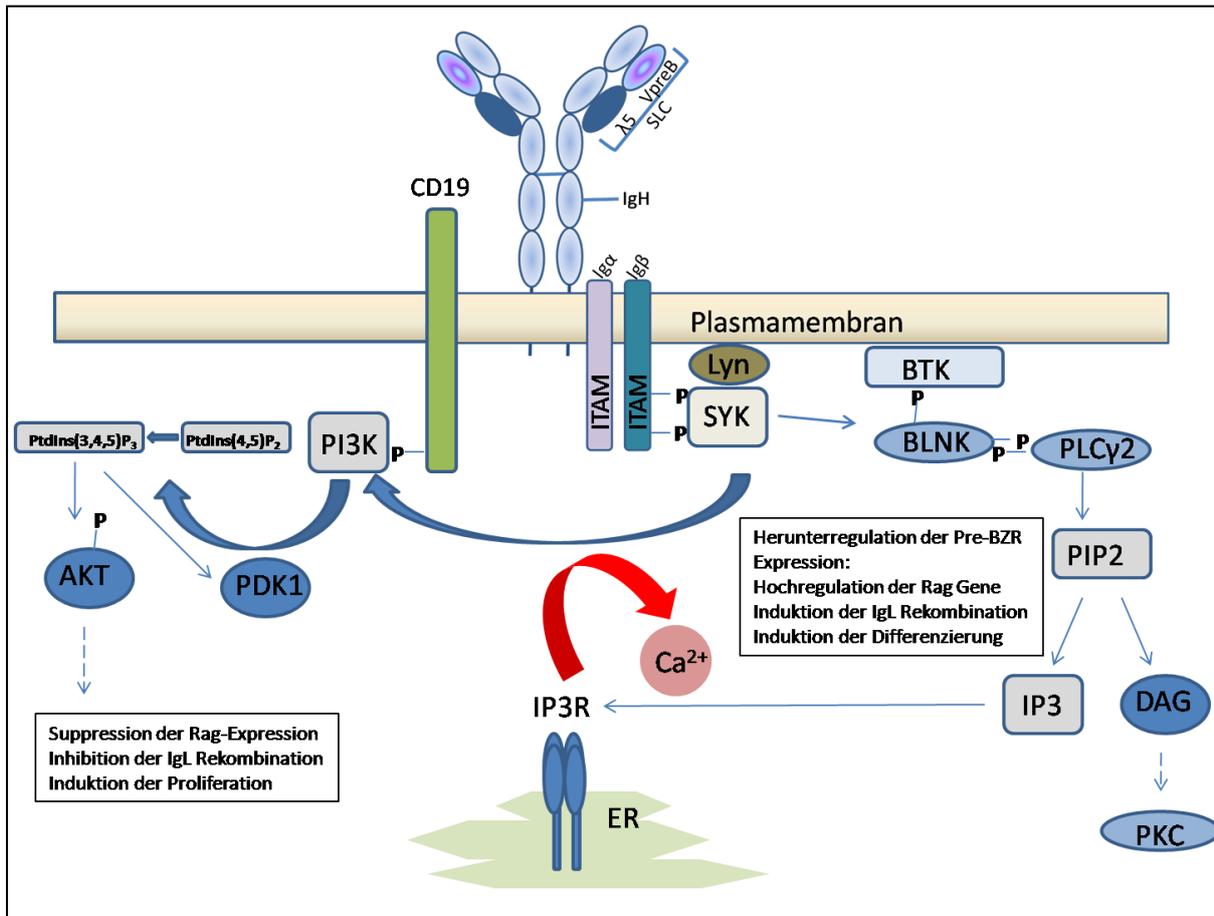


Abbildung 1.4: Signaltransduktion des Prä-B Zell Rezeptors. Verschiedene Signalwege, die die Zellproliferation und die weitere Differenzierung der Prä-B Zellen zu B-Zellen aktivieren, werden durch die Signalgebung des Prä-B Zell Rezeptors angeschaltet. Schema verändert aus Ambion Pathways übernommen (AKT: Serin/Threonin Kinase Akt; BLNK: B-Zell Linker Protein; BTK: Burton's Tyrosinkinase; Ca²⁺:Kalzium; DAG: Diacylglycerol; ER: Endoplasmatisches Retikulum; IP3 (R): Inositol 1,4,5-Trisphosphat (Rezeptor); Lyn: Lyn Protein ; PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase; PKC: Proteinkinase C; PLCy: Phospholipase C γ; Syk: ‚spleen tyrosine kinase‘).

Die Signalgebung durch den PI3K/AKT Signalweg unterdrückt die Expression der Rag-Gene sowie die Rekombination der leichten Kette des BZR und induziert die Zellproliferation. Auf die Aktivierung eines weiteren Substrates von SYK, dem SH2-Domäne tragendem Leukozyten Protein (SLP65 oder auch BLNK genannt), folgt die Komplexbildung von BLNK mit der Burton's Tyrosine Kinase (BTK) und der Phospholipase Cγ2 (PLCγ2) (Le Bien et al., 1998, Nagata et al., 1997). Die Bildung dieses Komplexes (auch Reaktosom genannt) resultiert in der Expression der Rag-Proteine, was in dem Rekombinationsprozess das Öffnen des Igl-Locus und somit die Differenzierung der Prä-B Zellen zu B Zellen zufolge hat. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Signaltransduktion des BLNK/BTK/PLCγ2 Komplexes ist die Freisetzung von Kalzium durch die Bindung des Signalmoleküls Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP3) an den IP3-Rezeptor, der sich membranständig im Endoplasmatischen Retikulum (ER) befindet. Dabei ist PLCγ2 ein Schlüsselenzym für die IP3-Produktion. Es

wird durch die Phosphorylierung von BTK im Komplex mit BLNK aktiviert und spaltet Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PIP₂) zu dem Signalmolekül IP₃ und Diacylglycerol (DAG). DAG wiederum aktiviert die Protein Kinase C (PKC), welche in der Lage ist, den NF- κ B Inhibitor I κ B zu phosphorylieren, welcher anschließend im 26S Proteasom abgebaut wird und so NF- κ B frei lässt. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist in der Lage in den Zellkern zu wandern und eine Reihe von Zielgenen, die für das Überleben der Zelle essentiell sind, wie BCL-X_L und IAPs, zu aktivieren (Vogelstein und Kinzler 2004). Das IP₃ bindet an den IP₃-Rezeptor und stimuliert so das Ausströmen von Kalzium aus den intrazellulären Kalzium-Vorräten.

1.3 Rolle des Interleukin 7- und des FLT3 Rezeptors in der frühen B-Zellentwicklung

Noch bevor die Rekombination der schweren Immunoglobulinkette des Prä B-Zellrezeptors stattfindet, spielt die Interaktion der beiden Rezeptoren für Interleukin 7 und für den FLT3 Liganden (FL) eine entscheidende Rolle für die frühe B Zellentwicklung. Die Expression des IL7- Rezeptors und des FLT3-Rezeptors beginnt bereits im frühen B Zellstadium der CLPs (siehe Abb. 1.2).

Untersuchungen zur Expression von FLT3 ergaben, dass der Rezeptor vorwiegend in frühen hämatopoetischen Zellen der lymphoiden und der myeloiden Linie exprimiert wird. Die FLT3-Expression konnte bisher nicht in den LT-HSCs nachgewiesen werden, jedoch in ST-HSCs, die die Oberflächenmarker Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ aufweisen. Auch die multipotenten Vorläuferzellen (MPPs) zeigen genau wie die CLPs die Expression von FLT3. Die FLT3-Expression wird im Pro-B-Zellstadium durch die Expression des Transkriptionsfaktors Pax5 beendet (Holmes et al., 2006). Das Ausschalten der FLT3-Expression ist essentiell für die Bildung des Prä B-Zell Rezeptors und die weitere Differenzierung der B-Zelllinie (Holmes et al., 2007, Facio et al., 2008, Adolfsson et al., 2001, Ogawa et al., 2000). Ein weiterer Hinweis, der für die Wichtigkeit von FLT3 für die B-Zell Differenzierung spricht ist, dass FLT3^{-/-} Mäuse eine reduzierte Anzahl an NK-Zellen und DC Zellen und vor allem eine reduzierte Anzahl an B Zellvorläuferzellen zeigten (Small 2006).

Die wichtige Rolle des IL7-Rezeptors in der B-Zellentwicklung konnte durch Analysen eines IL7R Knockout-Mausmodells unterstrichen werden. Ist der IL7R in den Mäusen nicht vorhanden, so ist eine Blockade der B-Zellgenerierung im Knochenmark der adulten Mäuse (8-12 Wochen alt) zu beobachten (Larvalho et al., 2001). Außerdem wurde eine Reduktion

der CLPs im Knochenmark beschrieben. In der Regel waren nur ein Drittel der CLPs, die eine gesunde Wildtyp-Maus aufzeigt, in den Knockout-Mäusen vorhanden. Diese CPLs sind nicht in der Lage zu B-Zellen zu differenzieren und in die Zytokin-abhängige Expansion überzutreten (Dias et al., 2005; Kikuchi et al., 2005). Es wurde durch weitere Mausversuche gezeigt, dass wenn zusätzlich zum IL7R auch der FLT3-Rezeptor ausgeschaltet bzw. nicht vorhanden ist, die B-Zellentwicklung in diesen Mäusen nicht mehr stattfinden konnte und somit keine B Zellen im Knochenmark mehr nachweisbar waren (Sitnicka et al., 2003; Vosshenrich et al., 2003).

Außer der Aktivierung verschiedener Signalwege trägt der IL7R zur Ausbildung eines Transkriptionsfaktor-Netzes bei, welches den Übergang von Pro-B Zellen zu reiferen B Zellen fördert. Einige Studien haben gezeigt, dass eine Interaktion des IL7Rs mit dem Prä-B Zellrezeptors besteht. Die Expression des IL7Rs wird durch die Expression des Prä-BZR in frühen Prä-B Zellen verstärkt (Herzog et al., 2009). Das bedeutet, dass diese Zellen mehr auf das Interleukin 7 ansprechen, was dazu führt, dass es zu einer selektiven Vermehrung der Prä-BZR positiver Zellen kommt (Zytokin-induzierte Expansion). Die Vermehrung der Zellen wird andererseits aber auch durch die Signalgebung des Prä-BZR eingeschränkt, indem die weitere Differenzierung der Prä-B Zellen eingeleitet wird (siehe Abb.1.4). Im späteren Prä-B Zellstadium wird die Expression des IL7Rs gedrosselt (Abb.1.2). Der Interleukin 7 Rezeptor und der Prä B-Zellrezeptor wirken somit zusammen auf die Zellteilung, das Überleben und die Differenzierung der B-Zellen. In 2006 fassten Hendriks et al. vier verschiedene Wechselwirkungen des IL7Rs und des Prä-BZR zusammen: (1) Sie verhindern eine zweite Rekombination der leichten Immunoglobulinketten (*allelic exclusion*). Dadurch wird sichergestellt, dass auch wirklich nur ein spezifischer BZR exprimiert wird. (2) Sie stimulieren die Zellteilung durch die Expression pro-proliferativer Faktoren, wie c-myc und verhindern die Apoptose durch die Expression anti-apoptotisch wirkender Faktoren wie Bcl-2 oder Bcl-x_L. (3) Beide Rezeptoren sorgen weiterhin dafür, dass die Zellteilung durch die Herunterregulation der ‚surrogate light chain‘- und IL7R-Gene eingegrenzt wird und (4) die Differenzierung der Zellen zu reifen B-Zellen beginnen kann (Le Bien 2009).

1.3.1 Der Interleukin 7 Rezeptor (IL7R)

Der IL7R setzt sich aus zwei verschiedenen Proteinketten zusammen (siehe Abb. 1.5). Die IL7R α -Kette wird durch das Gen *Il7r* kodiert. Diese IL7R α -Kette bildet nicht nur einen Teil des IL7Rs, sondern zusammen mit anderen Proteinen den Rezeptor für TSLP (*Thymic*

stromal derived Lymphopoetin), der auch CRLF2 (*Cytokine receptor-like factor 2*) genannt wird. Die γ_c -Kette des IL7Rs ist neben der Bildung des IL7R auch an der Bildung anderer Interleukinrezeptoren wie IL2R, IL4R, IL9R, IL15R und IL21R beteiligt (Milne und Paige 2006, Cao et al., 1995, Disanto 1995).

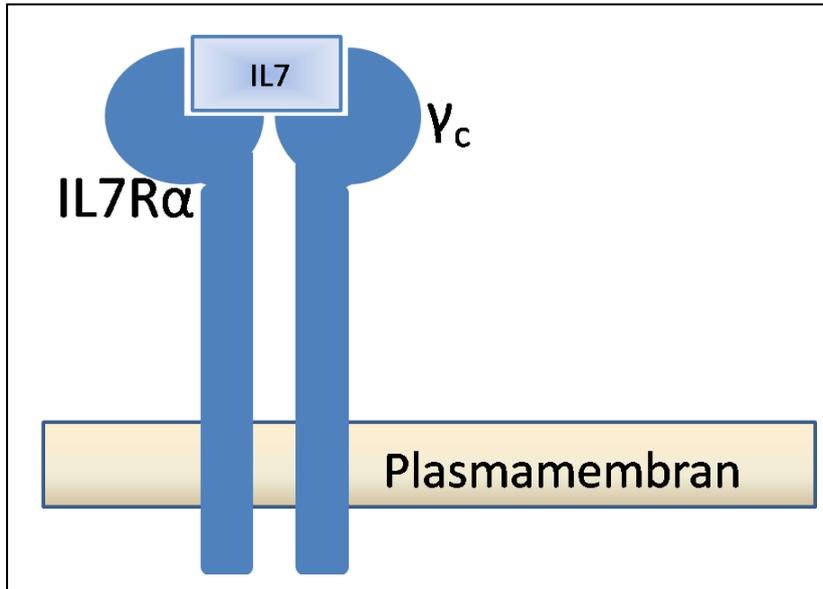


Abbildung 1.5: Aufbau des Interleukin 7 Rezeptors (IL7R).

Der IL7R besteht aus zwei Proteinketten: der IL7R α Kette und der γ_c -Kette.

1.3.1.1 Signaltransduktion des Interleukin 7 Rezeptors (IL7R)

Analysen der Signaltransduktion des IL7Rs haben gezeigt, dass sie zur Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges führen (von Freedon et al., 1995; Jeffry et al., 1995) sowie zur Aktivierung der Janus Kinasen (JAK) / ‚*Signaltransducer and Activator of Transcription*‘ (STAT) Signalwege (Venkitaraman et al., 1994, Lin et al., 1995, Fleming et al., 2001) (Abb. 1.6). Die Phosphorylierung der IL7R α -Kette am Tyrosinrest Y449 ist dabei für die Aktivierung essentiell. Besonders die Aktivierung von STAT5 durch den IL7R vermittelt in den frühen B-Zellen das Überleben und die Proliferation.

STAT Signalweg

STAT (*Signal transducers and activators of Transcription*) Proteine sind in Säugern durch sechs verschiedene Gene kodiert und beinhalten 10 verschiedene Proteine einschließlich verschieden gebildeter Isoformen von STAT1, 3, 4 und 5 (Rane et al., 2002, Darnell, 1997). STAT Transkriptionsfaktoren haben eine hochkonservierte Struktur, die sich aus der DNA-Bindedomäne, einer konservierten NH₂-Domäne, einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne und SH2 wie SH3-Domänen zusammensetzt. Werden STAT-Proteine durch Effektormoleküle wie bei der Induktion der Signalgebung des IL7R durch

Januskinasen oder auch RTKs direkt an ihren Tyrosinresten phosphoryliert, so bilden sie ein Dimer und translozieren in den Nukleus, in dem sie spezifische Zielgene aktivieren. STAT-Proteine sind in das Zytokin-abhängige Zellwachstum und das Überleben der Zellen durch die Regulation der Expression von verschiedenen Cyclinen, c-myc und BCL-X_L eingebunden. Die Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren durch mutierte Rezeptor Tyrosinkinase ist ein häufig beobachteter Vorgang; so wurde sowohl über die Aktivierung von STAT3 durch den c-Kit Rezeptor als auch über die Aktivierung von STAT1 und STAT5 durch den PDGF Rezeptor β berichtet (Sternberg et al., 2001; Wilbanks et al., 2000).

Dass STAT5 eine sehr wichtige Rolle in der Entwicklung hämatopoetischer Zellen spielt, wird durch Analysen in IL7R^{-/-} Mäusen deutlich, die eine Blockade in der B-Zelldifferenzierung im Knochenmark aufzeigen. Wird aktiviertes STAT5 in diesen *knockout*-Mäusen exprimiert, so kann die weitere B-Zelldifferenzierung in den Mäusen wieder hergestellt werden (Goetz et al., 2004).

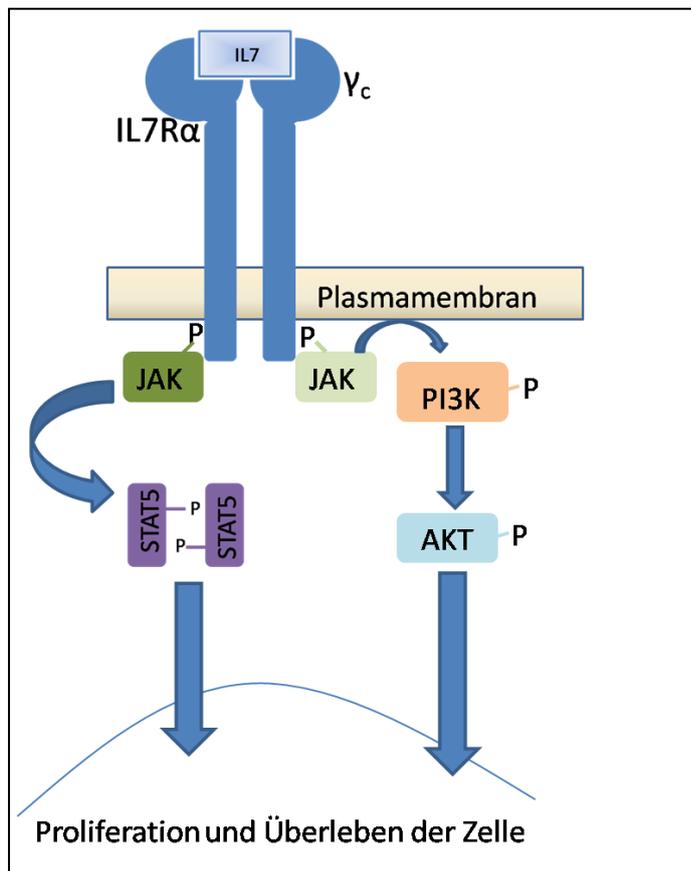


Abbildung 1.6:
Signaltransduktion des Interleukin 7 Rezeptors (IL7R).

Durch das Binden des IL7 Liganden an den Rezeptor, wird die Signaltransduktion initiiert. Als erster Schritt werden verschiedene Janus Kinasen (JAK 2 und 3) von dem Rezeptor phosphoryliert. Diese können im Gegenzug direkt STAT-Moleküle, wie STAT5 oder aber die PI3K phosphorylieren und aktivieren. So werden die Signale für das Überleben und für die Proliferation der B-Zelle übermittelt (AKT: Serin/Threonin Kinase AKT; JAK: Janus Kinase; PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase, STAT5: ‚Signal Transducer and Acitvator of Transcription‘ 5).

1.3.2 Der FLT3-Rezeptor

FLT3 (FMS-like Tyrosine Kinase 3) ist eine Rezeptor Tyrosinkinase (RTK), die der Klasse III der Familie der RTK angehört. Weitere Rezeptoren dieser Klasse, die eine hohe Ähnlichkeit zu FLT3 aufweisen, sind die Rezeptoren für c-Kit (Stem Cell Factor Receptor), PDGFR α/β (Platelet Derived Growth Factor alpha/beta) und M-CSF (Makrophage Colony Stimulating Factor) (Small, 2006, Paracells 2006). Das humane *FLT3*-Gen umfasst über 1000 Kilobasen und besteht aus 24 Exons, die auf Chromosom 13 (13q12) lokalisiert sind (Abu-Duhier et al., 2001; Lyman et al., 1993). Das *FLT3*-Gen kodiert für ein 993 Aminosäure großes Protein.

In der Western Blot Analyse können zwei verschiedene FLT3-Formen/Banden detektiert werden: Eine Bande bei 130 kDa, in der das FLT3-Protein unglykosyliert und nicht Membran-gebunden vorliegt und eine 160 kDa große Bande, die durch die N-terminale Glykosylierung des FLT3-Proteins zustande kommt (Lyman et al., 1993; Rosnet et al., 1993).

Die Abb.1.7 zeigt den schematischen Aufbau des FLT3-Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, dessen Aufgabe es ist, den FLT3-Liganden (FL) zu binden, besteht aus fünf Immunoglobulin-ähnlichen Domänen, die alle RTK der Klasse III aufweisen. Durch die Zellmembran ragt die Transmembrandomäne (TMD), an die sich die Juxtamembrandomäne (JMD) anschließt. In dieser JMD wurde die FLT3-Rezeptor aktivierende Mutation der internen Tandem Duplikation in Leukämiepatienten identifiziert (Litzow et al., 2005). Zwei weitere im Zytoplasma liegende und für die Signaltransduktion wichtige Domänen, die sich der JMD anschließen und die durch eine Interkinasedomäne voneinander getrennt sind, sind die zwei Tyrosin Kinase Domänen (TKD) (Lyman, 1995; Agnes et al., 1994; Grassot et al., 2003).

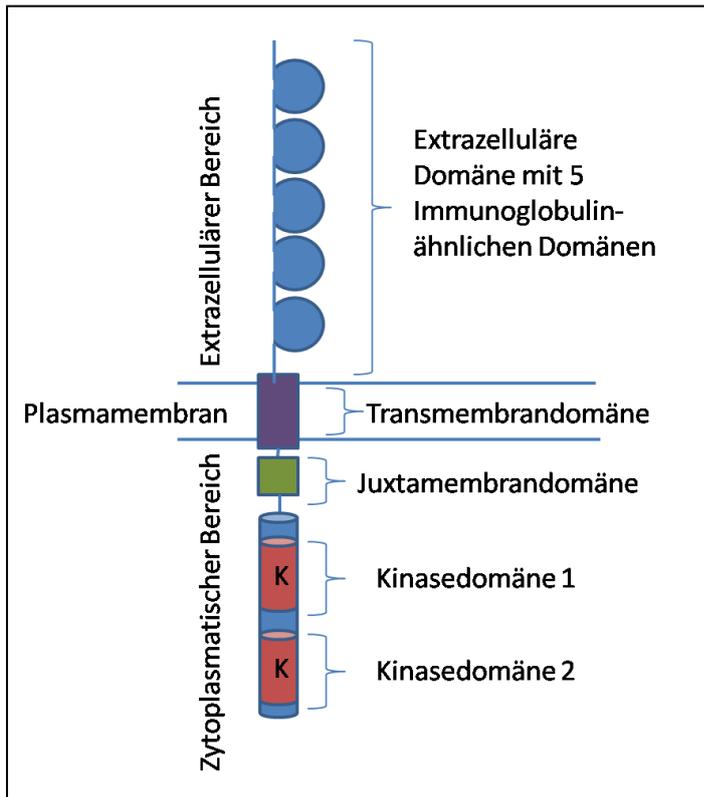


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der FLT3 Rezeptor Tyrosinkinase.

Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne mit 5 Immunoglobulin-ähnlichen Domänen (blaue Kreise), einer Transmembrandomäne (violettes Rechteck), einer Juxtamembrandomäne (grünes Rechteck) und zwei Kinasedomänen (jeweils ein roter Zylinder).

Abbildung modifiziert nach Small (Small 2000).

1.3.2.1 Signaltransduktion der FLT3-Rezeptor Tyrosinkinase

In dem inaktiven FLT3-Rezeptor wird die Aktivierungsschleife (*activation loop*) in der Tyrosinkinase Domäne stabil in der geschlossenen Konformation durch die gefaltete Struktur der Schleife in der Spalte zwischen der fächerförmigen Kinasekonformation gehalten (Huse und Kuriyan, 2002). Auch die Juxtamembrandomäne bleibt in einer gebundenen Konformation, die den Zugriff der Kinasedomäne auf ATP und Peptidsubstrate blockiert und somit den Status der Autoinhibition unterstützt. Durch die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne bildet FLT3 ein Homodimer aus. Die spezifischen Tyrosinreste 589 und 591 werden durch die Transphosphorylierung in der Juxtamembrandomäne von einem intrazellulären Bereich des einen Rezeptors auf den anderen Rezeptor des Dimers übertragen. Die Tyrosinreste dienen gleichzeitig als Bindestellen für verschiedene Adaptermoleküle, die eine Src Homologie 2 (SH2) Domäne oder eine Phosphotyrosin Bindedomäne (PTB Domäne) besitzen. Diese Adaptermoleküle rekrutieren und aktivieren durch Tyrosin- oder Serinphosphorylierungen stromabwärts von FLT3 gelegene Effektormoleküle, die den Ras/MAPK, PI3-Kinase und NF- κ B-Signalwegen angehören (siehe Abb.1.8). Unter den oben genannten Signalwegen agieren Ras/MAPK und PI3K meist als

onkogene Signalwege, wenn dessen Regulation zum Beispiel durch die konstitutive Aktivierung der Rezeptor Tyrosinkinase außer Kontrolle gerät.

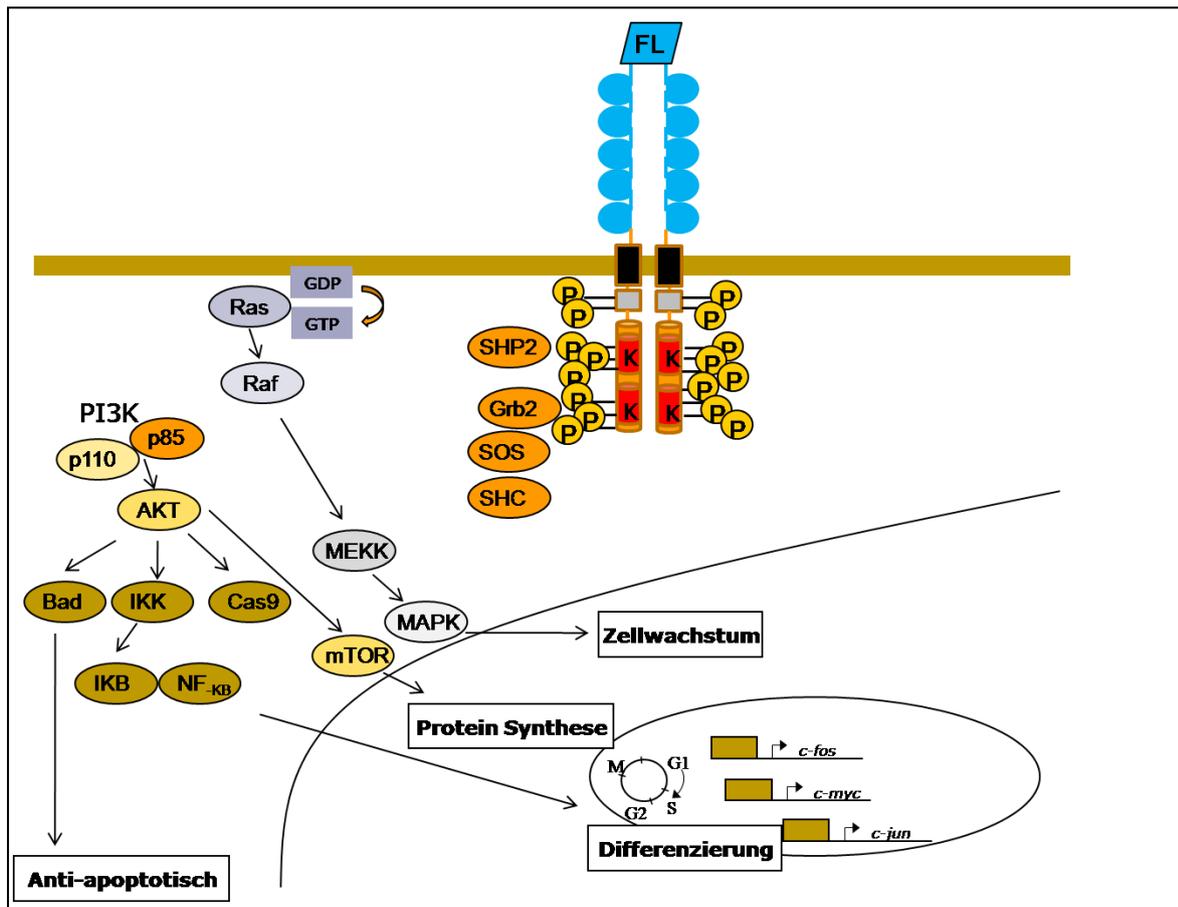


Abbildung 1.8: Signaltransduktion des FLT3-wt Rezeptors. Durch die Bindung des Liganden an einen FLT3 wt Rezeptor wird durch den dimerisierten Rezeptor der Ras/Raf/MAPK/ERK Signalweg und der PI3K/AKT Signalweg aktiviert. Abbildung modifiziert nach Matsumura, Mizuki und Kanakura, 2008. (AKT: Serin/Threonin Kinase Akt; Bad: BCL2-associated agonist of cell death; Cas9: Caspase 9; FL: FLT3-Ligand; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; Grb2: 'growth factor receptor-bound protein 2'; IKB: NF- κ B-Inhibitor ; K: Kinasedomäne; MAPK: 'mitogen activated protein kinase'; MEKK: MAPK Kinase; mTOR: 'mammalian target of Rapamycin'; NF- κ B: 'nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells'; P:Phosphatrest; PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase; Raf: Raf Protein; Ras: Ras Protein; SHP2: SHP2 Phosphatase; SOS: SOS-Protein; SHC: ',Src homology 2-domain –containing transforming protein').

Ras/Raf/MAPK/ERK Signalweg

Die Familie der Ras-Proteine gehört zu der übergeordneten Familie der GTPasen, die an der inneren Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert sind. Durch Liganden-Bindung aktivierte und autophosphorylierte Rezeptor Tyrosinkinasen, wie FLT3, bieten Phosphotyrosyl-Bindestellen für Adapterproteine wie Shc und Grb2, welche anschließend Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) rekrutieren und dabei Ras aktivieren. Wurde Ras aktiviert, so wird im Gegenzug die Raf Serin/Threonin Kinase aktiviert. Das Raf Protein phosphoryliert MAPK

Kinasen (auch MEK genannt) die zur Aktivierung der MAPK (auch ERK's genannt), führen. Aktivierte MAPK translozieren in den Zellkern und phosphorylieren/aktivieren Transkriptionsfaktoren. ERKs können auch andere Kinasen wie RSKs (MAPK-aktivierte Protein Kinasen) phosphorylieren, die wiederum Einfluss auf den Zellzyklus und den programmierten Zelltod (Apoptose) haben (Guy et al., 1999). Durch die ERK aktivierte RSK Kinasen wird das pro-apoptotisch wirkende Bad Protein inaktiviert, welches zur BCL-2 Familie der pro-apoptotisch wirkenden Proteine gehört. Dabei wird die Bad-abhängige Apoptose inhibiert. Außerdem steuert die Ras/Raf/MEK/ERK Kaskade die zelluläre Proliferation durch die Regulation der Expression und Aktivität vieler verschiedener Proteine, wie Zellzyklusregulatoren (Cyclin D1, p21^{WAF(1)} und p27^{KIP(1)}) und Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-jun und c-myc) (Grethe et al., 2006). Die krankhaft veränderte Expression von MEK und ERK Proteinen wurde in vielen Leukämien wie der akuten myeloiden Leukämie (AML) und der chronischen myeloiden Leukämie (CML) identifiziert (Lancet et al., 2003; Morgan et al., 2003).

PI3K/AKT Signalweg

Die PI3 Kinase ist ein wichtiges Signalprotein des gleichnamigen Signalweges, der Serin- und Threonin Phosphorylierungen kontrolliert. Die PI3K besteht aus zwei Untereinheiten, der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110. P85 bindet an die autophosphorylierte oder Liganden-aktivierte Rezeptor Tyrosinkinase FLT3 (Lavagna-Sevenier et al., 1998). Daraufhin werden die p110 Untereinheit und ihr stromabwärts gelegener Effektor AKT zur Plasmamembran rekrutiert. Der PI3K/AKT Signalweg aktiviert viele verschiedene Zielproteine wie p70RSK und Transkriptionsfaktoren wie ‚*Forkhead transcription factors*‘ FOXO und NF- κ B. Die Serin- Threoninkinase AKT ist ein wichtiger Bestandteil der Überlebensmaschinerie der Zellen. Durch die PI3K aktiviertes AKT trägt zu verschiedenen Signalgebungen bei: z.B. phosphoryliert es den NF- κ B Inhibitor IKB welcher anschließend im 26S Proteasom abgebaut wird und so NF- κ B frei lässt. NF- κ B wiederum ist in der Lage in den Zellkern zu wandern und eine Reihe von Zielgenen, die für das Überleben der Zelle essentiell sind, wie BCL-XL und IAPs, zu aktivieren (Vogelstein und Kinzler 2004). AKT ist ebenso in der Lage das pro-apoptotisch wirkende Bad-Protein zu phosphorylieren. Dies führt zu einem erhöhten Anteil an anti-apoptotisch wirkendem BCL-X_L Protein in der Zelle und zur Hemmung der Zelltod-Protease Caspase 9 (Erin et al., 2001). Ein weiterer stromabwärts der PI3K gelegener Effektor ist die Serin-Threonin-Kinase mTOR, die Zellüberleben und -proliferation vermittelt (Zhang et al., 1999).

1.4 Leukämie

Als Leukämie bezeichnet man eine Krebserkrankung der Blutzellen, die im Knochenmark heranreifen (siehe 1.1). In fast allen Leukämien handelt es sich um eine starke Erhöhung der Anzahl weißer Blutkörperchen verglichen zum Anteil der roten Blutkörperchen. Die Blutzellen sind durch genetische Veränderungen so transformiert, dass es ihnen möglich ist sich unentwegt zu teilen und so das gesamte Blutsystem und später auch die hämatopoetischen Organe wie die Milz und die Leber mit funktionsuntüchtigen Zellen zu überschwemmen. Sogar im Knochenmark kann die normale Blutbildung durch das hohe Vorkommen der leukämischen Zellen nicht mehr oder im geringen Maße stattfinden. Da wenig oder fast keine neuen normalen Blutzellen in einer Leukämie gebildet werden können, sind auch die normalen Organfunktionen gestört, was bei einer unbehandelten Leukämie zum Tod des Patienten führt.

Es gibt verschiedene Typen von Leukämien: Die chronischen Leukämien können in einem großen Zeitfenster verlaufen bis sie in die akute Phase eintreten, während die akuten Leukämien dagegen sehr schnell verlaufen. Sie führen unbehandelt in wenigen Wochen bzw. Monaten zum Tod des Patienten. Die Leukämien unterscheiden sich weiterhin nach der Art der betroffenen Blutlinien: so gibt es myeloische Leukämien, die die myeloischen Zelllinien betreffen, und die lymphoiden Leukämien, die die lymphoiden Zelllinien betreffen. Mithilfe der FAB-Klassifikation (French-American-British Working Group of Leukemia), die AMLs und ALLs nach zytomorphologischen und zytochemischen Kriterien unterteilt, können Subtypenklassen der Leukämien identifiziert werden. Die neuere WHO-Klassifikation umfasst dagegen nicht nur die Kriterien der FAB-Klassifikation, sondern kombiniert diese mit zyto- und molekulargenetischen Erkenntnissen. Sie versucht die Leukämie anhand der genetischen Veränderungen, die in den Zellen stattgefunden haben und der daraus abgeleiteten Prognoseabschätzung, einzuteilen. Die akuten Leukämien beider Blutlinien kennzeichnen sich durch eine auftretende Differenzierungsblockade, die in den jeweiligen myeloiden oder lymphoiden Vorläuferzellen zu finden ist (siehe Abb.1.9).

Die Inzidenz einer AML ist bei Kindern gering und steigt mit zunehmendem Alter an. Mit 2-3 Neuerkrankungen/100000 Einwohner/Jahr stellt sie die häufigste Form (80%) aller akuten Leukämien bei Erwachsenen dar. Die ALL ist mit einer Inzidenz von 1/100000 Einwohnern eine seltene Leukämieform. Allerdings ist sie häufigste Leukämieform bei Kindern, wohingegen sie bei Erwachsenen nur etwa 20% aller Leukämien ausmacht. Der Altersgipfel liegt bei dieser Erkrankung zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr bei Erwachsenen (Daten der

WHO aus dem Jahr 2005). Als Beispiel unterteilt die FAB-Klassifizierung die ALL nach der Morphologie (Zellgröße, Kern-Plasma-Relation, Anzahl und Größe der Nukleoli, Grad der zytoplasmatischen Basophilie) in drei Untergruppen (L₁-L₃).

- L₁: überwiegend kleine gleichförmige Blasten mit relativ großem Kern und dünnem Zytoplasmasaum (kindlicher Typ),
- L₂: größere heterogene Blasten mit Nukleoli und niedriger Kern-Zytoplasma-Relation (erwachsener Typ),
- L₃: Blasten mit Vakuolen und basophilem Zytoplasma, v.a. bei B-ALL (Burkitt-Typ).

Die FAB-Klassifikation hat jedoch wie bei der AML keine therapeutische und prognostische Relevanz. Deshalb ist es besonders wichtig für die Prognose der Patienten vor allem neben der Morphologie, dem Immunphänotyp und der Zytogenetik auch die Zelldifferenzierung und den Reifegrad der leukämischen Blasten festzustellen. Ein weiteres Kriterium für die Prognose ist die Feststellung chromosomaler Translokationen und der damit assoziierte Karyotyp.

Wie kommt es zur Entstehung einer Leukämie?

Bis in die 70er Jahre war die Ursache von Krebserkrankungen weitgehend unverstanden. Man vermutete, dass die Lebensweise und die Wirkung von Umweltfaktoren zur Krebsentstehung beitragen. Die aber wesentlichen Ereignisse sind hierbei Mutationen in Tumorsuppressor- oder Onkogenen im Genom einer Zelle, sodass Krebs letzten Endes eine genetische Erkrankung darstellt. Dabei wirken Onkogene auf die Zellvermehrung so stark aktivierend, sodass ein Tumor entstehen kann. Solange aber diese Gene in einer Zelle nicht mutiert sind, sondern ihre normale Funktion zur richtigen Zeit ausüben, spricht man von Proto-Onkogenen. Bei Tumorsuppressorgenen wiederum handelt es sich um normalerweise Wachstum-hemmende Gene, die dafür sorgen, dass das Wachstum einer Zelle zur richtigen Zeit wieder beendet wird. Wenn diese Tumorsuppressorgene durch Mutationen wie Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen deletiert oder inaktiviert werden, erlangen die betroffenen Zellen eine dauerhafte Teilungsfähigkeit. Aber auch eine gestörte Signaltransduktion der Zellen könnte zur Blockierung der apoptotischen Prozesse in einer Zelle führen und sie so resistent gegen apoptotische Signale werden lassen. Ein entscheidender Faktor ist, dass die leukämischen Zellen in einer akuten Leukämie in ihrer Differenzierung blockiert sind. Das bedeutet, dass sich die Zellen in einem Stadium der unreifen myeloiden oder lymphoiden Zellen befinden und nicht zur funktionalen Zelle der

entsprechenden Linie ausreifen können. Zusammenfassend müssen die leukämischen Zellen folgende Charakteristika erfüllen:

Ihre Differenzierung ist blockiert, ihr Selbsterneuerung-Potential muss verändert sein, während sie in der Lage sind sich ständig zu teilen und ihre Telomere nicht mit jeder Zellteilung verkürzt werden (Warner et al., 2004).

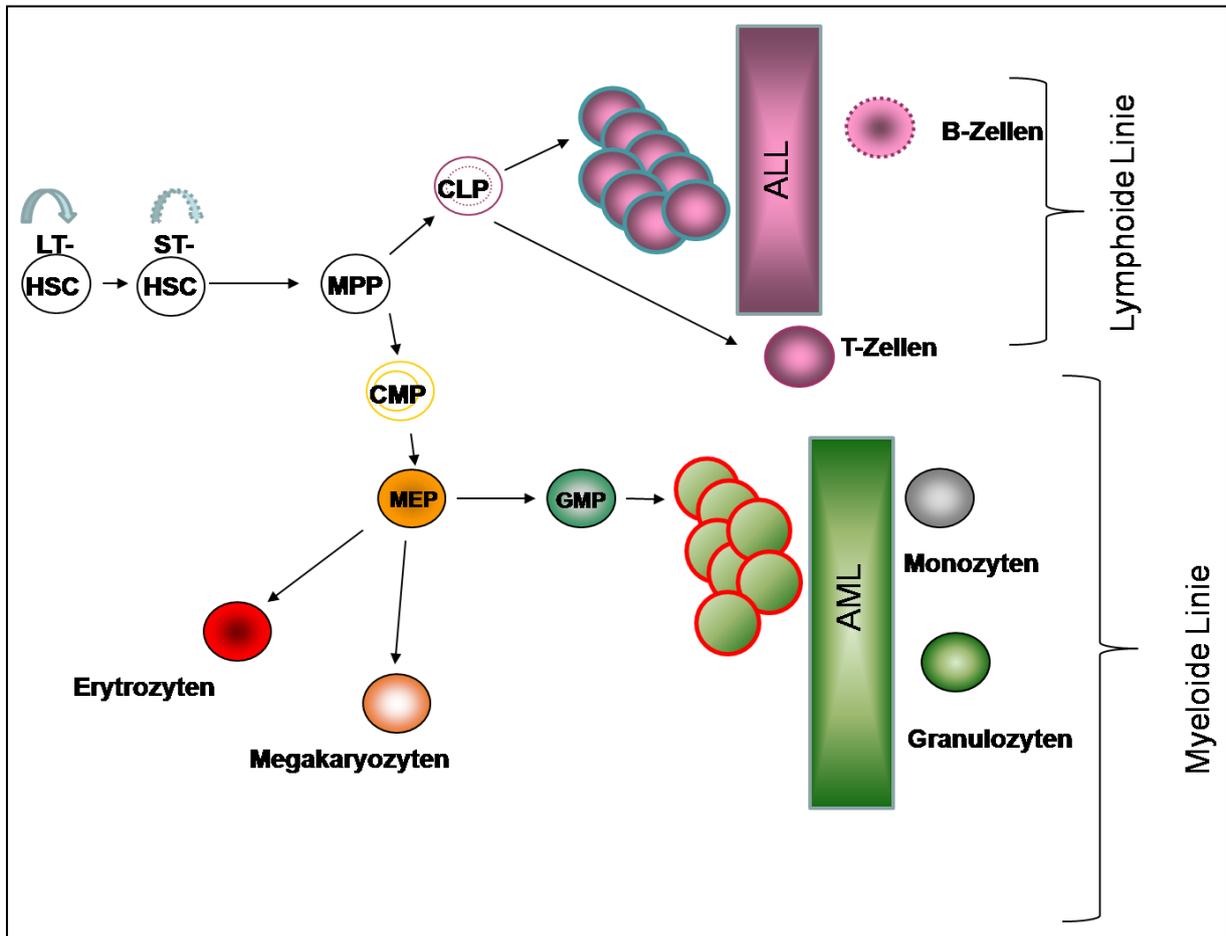


Abbildung 1.9: Entstehung einer Leukämie: akute lymphatische Leukämie (ALL) und akute myeloische Leukämie (AML) aus frühen Vorläufern der jeweiligen Blutzelllinie im Knochenmark. Die Leukämien sind jeweils durch eine Blockade der Differenzierung der verschiedenen Zellen (durch einen Balken) gekennzeichnet. (LT-HSC: Langzeit hämatopoetische Stammzelle; ST-HSC: Kurzzeit hämatopoetische Stammzelle; MPP: Multipotente Vorläuferzellen; CLP: lymphoide Vorläufer, CMP: myeloide Vorläufer; GMP: Granulozyten/Makrophagen-Vorläufer; MEP: Megakaryozyten/Erythrozyten-Vorläufer, MkpP: Megakaryozyten-Vorläufer; ErP: Erythrozyten-Vorläufer)

Welche Mutationen wurden bisher in akuten Leukämien identifiziert?

Allgemein wird davon ausgegangen, dass Krebserkrankungen durch mehrere genetische Veränderungen entstehen, die kooperierend auf die Zelle wirken und es ihr so ermöglichen

sich unkontrolliert zu teilen. Dash und Gilliland entwickelten zur der Hypothese ein Modell, welches davon ausgeht, dass eine Klasse eins Mutation mit einer Klasse zwei Mutation kombiniert werden muss, um die oben genannten Charakteristika einer Leukämie- bzw. Krebszelle zu erfüllen (siehe Abb. 1.10).

Klasse eins Mutationen betreffen nicht das Differenzierungsprogramm der hämatopoetischen Vorläuferzellen, während sie der Zelle einen Zellteilungs- und Überlebensvorteil verschaffen. Klasse zwei Mutationen verändern dagegen das Differenzierungsprogramm der Zelle. Die durch die beiden Mutationen entstandene leukämische Zelle zeigt eine Blockade in der Differenzierung, kann sich unkontrolliert teilen und hat gegenüber normalen hämatopoetischen Zellen einen Überlebensvorteil.

In der akuten myeloiden Leukämie sind für Klasse zwei Mutationen vor allem Mutationen in Genen, die verschiedene Transkriptionsfaktoren kodieren, bekannt. Dabei handelt es sich um Deletionen, Insertionen und auch Translokationen. Ungefähr 50% aller AML-Patienten besitzen eine solche Translokation, an der Gene, die Transkriptionsfaktoren kodieren, beteiligt sind. Diese Transkriptionsfaktoren sind für die normale Differenzierung von hämatopoetischen Zellen von Bedeutung (Tenen 2003). Eine besonders häufig auftretende Translokation ist dabei eine *RUNX1* (*Runt Related Transcription Factor 1*, oder auch AML1 genannt) Translokation mit dem *ETO* Gen (Eight Twenty One Oncogene), die in 8 bis 20% aller AML Patienten gefunden wurde (Gilliland et al., 2004). Das durch die Translokation t(8;21) entstandene Fusionsprotein wird AML1/ETO genannt und führt wahrscheinlich zu einer frühen Blockade der myeloiden Entwicklung (Schwieger et al., 2002; Klug et al., 2008). Mutationen der Klasse eins, die in akuten myeloiden Leukämien gefunden wurden, sind vor allem Mutationen in Tyrosinkinase wie zum Beispiel Mutationen des *c-Kit* Rezeptors, der zur gleichen Klasse der RTK wie FLT3 zählt, oder aber Mutationen in *RAS* (Gilliland und Tallmann 2002). *C-KIT* Mutationen treten besonders häufig in Patienten mit einer *AML1/ETO* Translokation auf (Warner et al., 2004). *RAS* und *C-KIT* Mutationen kommen in ca. 20% aller AML-Patienten vor (Renevillie et al., 2008). Weitere Klasse zwei Mutationen, die in ca. 30% aller AML-Patienten vorkommen, sind aktivierende FLT3-Mutationen (Small, 2006).

Erst in den letzten Jahren wurden immer mehr genetische Mutationen in ALL-Patienten identifiziert. Die Charakterisierung der Mutationen und somit eine gezieltere Therapie der ALL-Patienten steht bei der Forschung im Vordergrund. Durch neue angewandte Technologien, wie der SNP-Analyse (*Single Nucleotide Polymorphism*) ist es gelungen mehrere Mutationen/Deletionen in Transkriptionsfaktoren von Leukämiepatienten zu detektieren, die zum Ausbruch einer akuten lymphatischen Leukämie beigetragen haben

könnten (French et al., 2009, Mullighan 2009). Klasse zwei Mutationen in akuten lymphatischen Leukämien betreffen vor allem Mutationen in den Transkriptionsfaktoren PAX5 oder IKAROS (siehe Abb.1.10). Dabei kommen Mutationen in diesen beiden Genen sehr häufig in B-ALL Patienten vor (Pax5 30-50% (Nebral et al., 2009; Mullighan et al., 2007), Ikaros: 30-49%, (Mullighan et al., 2009; Iacobucci et al., 2008)).

Ein Beispiel für eine Deletion in einem Transkriptionsfaktor, die in akuten lymphatischen Leukämien gefunden wurden, ist die Deletion verschiedener Exons (meistens der Exons 3 bis 6) des Transkriptionsfaktors IKAROS. Diese führen zum Verlust verschiedener Zinkfinger des gebildeten Proteins, die für die DNA-Bindung an Zielgene benötigt werden. Die so entstandenen Isoformen des Proteins wirken dominant negativ und es wird vermutet, dass diese in den Patienten zu akuter lymphoblastischer Leukämie führen (Mullighan et al., 2009 und Mullighan und Downing, 2008). Andere Klasse zwei Mutationen in einem Transkriptionsfaktor, die in akuten lymphoblastischen Leukämien vorkommen, sind PAX5 (Paired box domain 5) Mutationen (Santoro et al., 2009; Nebral et al., 2008, den Boer 2009, Kawamata et al., 2008). Die Veränderungen im *PAX5* Gen umfassen partielle oder komplette Deletionen, Punktmutationen oder *PAX5* als Partner eines Fusionsgenes. In einer Studie von Familiades in 2009 wird davon ausgegangen, dass die *PAX5* Mutationen in 38,9% der 117 untersuchten B-ALL Patienten zu dem leukämischen Phänotyp beigetragen haben. Dabei kommen Klasse eins Mutationen in akuten lymphatischen Leukämien viel weniger häufig vor als im Vergleich zu akuten myeloiden Leukämien. Dennoch wurden unter anderem aktivierende Klasse eins Mutationen der Janus Kinasen 1-3 (*JAK1-3*) in ALL-Patientenproben identifiziert. Die Mutationen in *Jak2* wurden vor allem in Kindern mit Down-Syndrom identifiziert (Bercovich et al., 2008). Mutationen in allen vorher genannten *Jak*-Genen wurden in 10% der *BCR-ABL* Translokation negativen ALL Patienten einer Studie mit 187 Teilnehmern gefunden, denen eine besonders schlechte Prognose gestellt wurde (Mullighan et al., 2009). Die *JAK1* und *JAK2* Mutationen wurden vor allem in konservierten Aminosäureresten, die in der Kinase und Pseudokinasedomäne liegen, gefunden. Diese Mutationen führten vor allem zur konstitutiven Aktivierung der *JAK/STAT* Signalkaskade und zur Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation einer BaF/3.EpoR Zelllinie. Die Präsenz der *JAK2*-Mutationen ist vor allem mit Veränderungen in dem *IKAROS* kodierenden Gen *IKFZ1* verbunden sowie mit Deletionen in den ‚*cyclin dependent kinase inhibitor 2a und b*‘ kodierenden Genen *CDKN2A/B*. Die hier beschriebenen Mutationen sind besonders mit einer schlechten Prognose für die ALL-Patienten assoziiert (Mullighan 2008).

In den ALL-Patienten betreffen Klasse eins Mutationen auch Rezeptor Tyrosinkinase, wie zum Beispiel Mutationen in *FLT3*, die zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen (siehe 1.2.1).

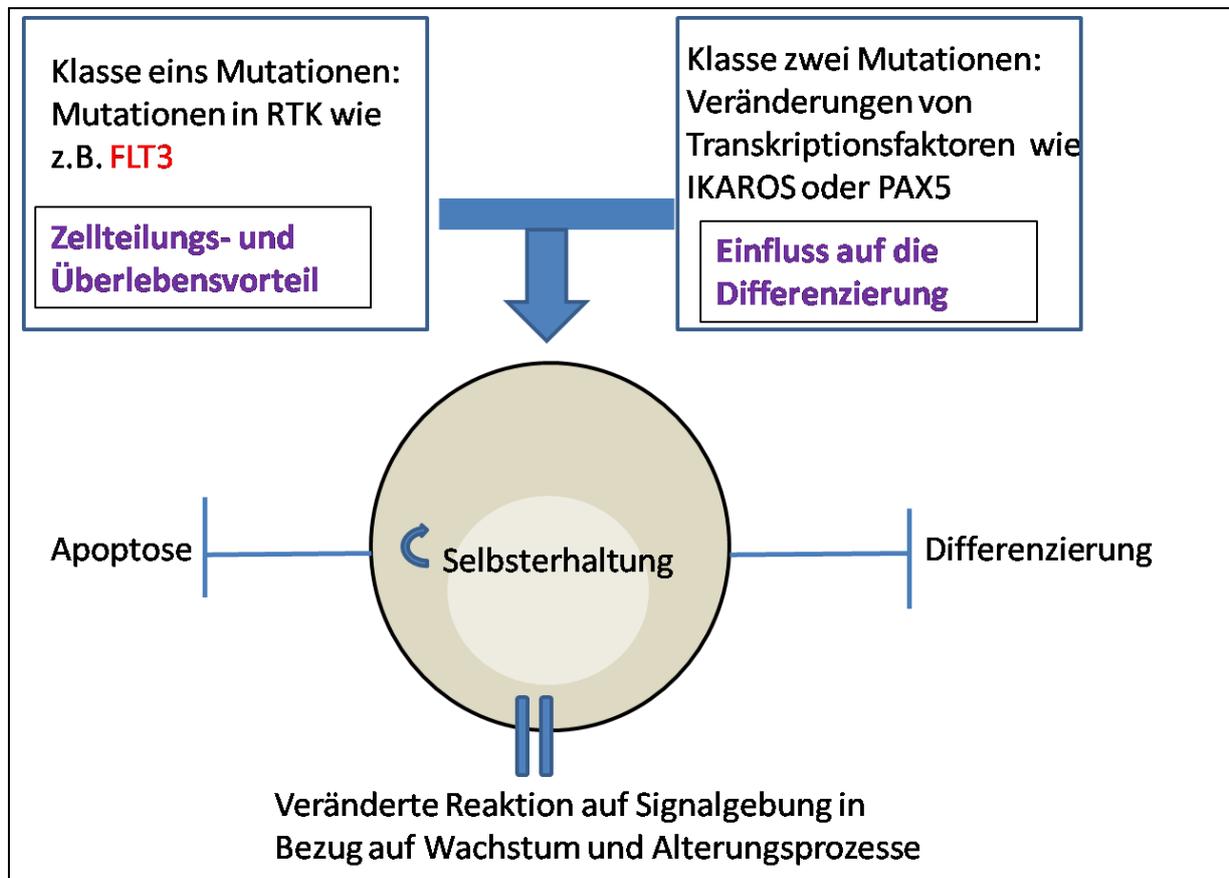


Abbildung 1.10: Entstehung einer leukämischen Zelle. Wie im Modell von Dash und Gilliland beschrieben, wirken Mutationen der Klasse eins und der Klasse zusammen auf eine hämatopoetische Zelle. Als Folge ist diese in ihrer Differenzierung blockiert, kann sich ständig teilen (Selbsterhalt) und die apoptotischen Signalwege werden umgangen. Die Signalantwort der Zelle im Hinblick auf die Proliferation und Alterungsprozesse, wie das Verkürzen der Telomere bei jeder Zellteilung, sind verändert.

1.5 Aktivierende *FLT3* Mutationen in Leukämien

Ein mutiertes *FLT3*-Gen ist eine der häufigsten somatischen Veränderungen in akuten myeloiden Leukämien, die in ca. 30% aller AML-Patienten aber auch in ALL-Patienten auftritt. Die zwei häufigsten Mutationen, die in *FLT3* identifiziert wurden, sind einerseits Punktmutationen, die meist an der Aminosäureposition D835 in der Kinasedomäne zwei auftreten (TKD betrifft 8-12% der AML-Patienten) und andererseits die Insertion einer internen Tandem Duplikation (ITD, betrifft etwa 20% der AML-Patienten) (Yamamoto et al.,

2001). Bisher besagt die Statistik der Patienten mit FLT3-Mutationen, dass Mutationen in den Kinasedomänen (TKD) vorwiegend mit dem Krankheitsbild einer ALL besonders im Kindesalter assoziiert sind (Taketani et al., 2003; Armstrong et al., 2004). Die FLT3-ITD Mutation dagegen wird eher mit dem Ausbruch einer AML assoziiert. Dennoch sind beide Mutationen nicht exklusiv in jeweils der vorher beschriebenen Leukämieform zu finden. So wurden auch ITD-Mutationen der FLT3-Rezeptor Tyrosinkinase in ALL von Patienten im Kindesalter wie auch in Erwachsenen identifiziert (Yokota et al., 1997, Nakao et al., 1996; Xu et al., 1999 und 2000; Brown und Small 2004).

Die FLT3-ITD Mutation kommt häufiger als die TKD-Mutation in Leukämiepatienten vor. Obwohl beide Mutationen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen, so scheinen doch die stromabwärts von FLT3 gelegene Signaltransduktion (Choudhary et al., 2005) und die resultierende Leukämie im Mausmodell unterschiedlich zu sein (Grundler et al., 2005). Ein möglicher Mechanismus, der erst kürzlich von Schmidt-Arras et al., 2009 beschrieben wurde, geht davon aus, dass FLT3-ITD als Mannose-gebundener Vorläufer an das Endoplasmatische Retikulum (ER) intrazellulär gebunden bzw. gespeichert wird. Es stellte sich heraus, dass die transformierende Aktivität der TKD Punktmutation (D835) durch das Binden an das ER unterdrückt wurde, während die FLT3-ITD Mutante im ER die STAT5 Aktivierungskapazität erhielt und weiterhin transformierend *in vitro* und *in vivo* wirkte. Dieses Ergebnis zeigte erstmals, dass die Transformation der Zellen von der intrazellulären Lokalisation von FLT3-ITD möglich ist.

Der genaue molekulare Mechanismus der beiden Mutationen, die den Rezeptor aktivieren, wurde bisher nur spekulativ geäußert. Bei den TKD Punktmutationen wird angenommen, dass sie die Aktivierungsschleife destabilisieren und diese so in eine offene Konformation bringen (Griffith et al., 2004). Die Signaltransduktion der TKD FLT3-Mutante scheint mit der Liganden stimulierten wt-Form des FLT3-Rezeptors übereinzustimmen (Choudhary et al., 2005, Schmidt-Arras et al., 2009). Der genaue Mechanismus der Rezeptor-Aktivierung durch die ITD-Mutation ist noch nicht aufgeklärt aber es wird spekuliert, dass die ITD den intrinsisch-negativ regulierenden Effekt der JMD auf die Tyrosinkinase Domäne zerstört. Durch die Konformationsänderung, die durch die ITD hervorgerufen wurde, wird die Phosphoryl-Akzeptor Seite in der TKD irreversibel offen gelegt, sodass ATP und Peptidsubstrate stetig in der Lage sind, an die Kinasedomäne zu binden (Kiyoi et al., 2002).

Um die Signaltransduktion des aktivierten FLT3-Rezeptors, wie der RAS/RAF/MK/ERK oder der PI3K/AKT Signalweg oder die Aktivierung des STAT5 Proteins, in dieser Arbeit zu untersuchen, stand ein Mausmodell zur Verfügung (siehe Abb. 1.11). Ein Mausmodell,

welches die Entwicklung einer Leukämie *in vivo* nachahmen kann, ist ein wichtiges Werkzeug in der Forschung, um die für die Leukämie wichtigen Signalwege identifizieren zu können. Zudem kann in dem Mausmodell gut die Funktion von neuen Inhibitoren getestet werden. Eine weitere Möglichkeit, die das Modell bietet, ist Suche und die Identifikation von in unserem Fall die mit FLT3-ITD kooperierenden Mutationen, die möglicherweise zu der Entstehung der akuten lymphatischen Leukämie im vorliegenden Mausmodell beigetragen haben könnten.

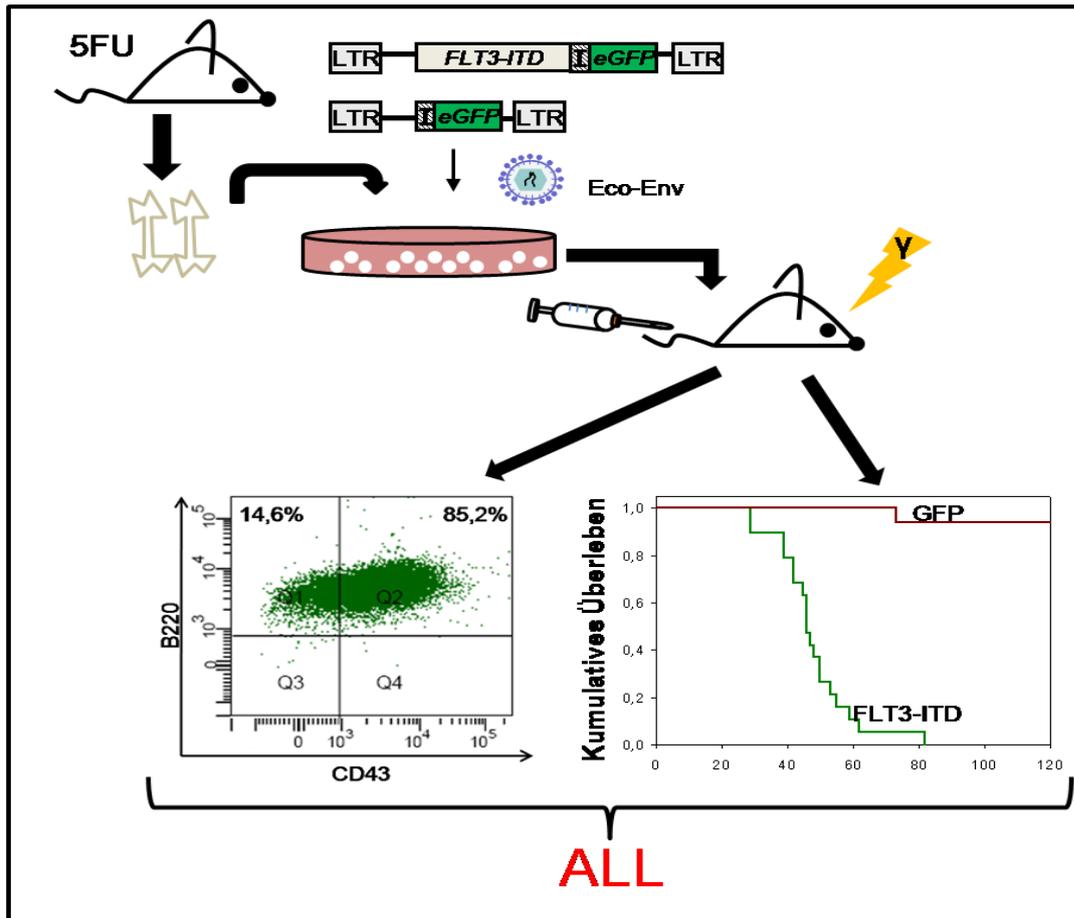


Abbildung 1.11: Versuchsaufbau der FLT3-ITD Mausversuche. Frühe hämatopoetische Vorläufer wurden durch die Gabe von 5FU im Knochenmark C57BL/6 Mäuse angereichert und nach 5 Tagen isoliert. Das Knochenmark wurde mit zwei verschiedenen retroviralen Vektoren, die entweder nur das Reportergen GFP oder aber GFP zusammen mit FLT3-ITD exprimierten, infiziert. Die Zellen wurden i.v. in lethal bestrahlte Empfängertiere transplantiert. Nach einer medianen Latenzzeit von 40 Tagen erkrankten die Tiere an einer B-Zell Leukämie, welches die FACS-Analyse ergeben hat.

1.6 Fragestellung

Das *FLT3*-Gen, welches für die Rezeptor Tyrosinkinase (RTK) FLT3 kodiert, ist eines der häufigsten mutierten Gene, die in Patienten mit akuten Leukämien gefunden wurden. Die Rezeptor Tyrosinkinase wird normalerweise in frühen myeloiden und lymphoiden hämatopoetischen Zellen exprimiert und beeinflusst durch ihre Signalgebung die Differenzierung, die Zellteilung und die Apoptose der Zellen.

Durch Punktmutationen in den Kinasedomänen des Rezeptors oder aber durch das Einfügen einer internen Tandem Duplikation (ITD) in der Juxtamembrandomäne, die häufiger als die Punktmutation in Patienten vorkommt, wird die RTK konstitutiv aktiv. Da diese aktivierenden FLT3-Mutationen häufig in akuten Leukämien auftreten, ist der Rezeptor ein viel versprechendes Ziel von Therapieansätzen mit Inhibitoren, die die Liganden-unabhängige aktive RTK hemmen sollen. In der Arbeitsgruppe der Molekularen Pathologie am Heinrich-Pette-Institut wurde bereits ein FLT3-ITD Mausmodell etabliert. Dabei wurde murines Knochenmark mit einem retroviralen Vektor, der das mutierte FLT3 trug, infiziert und in konditionierte Mäuse transplantiert. Die Mäuse entwickelten eine frühe akute lymphoblastische B-Zell Leukämie (ALL).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Signaltransduktion des FLT3-ITD Rezeptors in murinen Tumorzellen charakterisiert werden. Mit Hilfe von Protein-chemischen Methoden sollen ausgewählte Signalwege der FLT3-ITD Tumorzellen mit denen normaler B-Zellen, die sich im selben Differenzierungsstadium befinden wie die FLT3-ITD Tumorzellen, verglichen werden. Die in den Tumorzellen aktivierten Signalwege sollen durch die Behandlung mit niedermolekularen Inhibitoren oder dominant negativen STAT5-Mutanten gehemmt werden, um so die Bedeutung des jeweils gehemmten Signalweges für die Proliferation und Apoptose der Tumorzellen analysieren zu können. Die Analyse der aktivierten Signalwege gibt möglicherweise auch Aufschluss darüber, warum die Zellen in ihrer Differenzierung blockiert sind, denn es ist durch einige Studien bekannt, dass die andauernde Signalwirkung einer Rezeptor Tyrosinkinase die Prozesse der Differenzierung, Proliferation und Apoptose stört und so zur Entstehung einer Leukämie beitragen kann. Eine weitere Frage in diesem Zuge ist die Ermittlung von weiteren Mutationen, die spontan oder aber durch die Integration des Provirus zustande gekommen sein könnten. In diesem Zusammenhang sollte die Klonalität der verschiedenen FLT3-ITD Tumore durch Southern Blot Analysen ermittelt werden. Mittels LM-PCR sollen verschiedene FLT3-ITD Tumore auf ihre retroviralen Integrationsstellen hin untersucht werden. So könnten mit FLT3-ITD kooperierende Mutationen identifiziert werden, die möglicherweise zur Entstehung der B-Zell ALL im Mausmodell beigetragen haben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Sofern nicht anders angegeben wurden Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), MERCK (Darmstadt), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), BD Beckton-Dickinson (Heidelberg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) verwendet. Es wurden Plastikwaren von den Firmen Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Solingen) verwendet.

2.1.1 Geräte

Entwicklermaschine	AGFA Classis EOS	Siemens (Erlangen)
ELISA-Reader	sunrise	Tecan (Crailsheim)
Durchflusszytomter	FACSCanto	Becton Dickendson (Franklin
Durchflusszytomter – Sorter	FACSAria	Lakes, USA)
Geldokumentation	BioDocAnalyze	Biometra (Göttingen)
Mikroskop	Axiocert 25	Zeiss (Oberkochen)
	IM	Zeiss (Oberkochen)
pH-Meter	CG842	Schott Geräte (Mainz)
Photometer	SmartSpec™3000	BioRad (München)
Power supply	power supply E835	Consort (Turnhoud, Belgien)
TopCount	NXT	Packard Instrument (Dreieich)
Thermocycler	T3	Biometra (Göttingen)
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD270	Bandelin (Berlin) Szintillator
Zentrifugen	Allegra-6KR	Beckmann (München)
	Rotor:GH-3.8	
	Sorvall RC5B Plus	DUPONT (Bad Homburg)
	Rotor: SLA-1500	

	Rotor: SS-34	
	Allegra X-12R	Beckmann (München)
	Rotor: SX4750A	
Zellkulturbrutschränke	Hera cell 150	Heraeus (Hanau)
Zellkulturwerkbank	Hera safe	Heraeus (Hanau)

2.1.2 Kits

Die Anwendung der Kits erfolgt, wenn nicht anders beschrieben, nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Bio-Rad <i>DC</i> Protein Assay	Biorad (München)
peqGOLD TriFast™	Peqlab (Erlangen)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Profection Mammalian Transfection System	Promega (Madison, USA)
Calcium Phosphate Kit	
Taq PCR Core Kit	Qiagen (Hilden)
Ultrafree-DA Centrifugal Filter Unit	Millipore (Schwalbach)

2.1.3 Oligonukleotide und Enzyme

Alle in dieser Arbeit genutzten Primer für die verschiedenen PCRs/ LM-PCRs sind in der folgenden Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Genutzte Oligonukleotide (Primer)

Gen	Bez.	Richtung	5'-3'-Sequenz	Amplikon
β-Aktin	cs21	vorwärts	CGCTGCGCTGGTCGTCGACA	473 bp
	cs22	rückwärts	CAGCACAGCCTGGATGGCTA	
HPRT		vorwärts	CACAGGACTAGAACACCTGGC	248 bp
		rückwärts	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	
STAT4	Cs1009	vorwärts	CATCCCTGAAAACCCTCTGA	253 bp
	Cs1010	rückwärts	GACATGGGGAGAAGGTCTGA	
Ptpn1	Cs1173	vorwärts	CGGCTTGACATGCAGAAG	173 bp
	Cs1174	rückwärts	CCTTGTCGATCTCCTCGAAC	
Tob2	Cs1175	vorwärts	GTGCAGGTCGTTGAGACTGA	256 bp
	Cs1176	rückwärts	CGGTGTCCTTTTACGTCGTT	
Mrvi1	Cs1089	vorwärts	CACCTGGGCTCAAAGACTTC	203 bp
	Cs1090	rückwärts	GCGCAGCAATATGTCAGAAA	
LC1	Cs949	vorwärts	GAC CCG GGA GAT CTG AAT TC	
LTRII	Cs947	rückwärts	CCT GAC CTT GAT CTG AAC TT	
LC2	Cs950	vorwärts	AGT GGC ACA GCA GTT AGG	
LTR III	cs948	rückwärts	TGG CTG TAC TTA AGC TAG CTT	
LTRI-Biotin biotinyliert		vorwärts	TCT GGG GAC CAT CTG TTC TTG GCC C	
Linker 1			GAC CCG GGA GAT CTG AAT TCA GTG GCA CAG CAG TTA GG	
Linker 2			CCT AAC TGC TGT GCC ACT GAA TTCAGA TCT CCC G	

Die mit den Primern für die LM-PCR amplifizierte Fragmente sind in ihrer bp-Länge variabel.

Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von MBI-Fermentas bezogen und nach Herstellerangaben für die verschiedenen Restriktionen eingesetzt.

2.1.4 Medien

2.1.4.1 Bakterienkulturmedien

Die Zusätze für die Bakterienmedien wie Bacto-Trypton und Hefeextrakt stammten von Becton-Dickinson (Sparks, MD, USA).

Luria-Bertani (LB) -Medium	10 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Bacto-Hefeextrakt
	10 g/l NaCl; pH 7,5 eingestellt mit NaOH

LB-Agar	LB Medium
	15 g/l Agar

Die Medien wurden 20 min bei 121°C (1,1 kg/cm²) autoklaviert. Dem Flüssigmedium wurde vor Gebrauch 100 µg/ml Ampizillin zugesetzt. Dem Agar wurde nach Abkühlen auf 55°C Ampizillin (100 µg/ml) zugesetzt, bevor es in Petrischalen gegossen wurde.

2.1.4.2 Medien, Reagenzien sowie Lösungen für Zellkultur und Mausversuche

Zellkulturlösungen und Reagenzien

BSA-Lösung	2% BSA, Zellkultur getestet
Chloroquine-Lösung	25 mM Chloroquine in 1Xpbs
CaCl ₂ -Lösung	2,5 mM CaCl ₂ in PBS

FCS	Fötales Kälberserum (Sigma, Taufkirchen)
G418 / Neomycin	1 µg/ml Lösung (Sigma, Taufkirchen)
PBS	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PenStrep	5000 U/ml Penizillin, 5000 µg/ml Streptomycin
Polybrene-Lösung	8 mg Polybrene (Sigma, Taufkirchen) pro ml PBS
Lyse-Puffer	10% (v/v) BD PharmLyse 10 x Konzentrat in Wasser
Serum Supreme	Synthetisch modifiziertes Kälberserum (Cambrex Biosciences, Verviers, Belgien)
Trypsin-Lösung	20% (v/v) Trypsin/EDTA 10 x Konzentrat (Biochrom Berlin) in Wasser

Zytokine

Für alle Zellkulturversuche der FLT3-ITD Tumorzellen wurde ausschließlich das murine Interleukin 7 (Cellsystems, St.Katharinen) genutzt.

Zellkulturmedien

DMEM Medium	DMEM (PAA, Pasching, Österreich), 10%(v/v) Serum Supreme für Phoenix-gp oder FCS für Sc-1 und 293T Zellen; 671,4 mM Glutamin, 1 mM Natrium Pyruvat; pH8,2 eingestellt mit Natrium-hydrogencarbonat
DMEM-HEPES-Medium	DMEM, 20 mM HEPES; pH 7,2
DMEM-Polybrene-Medium	DMEM, 8 µg/ ml Polybrene
Einfriermedium	90% (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO
IMDM	IMDM Pulver gelöst in Wasser (auf 280 mOS); pH 7,6
IMDM-Medium	IMDM, 20% FCS, 1% PenStrep, 2% Glutamin, 1% Natrium-Pyruvat

Methylzellulose	M3231 (Stem Cell Technologies, Köln) Methylzellulose an murine Bedingungen angepasst mit 20% IMDM ohne Zusätze angesetzt.
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (GIBCO BRL, Life Technologies) 10% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat

Lösungen und Reagenzien für Mausversuche

Für die Mausversuche wurde eine orale Lösung Baytril® (Wirkstoff Enrofloxacin) für eine Dauer von 3 Wochen genutzt. Für die Anreicherung von frühen hämatopoietischen Zellen wurde Mäusen das Chemotherapeutikum Fluoruracil (5-FU) von GRY-Pharma GmbH (Kirchzarten) nach Herstellerangaben verabreicht. Für die Konservierung der entnommenen Knochen und Organe wurde Pro Taqs CALfix oder Formalin-Lösung (10%ige Lösung in Wasser) genutzt.

2.1.5 Bakterienstämme

Für diese vorliegende Arbeit wurde der *Escherichia coli* Laborstamm XL-10-GOLD® (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Die Herstellung kompetenter Bakterien mit Kalziumchlorid, die Transformation sowie die Kultivierung und Stammhaltung erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook und Russel, 2001).

2.1.6 Mausstämme

Die Retransplantations-Experimente wurden ausschließlich mit C57BL/6 Mäusen (Jackson Laboratory) durchgeführt.

2.1.7 Zellen

2.1.7.1 Primäre Zellen

Primäre Zellen aus murinem Knochenmark

Die Gewinnung der Knochenmarkzellen erfolgte aus FLT3-ITD Versuchstieren sowie aus C57BL/6 wt Mäusen und wird im Methodenteil (2.2.) ausführlich erläutert.

2.1.7.2 Zelllinien

Phoenix –gp	Derivat der aus humanen, embryonalen Nierenzellen gewonnenen Zelllinie 293T mit stabiler Expression der <i>gag</i> und <i>pol</i> Genprodukte. Diese Zellen (#3514) werden bei ATCC kommerziell vertrieben. Die Kultivierung erfolgte im DMEM Medium mit Serum Supreme.
Sc-1	Aus Mausembryo-Fibroblasten gewonnene Zelllinie, ATCC ,CRL-1404. Die Kultivierung erfolgte im DMEM Medium.
293T	Derivat der humanen embryonalen Nierenzellen 293 (ACC #305). Trägt eine Temperatur-sensitive Mutante des SV-40 <i>large T-antigen</i> .
15-6;p3	FLT3-ITD Tumorzelllinie. Diese GFP und B220/CD43 positiven Zellen wurden aus B-Zell ALL erkrankten Mäusen aus Experiment 35 gewonnen und in Methylzellulose mit IL7 kultiviert.

2.1.8 Puffer

2.1.8.1 DNA-analytische Methoden

Gelelektrophorese

1x TAE	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
1 x TAE mod	modifizierter TAE Puffer: 40 mM Trisacetat (pH 8,0), 0,1 mM EDTA
1 x TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TE	10 mM Tris/HCL (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0)

Isolation genomischer DNA aus Organen oder Zellen

Puffer 1	75 mM NaCL, 25 mM EDTA (pH 8,0)
Puffer 2	10 mM Tris/HCL (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM NaCl. Vor Gebrauch Zugabe von 1% SDS und 200 µg/ml Proteinase K.

Southern Blot Verfahren

20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0)
50 x Denhardt	1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1 % (w/v) BSA
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris (pH 7,5)
Hybridisierungspuffer	6 x SSC, 0,5 M deionisiertes Formamid, 0,5% SDS, 2,5 x Denhardt, 8% Dextransulfat, 100 µg/ml Lachssperma DNA, die vorher per Polytron gespalten wurde
Waschlösung I	2 x SSC
Waschlösung II	0,1 x SSC, 0,1% SDS

LM-PCR

2 x Waschpuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl
5 x Hybridisierungspuffer	500 mM Tris(pH 7,4), 350 mM MgCl ₂

2.1.8.2 Proteinbiochemische Methoden

10 x TBS	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)
TBS-Tween	1 x TBS, 0,5 % Tween 20
TCA Lysepuffer	100 mg Trichloracetat in 100 ml 150 mM NaCl-Lösung
10 x Laufpuffer	2 M Glycin, 250 mM Tris Basee
1 x Laufpuffer	1:10 Verdünnung 10 x Laufpuffer, 1% SDS
10% APS	1g APS in 10 ml ddH ₂ O
Sammelgelpuffer	500 mM Tris Base, 0,1% SDS (pH 6,8 mit HCl eingestellt)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base, 0,1% SDS (pH 8,8 mit HCl eingestellt)
Sammelgel (5%ig)	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED

Trenngel (8,5%ig)	370 mM Tris/HCl (pH 8,8), 8,5% Acylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED
2 x Probenpuffer	250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% SDS, 25% Glycerol
3 x Probenpuffer	180 mM Tris/HCl (pH 6,8), 6% SDS, 28% Glycerol, 0,001% Bromphenolblau
Transferpuffer	1 x Laufpuffer, 20% (v/v) Methanol
Block-Lösung	1 x TBS, 0,5% Tween, 5% Magermilchpulver
Wasch-Puffer	1 x TBS, 0,5% Tween
ECL-Stripping buffer	62,5 mM Tris, 2% (w/v) SDS, 100 mM Beta-Mercaptoethanol (pH 6,8)

2.1.9 Antikörper und Inhibitoren

2.1.9.1 Western Blot Antikörper

Für alle in dieser Arbeit gezeigten Western Blot Analysen wurden die in Tabelle 2 angegebenen Antikörper verwendet.

Tabelle 2: Western Blot Antikörper

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	gelöst in	Firma
β-Aktin	Maus	1:10000	2 % BSA	Sigma
Akt	Kaninchen	1:1000	5 % MP	CST
Cyclin D1	Maus	1:1000	2 % BSA	Calbiochem
FLT3 (8F2)	Kaninchen	1:1000	5 % BSA	CST
Gapdh	Maus	1:2000	5 % MP	Santa Cruz
HA	Ratte IgG1	1:1000	5 % MP	Roche
MAPK	Kaninchen	1:5000	5 % MP	Santa Cruz
Phospho-Akt (S473)	Kaninchen	1:2000	2 % BSA	CST
Phospho-FLT3 (Y591)	Kaninchen	1:1000	2 % BSA	CST
Phospho-MAPK	Maus	1:1000	2 % BSA	CST

Phospho-STAT5 (Y694)	Kaninchen	1:2000	2 % BSA	CST
STAT5	Maus	1:2000	2 % BSA	BD

Die Sekundärantikörper waren mit Meerrettichperoxidase-konjugiert (Horseradish peroxidase, HRP) und wurden von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) bezogen. Sie wurden 1:5000 in TTBS mit 5% Milchpulver (w/v) verdünnt.

Tabelle 3: Sekundär-Antikörper für die Western Blot Analysen

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	gelöst in	Firma
Anti-mouse-IgG-HRP	Ziege	1:5000	2% MP	Santa Cruz
Anti-rabbit-IgG-HRP	Ziege	1:5000	2% MP	Santa Cruz
Anti-goat-IgG-HRP	Kaninchen	1: 5000	2 % MP	Santa Cruz

2.1.9.2 Durchflusszytometrie

Die in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper wurden gemäß den Herstellerangaben zur Färbung von murinen Zellen eingesetzt.

Tabelle 4: Antikörper anti-Maus

Antikörper	Fuorochrom	Hersteller	Klon	Katalognummer
CD43	Biotin + SA- APC	BioLegend	1B11	#121214
B220	PE	BioLegend	RA3-6B2	#103208
IgM	Biotin + SA- APC	BioLegend	RMM1	#406504
Sekundärantikörper				
Streptavidin (SA)	APC	BioLegend	-	#405207

2.1.9.3 Inhibitoren

Die in Tabelle 5 dargestellten Inhibitoren wurden für die Hemmversuche verschiedener Signalwege in den FLT3-ITD Tumorzellen verwendet. Die Inhibitoren wurden stets in DMSO laut Herstellerangabe verdünnt.

Tabelle 5: Inhibitoren

Inhibitor	Gehemmte Kinase	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
PKC412	FLT3	Roche	100 nM
U0126	MEK1 und MEK2	Calbiochem	20 µM
Ly294002	PI3K	Calbiochem	20 µM
PP2	Src-Kinasen	Calbiochem	15 µM

2.1.10 Plasmide

R bezeichnet Plasmide, die im Labor der molekularen Pathologie hergestellt wurden und # bezeichnet Plasmide, die aus anderen Quellen bezogen wurden.

Retrovirale Konstrukte

- #634 pMys-i-GFP, γ -retroviraler Vektor, trägt als 3'LTR das MPSV (Kitamura et al., 2003)
- R1079 pMys-FLT3/ITD-i-GFP, trägt als 3'LTR das MPSV
- R338 p5O-M-X-neo; retroviraler Vektor basierend auf dem MESV mit Neo^R; trägt als 3'-LTR das MPSV (Prassolov et al., 2001)
- R1379 p5O-M-STAT5A DN-neo; retroviraler Vektor basierend auf dem MESV mit Neo^R; trägt als 3'-LTR das MPSV, im Rahmen dieser Arbeit wurde über die EcoRI-Schnittstelle die cDNA, die für DN STAT5A kodiert, in den Vektor R338 ligiert

R1380 p5O-M-STAT5B DN-neo; retroviraler Vektor basierend auf dem MESV mit Neo^R; trägt als 3'-LTR das MPSV, im Rahmen dieser Arbeit wurde über die EcoRI-Schnittstelle die cDNA, die für DN STAT5B kodiert, in den Vektor R338 ligiert

Helferplasmide für die Virusproduktion

#522 pEcoenv-I-puro, trägt das ökotrope *env*-Gen unter der Kontrolle des EF1 α Promotors (Morita et al., 2000)

R690 pSV40-gag-pol; trägt die MoMLV *gag*- und *pol*-Gene unter der Kontrolle des SV40 Promotors (Beyer et al., 2002)

2.2 Methoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden mit den im Materialenteil (2.1.) beschriebenen Substanzen sowie Materialien durchgeführt. Die Hersteller der verschiedenen Komponenten sind dem Materialteil (2.1.) zu entnehmen.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der in dieser Arbeit benutzten Zellen erfolgte in Standard-Brutschränken bei 37°C und 95% H₂O-Sättigung. Die Pufferung der Medien erfolgte mit Hydrogencarbonat und 5% CO₂.

2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die adhärenenten Phoenix-gp-Zellen wurden in beschichteten Gewebezellplatten in DMEM-Medium subkonfluent gehalten. Gleiches gilt für die 293T-Zellen, welche jedoch in größerem Maßstab in Kulturflächen gehalten wurden. Mediumwechsel und Subkultivierung der Zellen erfolgte im 2-2-3-Tage-Rhythmus. Die FLT3-ITD Tumorzellen wurden in Methylzellulose mit murinem IL7 gehalten. Der Mediumwechsel erfolgte alle 7 Tage, dabei wurden die Zellen mit 1 x PBS aus der Kulturschale gelöst und auf 15 ml in einem 15 ml Röhrchen aufgefüllt und 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zum Zählen in 1 ml 1xPBS aufgenommen. 1 x 10³ FLT3-ITD Zellen wurden pro ml Methylzellulose eingesät. Primäre murine Zellen wurden in IMDM Medium kultiviert.

2.2.1.2 Gewinnung von Primärzellen aus murinem Knochenmark

Die Tiere, die zuvor mit FLT3-ITD Zellen retransplantiert und mit Ether narkotisiert wurden, konnten durch Genickbruch abgetötet werden. Durch Ausspülen des Knochenmarks mittels einer Spritze gefüllt mit IMDM-Medium aus Tibiae und Femurae wurden Tumorzellen gewonnen. Nach dem Waschen der Zellen (1 x PBS versetzt mit 5% FCS, Zentrifugation 5 min, 1200 rpm, 20°C) wurden diese in Lysepuffer aufgenommen, um durch einen osmotischen Schock die Erythrozyten zu zerstören. Nach erneuter Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen wurde das Zellpellet in IMDM-Medium aufgenommen bis eine Zellsuspension mit etwa 3×10^6 Zellen vorlag. Die Tumorzellen wurden für die Sortierung durch das Durchflusszytometer vorbereitet.

2.2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen aus der Methylzellulose wurden für das Einfrieren mit 1 x PBS aus der Zellkulturschale gelöst und anschließend 5 min bei 1200 rpm und 20 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. In einem gekühlten Einfriercontainer (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Rochester, USA) bei -70°C eingefroren. Nach 24h wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff zur Langzeitkonservierung überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff geholt, zügig in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und steril in 10 ml IMDM-Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 1x PBS aufgenommen; die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^3 Zellen in Methylzellulose supplementiert mit 10 ng/ml IL7 eingesät.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Trypanblaufärbung ermöglicht eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Während erstere den Farbstoff nur nach längerer Inkubationszeit aufnehmen, werden tote Zellen aufgrund der geschädigten Zellmembran innerhalb von kürzester Zeit gefärbt. Zur Zellzählung wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblaulösung (0,4%ig, Sigma, Taufkirchen) verdünnt und nach einminütiger Inkubation der Anteil der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer ermittelt.

2.2.1.5 Herstellung retroviraler Pseudotypen

Zur Herstellung der viralen infektiösen Partikel, die für die Infektion von Knochenmarkszellen sowie für die Infektion von FLT3-ITD Tumorzellen genutzt wurden, wurden die epithelialen Zellen mit den für die viralen Proteine kodierenden Plasmiden und dem einzubringenden Gen kodierenden Plasmid (siehe 2.1.10) transfiziert. Da die viralen Partikel später ausgesuchte Hüllproteine auf ihrer Außenmembran tragen, die im ursprünglichen Retrovirus nicht vorkommen, wird der Begriff Pseudotyp genutzt. Mittels der hier verwendeten Hüllproteine (*eco-env*) ließen sich nur murine Zellen infizieren. Mittels der Kalzium-Phosphat-Methode (Pear et al., 1993) wurden Phoenix-gp Zellen mit den zwei Helferplasmiden, die die *gag-pol* Proteine kodieren, und dem entsprechenden retroviralen Vektor transfiziert. Die Reagenzien zur Durchführung der Methode stammen aus dem *Profection Mammalian Transfection System Calcium Phosphate Kit*, das Protokoll der Transfektion wurde 2002 von Beyer et al. in der Abteilung Molekulare Pathologie etabliert. Vor der Transfektion wurden die Phoenix-gp Zellen in einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen in einer 9 cm Zellkulturschale ausgesät. Am folgenden Morgen wurde das gebrauchte Medium durch 10 ml frisches DMEM Medium, welches mit 25 nM Chloroquine versetzt war, ersetzt. In Wasser wurde die Plasmid-DNA (5 µg retrovirale Plasmid-DNA und 10 µg *gag-pol* Plasmid DNA sowie 3 µg *eco-env* DNA) aufgenommen und mit 62,5 µl CaCl_2 auf ein Gesamtvolumen 500 µl aufgefüllt. Anschließend werden 500 µl Präzipitationspuffer in einem 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und mittels Pasteurpipette wurden Luftblasen produziert, um die Oberfläche des Puffers zu vergrößern. Das CaCl_2 -Gemisch wird vorsichtig in den Präzipitationspuffer getropft, während weiterhin Luftblasen produziert werden. Das entstandene Kalziumphosphat bildet mit der DNA unlösliche Präzipitate aus, die durch Endozytose von den Zellen aufgenommen wurden, sobald die Lösung auf die Zellen getropft wurden. Nach sechs Stunden wurde das Medium durch 6 ml DMEM-HEPES Medium ersetzt. Die viralen Partikel wurden nach Transkription der Plasmide, intrazellulärer Translation und Zusammenfinden der viralen Proteine zusammengesetzt und in das Medium der Zellen abgegeben. Am folgenden Tag wurde der erste Virusüberstand/Medium mittels einer Spritze abgenommen und filtriert (Millex-GP Filter 0,22 µm). Für die anschließende Titerbestimmung wurde ein Volumen von ca. 300 µl abgenommen. Der Überstand wurde anschließend bei -70°C eingefroren. Die Überstandabnahme erfolgte alle 12h insgesamt fünf Mal, indem immer wieder 6 ml DMEM-Medium mit HEPES nach Abnahme auf die Zellen gegeben wurde.

2.2.1.6 Austesten der Virustiter

Zur Bestimmung der Virustiter wurden in einer 24-Loch Zellkulturschale pro Vertiefung 5×10^4 Zellen ausgesät und mit 1 ml DMEM-Medium benetzt. Zwei verschiedene Konzentrationen wurden für jeden abgenommenen Virusüberstand ausgetestet. Da *eco-env* Pseudotypen produziert wurden, wurden Sc-1 Zellen für die Virustitration verwendet. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden der Schale abgesetzt hatten, wurde das alte Medium mit 500 μ l frischen DMEM-Polybrene-Medium ersetzt, während die abgenommenen Aliquots der Virusüberstände bei 4°C auftauten. Aus dem Aliquot wurden jeweils 20 μ l bzw. 100 μ l abgenommen und auf die jeweiligen SC-1 Zellen pipettiert. Nach einer Zentrifugation von einer Stunde bei 37°C und 700 x g wurden die Zellen wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt. Nach insgesamt 3 Tagen der Infektion konnten die Infektionsraten am Durchflusszytometer bestimmt werden. Um die Zellen für die Messung vorzubereiten, wurden die SC-1 Zellen gewaschen und in 500 μ l 1 x PBS resuspendiert. Wie viele GFP-Transfer-Einheiten ein Milliliter (GTE/ml) des Virusüberstandes enthielt, ließ sich aus der Menge des eingesetzten Virusüberstandes und der Anzahl der GFP-exprimierender Zellen errechnen.

2.2.1.7 Analyse der Zellen mittels des Durchflusszytometers

Das Durchflusszytometer (FACS) ist in der Lage Zellen einer Suspension mittels verschiedener Laser zu vermessen. Hierbei kommt es durch die Zellen zur Streuung eines Teils des Lichts, welche mittels Detektoren nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel ist. Diese wird von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst. Mit diesen beiden Parametern ist es möglich hämatopoetische Zellen voneinander zu unterscheiden. Es können auch Fluoreszenzfarbstoffe, die entweder von Reportergenen wie GFP gebildet werden oder aber mittels Antikörpern, die an die Zellen gebunden sind, detektiert werden. Es muss eine automatische Kompensation stattfinden sobald mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden. Die Kompensation berücksichtigt dabei die Überlappung von emissionsspektren der Fluorochrome und

eliminiert diese aus den angezeigten Analysen. Das Messvolumen betrug bei den verschiedenen Analysen 500 µl.

2.2.1.8 Infektion von FLT3-ITD Tumorzellen

Um die FLT3-ITD Tumorzellen mit den retroviralen Vektoren, die die cDNA für die DN STAT5-Mutanten kodiert, zu infizieren, wurden die Zellen zuerst in Methylzellulose mit 10 ng/ml IL7 angezogen, um eine größere Menge an Zellen für die Infektion zur Verfügung zu haben. Die Zellen wurden nach 7 Tagen aus der Methylzellulose gelöst und in einem Gemisch aus IMDM Medium und Überstand, der die infektiösen Partikel mit den DN STAT5 Mutanten beinhaltet, in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml aufgenommen. Dem Medium wurden 1 µl pro ml Polybrene zugesetzt und die Zellen wurden in einer 6-Loch Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellkulturplatten wurden anschließend 30 min bei RT und 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen wieder im Zellkulturschrank kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen ein zweites Mal infiziert. Anschließend nach 24h der Ruhephase wurde dem Medium 1 mg/ml G418 bzw. Neomycin hinzugesetzt, um die infizierten Zellen von den uninfizierten Zellen unterscheiden zu können. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Antibiotikum behandelt, die nicht infiziert wurden und folglich nicht G418 positiv waren. Nach dem Tod der Kontrollzellen wurden die G418 positiven FLT3-ITD Tumorzellen wieder in Methylzellulose ausgesät, die mit 1 mg/ml G418 und 10 ng/ml IL7 versetzt war. Nach sieben Tagen der Haltung in der Methylzellulose konnten die gebildeten Kolonien und lebenden Zellen gezählt werden.

2.2.2 Mausversuche

Alle Tierversuche erfolgten gemäß der Bestimmungen zu gentechnologischen Arbeiten an Tieren in der Tierhaltung des Heinrich-Pette-Instituts und wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetz Fassung vom 18. Mai 2006 (BGBl.IS.1207) mit der Tierversuchsgenehmigungsnummer FI87/04 durchgeführt.

2.2.2.1 Retransplantation von FLT3-ITD Tumorzellen

Vor der Transplantation der FLT3-ITD Tumorzellen wurden die die 8 bis 12 Wochen alten C57BL/6 Empfängertiere subletal bestrahlt. Die Dosis von 4,5 Gy erfolgte mit einer offenen Cäsium- 137 Strahlenquelle des Heinrich-Pette-Instituts. Die FLT3-ITD Tumorzellen wurden derweil aus dem Stickstoff geholt und aufgetaut (siehe 2.2.1.3.) die Zellen wurden gezählt. In einem Volumen von 200 µl IMDM Medium ohne Zusätze wurden 5×10^5 Zellen eingesät. Je 200 µl Zellsuspension wurden pro Empfängermaus in die Schwanzvene injiziert. Den Mäusen wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen das Antibiotikum Baytril® verabreicht.

2.2.2.2 Analyse erkrankter Tiere

Als erstes erfolgte die Analyse der Blutparameter, indem die Leukozytenzahl und der Hämatokrit bestimmt wurden. Zur Bestimmung der Leukozytenzahl musste vorerst eine Eliminierung der Erythrozyten im Blut durch Zugabe von 3%iger Essigsäure erfolgen. Dazu wurden 3 µl Blut mit 57 µl der Essigsäure vermischt und die Leukozyten in der Neubauer-Kammer gezählt. Zur Bestimmung des Hämatokrits wurden etwa 60 ml Blut in einer Hämatokrit-Kapillare aufgezogen und durch Zentrifugation wurden Serum und feste Bestandteile des Blutes voneinander getrennt und der Hämatokritwert anhand einer Schablone abgelesen. Um die verschiedenen Zellen und deren Vorkommen im Blut der Mäuse bestimmen zu können, wurde ein Blutausschlag angefertigt, der nach einer Trocknungsphase von mindestens 24h mit einer Pappenheimfärbung mit May-Grünwald und Giemsa-Färbelösungen gemäß Herstellerangaben gefärbt wurden. Bevor an dem Mikroskop ausgewertet werden konnte, wurde ein Deckgläschen mittels Eukitt® auf dem Objektträger befestigt.

Analyse der Organe

Für die Analyse der Organe wurde das vorher per Genickbruch getötete Tier in Rückenlage fixiert. Nach einem Hautschnitt in der Mittellinie, wurde die Haut abpräpariert, um auch die Lymphknoten der Achselhöhlen, des Lendenbereichs und an den Speicheldrüsen auf eventuelle krankhafte Veränderungen hin zu untersuchen. Das Tier wurde anschließend entlang der Mittellinie eröffnet, so dass die inneren Organe des Bauchraumes wie Milz, Leber, Nieren, Magen, Darm, assoziierte Lymphknoten, Harnblase sowie die Geschlechtsorgane analysiert werden konnten. Um Lymphknoten des Thymus, Herz und Lunge betrachten zu können wurde mit Schnitten links und rechts des Brustbeins die

Brusthöhle geöffnet. War ein Organ krankhaft verändert, wurde das Organ heraus präpariert und weiter verarbeitet. Es wurden Teile von Organen oder Zellen von Knochenmark und Milz in einem Kryoröhrchen eingefroren und für weitere Versuche z.B. Gewinnung von genomischer DNA und anschließender Southern Blot Analyse eingesetzt.

Auch für die Histologie wurden Teile von Organen entnommen und in FA oder im Fall von Sternum in CalFix konserviert und bei 4°C aufbewahrt bevor die Präparate hergestellt und freundlicherweise mit Hilfe von Herrn Dr. Löhler im Heinrich-Pette-Institut beurteilt wurden.

Vorbereitung von Knochenmark und Milz von FLT3-ITD Mäusen am Durchflusszytometer

Wie zuvor beschrieben, kann ein FACS-Gerät nur Zellen in Suspension durchmessen. Deshalb wurde ein Teil der Milz zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Hierzu wurde das Organ mit Hilfe eines Spritzenstemples durch ein Drahtsieb mit einer Maschenweite von 160 µm gedrückt und dabei in IMDM Medium resuspendiert. Das Knochenmark wurde wie zuvor beschrieben ausgespült und befand sich folglich schon in einer Zellsuspension. Bevor beide Zellsuspensionen im FACS untersucht werden konnten, mussten Erythrozyten entfernt und die Zellen mittels Antikörper für verschiedene zu analysierende Oberflächenmarker gefärbt werden.

2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Klonierung der DN STAT5 Mutanten

Die zwei dominant negativen Mutanten wurden bereits von Herrn Johann Meyer mittels einer Mutagenese PCR in der Abteilung der Molekularen Pathologie generiert. Für das Umklonieren mussten die beiden cDNA-Konstrukte aus einem Vektor mittels des Restriktionsenzym *EcoRI* herausgeschnitten werden und in den Vektor R338, der eine Neomycin Resistenz trug, ligiert werden. Zuvor wurde der Vektor R338 auch mit dem Enzym *EcoRI* behandelt und mittels einer Cip-Reaktion mit der alkalischen Phosphatase (Roche, Mannheim) vor der Religation geschützt. Für die Ligation der cDNA der DN STAT5 Mutanten in den R338 Vektor wurde die T4-Ligase von Fermentas (St. Leon-Roth) genutzt. Mit den fertigen ligierten Konstrukten wurden Bakterien des *E.coli* Stammes XL1-gold transformiert und die Plasmid-DNA isoliert. Durch eine Testspaltung der Plasmid-DNA mit *EcoRI* (NEB,

Schwalbach) konnte überprüft werden, ob der analysierte Klon das Insert trägt. Mittels einer Restriktion mit Scal (Fermentas, St. Leon Roth) konnte die Orientierung der DN STAT5 Mutanten im Vektor überprüft werden und somit sicher gestellt werden, dass das integrierte Gen im Offenen Leserahmen liegt (ORF = open reading frame), sodass es zur Transkription des Gens kommt.

2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese / Gelextraktion

Über die Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Kleine Fragmente durchlaufen die Agarosegelmatrix schneller als große Fragmente. Für ein Agarosegel wurde Agarose mit Puffer in einem Erlenmeyerkolben vermischt und in der Mikrowelle aufgeköcht bis keine Agarosebrocken mehr erkennbar waren. Durch das Zugeben von 2,5 µl der Stocklösung (0,5µg/µl) des an die DNA-bindende Ehtidiumbromids zu der aufgeköchten Agaroselösung von 45 ml, kann die DNA später unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für die Auftrennung großer Fragmente wurde TAE Puffer und eine geringe Agarosemenge (0,8% (w/v)) eingesetzt, für besonders kleine Fragmente wurden höherprozentige Agarosegele (1,5 bis 2%(w/v)) mit TBE Puffer gegossen. Die DNA wurde gemischt mit Ladepuffer in die Taschen pipettiert und bei 120 V so lange laufen gelassen, bis eine optimale Auftrennung des Markers und der Fragmente erreicht wurde. Mittels einem Standardmarker bekannter Größe kann die Größe der aufgetrennten Fragmente bestimmt werden. Das Aufreinigen von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe eines Gelextraktionskits. Für die Extraktion von DNA-Fragmenten, die für eine Ligation genutzt werden sollten, wurden die unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel geschnittenen DNA-Banden auf eine Ultrafree-DA Centrifugal Filter Unit von Millipore (Millipore, Schwalbach) gegeben und 10 min bei 9.300 x g zentrifugiert. Der Filter bindet die Agarose, während die aufgereinigte DNA diesen passiert.

2.2.3.3 Bakterienkulturen

Die Bakterienkulturen wurden grundsätzlich in LB-Medium gehalten. Zum Erhalt von Bakterienkolonien auf Nähragarplatten wurde das Medium mit 1,5% Agar (Difco-Laboratories, Hamburg) versetzt und in Petrischalen gegossen. Die Anzucht in Flüssigkulturen erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 140 rpm (Multitron II, Infors AG, Bottmingen, CH) sowie auf den Agarplatten in einem Brutschrank für 16 bis 20 h, wobei mittels Ampicillin (Sigma, Taufkirchen) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml selektioniert

wurde. Bei einer erforderlichen Lagerung der Bakterienkulturen in Flüssigkultur über lange Zeit wurde ein Glycerolstock mit einer Endkonzentration von 15% Glycerin angesetzt. Hierfür wurden 828 µl der Bakteriensuspension mit 172 µl Glycerin (87%) versetzt und bei -70°C gelagert.

2.2.4 Nukleinsäure-analytische Methoden

2.2.4.1 Standard Methoden

Für die Präparation der Plasmid DNA aus E.coli XL10GOLD im Mini – Midi oder Maximaßstab wurde das Qiagen Plasmid Präparationskit genutzt.

2.2.4.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von isolierter DNA und RNA ist spektralphotometrisch möglich, da die aromatischen Reste der Basen eines jeden Nukleotids zu einer Veränderung des Absorptionsverhaltens bei 260 nm führen. Aus den Extinktionswerten bei 260 nm konnten, ausgehend vom Lambert-Beerschen-Gesetz und unter Berücksichtigung der spezifischen Absorptionskonstanten ($1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/mL dsDNA}$ bzw. $40 \mu\text{g/mL RNA}$), die Nukleinsäurekonzentrationen berechnet werden. Wird gleichzeitig die Extinktion bei 280 nm (dem Absorptionsmaximum von Genen) gemessen, so kann aus dem Verhältnis der optischen Dichten (OD) 260 nm zu 280 nm ($\text{OD}_{260/280}$) die Reinheit der Nukleinsäure bestimmt werden. Kontaminationsfreie Nukleinsäuren weisen einen Quotienten der $\text{OD}_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0 auf. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine 1:100-Verdünnung der isolierten DNA hergestellt und deren Absorptionen bestimmt.

2.2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA

DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrocarbonat in dH ₂ O, 12 h 37°C, anschließend autoklaviert
-----------------------	--

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellsuspensionen wurde das peqGOLD TriFast™ Kit (Peqlab, Erlangen) verwendet, welches auf dem Prinzip Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode beruht (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Durchführung wurde nach Vorgabe des Herstellers vorgenommen und das Pellet in 20 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.4.4 cDNA-Erststrang-Synthese

Mit Hilfe der ‚Avian Myeloblastosis Virus‘ (AMV) Reversen Transkriptase ist es möglich die durch das peqGOLD Trifast™ System isolierte, einzelsträngige RNA in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die zusätzlich DNA-abhängige DNA-Polymerase, DNA-entwindende und RNaseH-Aktivität besitzt. Als Primer wird ein Oligo(dT)₁₆-Primer eingesetzt, welcher an den Poly(A)-Schwanz der mRNA bindet und somit unspezifisch die Synthese eines komplementären DNA-Stranges zu sämtlicher mRNA ermöglicht. Durch die RNaseH-Aktivität der Reversen Transkriptase wird der RNA-Strang der Hybridhelix abgebaut und durch den komplementären DNA-Strang ersetzt (Verma, 1981). Hierfür ist die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität des Enzyms von Bedeutung. Die erhaltene cDNA kann dann mittels PCR amplifiziert werden.

In einer ersten Hybridisierungsreaktion wurden 2-5 µg RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₆-Primer (Pharmacia Biotech, Freiburg) sowie mit 3 µl DEPC-H₂O versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 µl dNTPs (10 mM each, Qiagen, Hilden), 1 U RNasin (Promega, Mannheim) sowie 20 U AMV Reverse Transkriptase (Peqlab, Erlangen) in 1/5 Volumen Puffer und DEPC-H₂O. Der Ansatz wurde 1 h bei 42°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Standard-PCR wurde das Taq-PCR Core Kit von der Firma Qiagen verwendet. Für die standardisierte quantitative Realtime-PCR wurde das Cybr-Green Realtime PCR Kit der Firma Roche verwendet. Die genutzten Oligonukleotide sind im Materialenteil 2.1 aufgeführt, die Annealingtemperaturen sowie die Anzahl der Zyklen wurde den Primern bzw. der zu amplifizierenden DNA angepasst. Da das Protokoll der LM-PCR stark modifiziert wurde, wird es im Einzelnen erläutert.

2.2.4.5.1 Ligationsmedierten-PCR (LM-PCR)

Um die Integrationsstellen des Provirus in das Genom von eukaryotischen Zellen bestimmen zu können wurde eine LM-PCR (*ligation-mediated-PCR*) durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass provirale DNA von LTRs flankiert wird, an die Primer binden können um die multiplen Provirus-flankierenden, genomischen DNA-Sequenzen zu amplifizieren (siehe Abb. 2.1). Diese lassen sich anschließend direkt sequenzieren. Die ursprüngliche *ligation-mediated extension primer tag selection* (LM/EPTS) PCR von Schmidt (Schmidt et al., 2001) wurde für diese Arbeit in zahlreichen Punkten modifiziert.

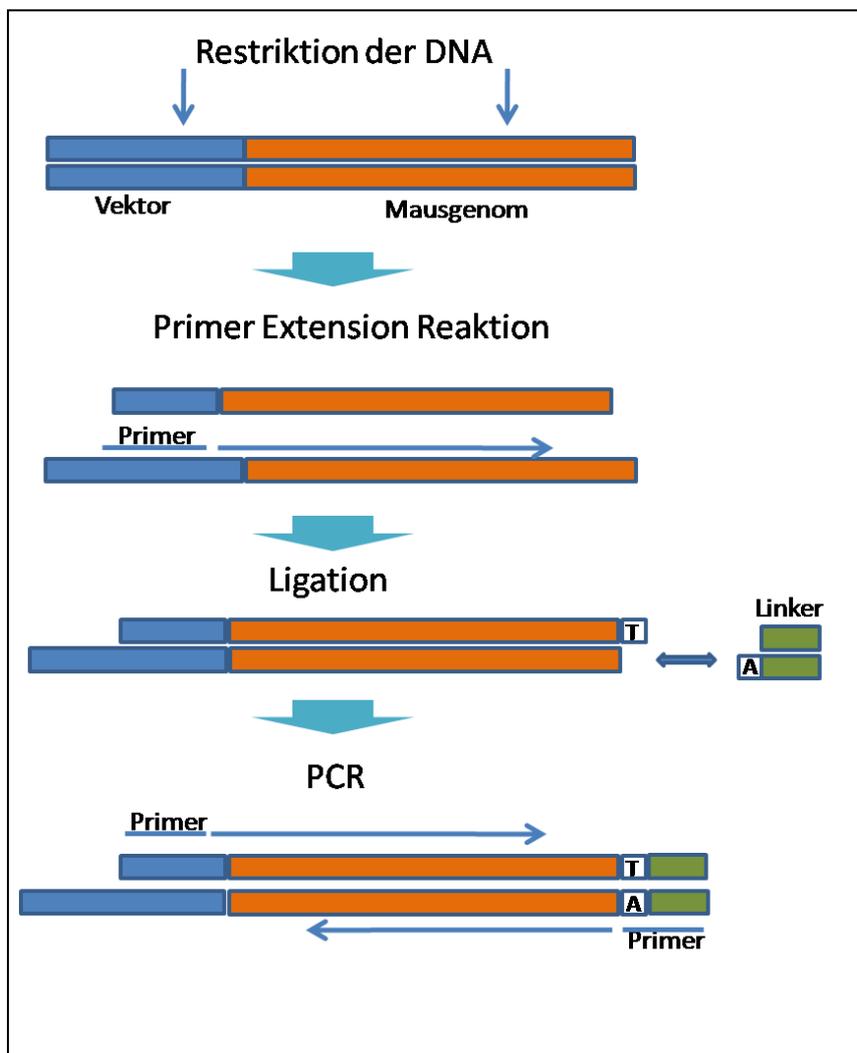


Abbildung 2.1: Prinzip der LM-PCR.

Im ersten Schritt wird die genomische DNA mittels eines Enzyms verdaut, es folgt eine Primer-Extensions-Reaktion. Durch die Ligation mit Linkern werden die kohäsiven Enden aufgefüllt, an die wiederum Primer in einer weiteren PCR binden können.

In einem ersten Schritt wird die genomische DNA mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease, welche köhäsive Enden produziert, in verschieden große Fragmente zerlegt. Anschließend erfolgt eine Primer-Extensions-Reaktion, bei welcher die DNA-Fragmente zuerst denaturiert werden und es dann zur Bindung eines spezifischen, biotinylierten Primers an die 3'-Termini

der LTR-Regionen kommt. Mit Hilfe der *Taq*-Polymerase erfolgt eine Verlängerung des Primers in 3'-Richtung, sodass doppelsträngige DNA nur von den Provirus-flankierenden Bereichen synthetisiert wird. Auf Grund des zuvor durchgeführten Restriktionsverdau sind die Fragmente alle unterschiedlich lang, zeichnen sich jedoch nach der Primer-Extensions-Reaktion alle durch glatte Enden aus. Durch die Biotinylierung der doppelsträngigen DNA kann diese an Streptavidin gekoppelte Partikel gebunden werden.

Anschließend erfolgt die Ligation der doppelsträngigen DNA mit einem Linker. Dieser ist so aufgebaut, dass er ein glattes, sowie ein kohäsives Ende enthält. Hierdurch wird sichergestellt, dass es nur zu einer Ligation der glatten Enden kommen kann. Als Produkt der Reaktionen entstehen doppelsträngige DNA-Fragmente verschiedener Länge, deren terminale Region jedoch alle identische sind. Der eine Terminus besteht aus der Sequenz des Linkers, während der andere der Basenabfolge des biotinylierten Primers entspricht. In einer PCR-Reaktion ist es nun möglich die DNA-Fragmente zu amplifizieren. Hierzu wird eine sogenannte verschachtelte (*nested*) PCR durchgeführt, welche für eine erhöhte Spezifität der Amplifikation sorgt. In einer ersten PCR werden die Primer so gewählt, dass diese an die 5'-Region des Linkers (LC I) und den zentralen Bereich des LTR (LTR II) binden. Das Produkt dieser ersten PCR wird als Matrize für eine weitere PCR genutzt, bei der die Primer weiter innen liegen, das Amplifikat also verkürzt wird. Als Primer für diese Reaktion dient zum einen ein Oligonukleotid, welches mit der 3'-Region des Linkers interagiert (LC II) und zum anderen ein weiteres Oligonukleotid, welches an den 5'-Bereich des LTR bindet (LTR III).

Im Anschluss an die zweite PCR werden die Reaktionsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Bande aus dem Gel eluiert. Diese können anschließend einer Sequenzierungsreaktion unterzogen werden, um die unbekannt genomschen Sequenzen, in die das Provirus integriert hat, mit Hilfe von Datenbanken identifizieren zu können. Zur Herstellung des synthetischen Linkers wurden jeweils 2 nmol der komplementären Oligonukleotide Linker 1 und Linker 2 für 5 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurde Hybridisierungspuffer (1 x) zugegeben und der Ansatz für weitere 5 min bei 70°C im Heizblock inkubiert. Der Heizblock wurde ausgeschaltet, sodass der Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen konnte. Dabei kommt es zur Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen der beiden Linker, sodass dieser als Doppelstrang vorliegt. In einem ersten Schritt wurde die genomische DNA aus FLT3-ITD Tumorzellen isoliert. 2 µg genomische DNA wurde in 30 µl-Ansätzen, je einmal mit 5 U PstI (Fermentas, St. Leon Roth) und in einem weiteren Ansatz mit 5 U Csp61 (Fermentas, St. Leon Roth) im

zugehörigen 10 x Restriktionspuffer über Nacht bei 37°C hydrolysiert. Um den Erfolg der Restriktion zu überprüfen werden 10 µl des Ansatzes elektrophoretisch aufgetrennt. Der Rest der restringierten, genomischen DNA wurde mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und die DNA in 10 µl H₂O aufgenommen (siehe 2.2.5.1).

Im nächsten Schritt der LM-PCR kommt es zur Anlagerung des biotinylierten Primers an die LTR-Region und zur Extension des Primers. Hierzu werden 10 µl der verdauten, genomischen DNA in einem 20 µl-Ansatz mit 0,4 µl dNTPs (je 10 mM, Qiagen, Hilden), 0,25 µM *Primer* rvLTRI-Biotin, 5 U *Taq*-Polymerase und 2 µl 10 x PCR-Puffer versetzt. Um die Reaktion ablaufen zu lassen wurde 5 min bei 95°C die Denaturierung eingeleitet, anschließend bei 64°C für 30 min die Hybridisierung und der Schritt der Elongation wurde für 15 min bei 72°C im Thermocycler durchgeführt. Zur Aufreinigung der DNA wurde das *Millipore Gel Extraction Kit* verwendet und gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 40 µl H₂O. 200 µg magnetisierte, Streptavidin-beschichtete Partikel (Dynabeads®M-280 Streptavidin, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen) wurden je Ansatz zweimal mit 100 µl 2x Waschpuffer gewaschen, indem sie im Puffer gelöst, dann mit Hilfe eines magnetischen Reaktionsgefäßhalters (Boehringer, Mannheim) am Gefäßrand gesammelt und so der Puffer abpipettiert werden konnte. Abschließend wurden die Partikel in 5 µl 2x Waschpuffer resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe der aufgereinigten DNA-Lösung. Die Bindung der biotinylierten DNA an die Partikel erfolgte 5 h bei Raumtemperatur. Um eine stetige Durchmischung zu gewährleisten, wurden die Reaktionsgefäße in einem Hybridisierungssofen (400 HY-E, Bachofen, Reutlingen) in Rotation gehalten. Anschließend erfolgte die Extraktion der biotinylierten Produkte mit Hilfe des magnetischen Reaktionsgefäßhalters. Nachdem sich die Streptavidin-Partikel und die daran gebundene biotinylierte DNA durch die magnetische Wechselwirkung am Gefäßrand gesammelt hatten, konnte der Überstand mit nicht-biotinylierter DNA abgenommen werden. Nach zwei Waschschritten der Partikel mit je 100 µl H₂O wurden diese in 5 µl H₂O resuspendiert. Als nächstes wurde die DNA mit dem Linker ligiert. 1 µl des Polylinkers wurde zusammen mit den 5 µl an die Partikel gekoppelte DNA in einem 10 µl-Ansatz mit 2 U T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon Roth) und 1/10 Volumen T4-Ligasepuffer über Nacht bei 16°C ligiert. Nachdem die Partikel zur Entfernung von ungebundenem Linker erneut zweimal mit 100 µl H₂O gewaschen und in 10 µl H₂O aufgenommen wurden, konnten 2 µl hiervon für die PCR verwendet werden. Für die Reaktion wurde die DNA mit je 25 pmol der Primer LC 1 und rvLTR II, 5 µg dNTPs sowie 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer und 2,5 U *Taq*-Polymerase versetzt und mit H₂O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Die Amplifikation des Fragments erfolgte im Thermocycler unter Verwendung des Standard-PCR-Programms. Die

Elongationszeit wurde jedoch auf 90 sec verlängert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 60°C. Für die nested PCR wurde 1 µl des PCR-Produktes der ersten Reaktion eingesetzt.

Der Ansatz wurde ebenso pipettiert wie zuvor, als Primer dienten jedoch die Oligonukleotide LC 2 und LTR II. Die Amplifikation fand unter denselben Bedingungen statt wie zuvor, allerdings wurde eine Hybridisierungstemperatur von 65°C gewählt.

Zur Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden diese auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml modifiziertem TAE-Puffer (Millipore, Schwalbach) aufgekocht und mit 4 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Die Banden wurden mit Hilfe des *Millipore Gel Extraction Kits* aus dem Gel extrahiert. Je nach der Intensität der DNA-Bande im Agarosegel wurden 0,5 µl bzw. 1 µl der DNA-Lösung für die Sequenzierungsreaktion mit dem Primer LTR II eingesetzt (siehe 2.1.3).

2.2.5 Southern Blot Analyse

2.2.5.1 Isolation genomischer DNA aus Organen oder Zellen

Die genomische DNA wurde aus Zellen oder Organstücken, die bei -70°C gelagert wurden, isoliert. Die Organstücke/Zellpelett wurden im gefrorenen Zustand in einen Glas-Homogenisator gegeben und nach Zugabe von 500 µl - 1 ml (je nach Größe des Stückes) des Puffers 1 homogenisiert. Es folgte die Zugabe eines gleichen Volumens von Puffer 2 und zur Eliminierung von Proteinen die Zugabe von Proteinase K. Nach dem Durchmischen erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37°C im Wasserbad. Zur anschließenden Phenol/Chlorophorm Extraktion wurde die Lösung zweimal mit einem Volumen Phenol versetzt, gut homogenisiert und jedes Mal 5 min bei 1040 x g (RT) zentrifugiert. Nach der Überführung der oberen wässrigen und DNA-haltigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte eine Extraktion der DNA mit einem Gemisch aus Phenol/Chrophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v). Zum Entfernen der Phenolreste wurde die wässrige Phase nach Zentrifugation zu den oben genannten Bedingungen mit einem Volumen Chlorophorm versetzt und gemischt. Zur anschließenden Fällung der DNA wurde wiederum die wässrige Phase der Phenol/Chlorophorm Fällung in ein Glasröhrchen überführt und mit der Hälfte des Volumens an Isopropanol Zugabe von 1/20 Volumen 5 M NaCl vorsichtig vermischt. Die kondensierte DNA fiel in Fäden aus und konnte mit einem Glashaken, der aus einer Pasteurpipette geformt wurde, aufgewickelt werden. Die DNA wurde mit dem Haken im 70%igen Ethanol geschwenkt und zum Antrocknen bei RT stehen gelassen. Abhängig von

der DNA-Menge wurde die DNA in einem Volumen von 100 µl bis 250 µl TE-Puffer gelöst. Über Nacht wurde die DNA im Wasserbad bei 37°C weiter gelöst bevor die Konzentration am Photometer bestimmt werden konnte. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

2.2.5.2 Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Die LM-PCR Fragmente, die als Sonden für die Southern Blot Analyse genutzt wurden, waren in einen für die Sequenzierung genutzten Vektor subkloniert. Mittels einer Restriktion mit dem Enzym BamHI konnten diese Fragmente wieder ausgeschnitten werden und zur Sondenherstellung mit dem Deca Labeling ® Kit von Fermentas genutzt werden. 5 µl der herausgeschnittenen und über ein Agarosegel aufgereinigten DNA wurde mit 10 µl Deca Nukleotid Puffer und 21 µl H₂O gemischt und 5 min bei 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde 3µl MixC dazugegeben und gemischt, 1 µl Klenowfragment wurde an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert. Nach dem Transport auf Eis in das Isotopenlabor, wurde 5 µl (=1,85 Mbq) des [αP32] dCTP dazugegeben, gemischt und für 30 min auf 37°C erhitzt. Um die radioaktiv markierten von nicht radioaktiv markierten DNA-Fragmenten zu trennen, wurde die Suspension auf eine Sephacryl-Säule gegeben (Mobi Spon S300, MoBiTec, Göttingen) und zentrifugiert (2 min, 800 x g). Die durchflossene Sonde wurde mittels des Szintillators gemessen und bis zum Einsatz im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Zugabe zu der Membran wurde die Sonde 5 min auf 95°C erhitzt.

2.2.5.3 Herstellung des Blots

Vorerst musste die genomische DNA der verschiedenen Proben mittels Restriktionsenzymen verdaut und auf ein 0,8%iges Agarosegel (TAE-Puffer) aufgetragen werden. Mittels Gelelektrophorese wurden die Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Dies geschah 30 min bei 120V, um die DNA in das Gel laufen zu lassen und über Nacht bei 25V. Am nächsten Tag wurde das Gel fotografiert und zurechtgeschnitten. Für die Denaturierung wurde das Gel erst 30 min in Lösung I und anschließend nach kurzem Schwenken in destilliertem Wasser 30 min in Lösung II geschwenkt. Der Blot wurde auf einer Glasplatte zusammengebaut, die auf einer Plastikwanne stand. In der Wanne befand sich 10 x SSC Lösung, die durch ein Whatmanpapier mit der Glasplatte und so auch mit dem Blot verbunden war. Auf das Whatmanpapier kam ein Whatmanpapier auf Größe des Gels zurechtgeschnitten, das Gel, darüber die Membran und wieder ein Whatmanpapier. Damit die DNA an die Membran bindet, wurde alles mit 2 Stapeln Tüchern, einer Glasplatte und einem Gefäß mit 200 ml

Flüssigkeit beschwert. Am darauf folgenden Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran je 30 sek in Lösung I und dann in Lösung II geschwenkt. Die Membran wurde mit der DNA-Seite nach oben auf Tücher gelegt und im Isotopenlabor für 2h bei 80°C gebacken. Danach wurde die Membran in eine Glasröhre mit 10 ml Hybridisierungspuffer gesteckt und für 1h vorhybridisiert bevor die Sonde dazu gegeben wurde. Über Nacht bei 55°C erfolgte die Hybridisierung bei ständiger Rotation im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde die Membran kurz mit 2 x SSC übergossen und anschließend in einer Plastikschiene im Wasserbad bei 68°C mit der Waschlösung I gewaschen. Die Membran wurde zum Antrocknen auf Tücher gelegt und anschließend in Frischhaltefolie eingepackt. In der Dunkelkammer erfolgte das Auflegen eines Röntgenfilmes, der je nach Signalstärke bei -70°C in der Filmkassette exponiert wurde. Die Filmentwicklung erfolgte in der Dunkelkammer des Heinrich-Pette-Instituts mit dem Classic E.O.S. Filmentwickler (AGFA, Köln).

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden – Western Blot Analyse

2.2.6.1 Herstellung der Proteinproben

Die zu untersuchenden Zellen wurden vor der Lyse mit TCA 2 mal mit 1 x PBS Lösung gewaschen und 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpelett (ca. 1×10^6 Zellen) wurde im frisch angesetzten TCA-Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden 5 min bei 16000 x g bei RT abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pelett wurde in 100 μ l 2 x Probenpuffer aufgenommen, gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse des Peletts im Puffer wurde durch Sonifizierung bei 4°C durchgeführt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, erfolgte eine Absorptionmessung bei 620 nm. Dazu wurden die Lysate 1:5 in 2x Probenpuffer verdünnt und anschließend mit dem BioRad DC-Protein Assay nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Konzentration konnte durch das Mitführen einer BSA-Eichreihe (von 0 bis 2,5 μ g/ μ l) berechnet werden. Die BSA-Eichreihe wurde auch im 2fach Probenpuffer verdünnt, um die Werte vergleichen zu können.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine der zu analysierenden Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Tenn- und Sammelgel wurden, wie im Kapitel 2.1. beschrieben, gegossen.

Zuvor wurden 20 µg Protein mit einem 3x Probenpuffer vermischt, der aus einer 1:3 Mischung von 1M DTT und 3 x Probenpuffer, bestand. Die Suspension wurde 5 min auf 98°C erhitzt. Auf dem Gel wurde ein definierter Größenstandard von Fermentas mitgeführt (SM#1816). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120V bis der Größenstandard vollständig aufgetrennt war.

2.2.6.3 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und immunologische Detektion

Durch den Transfer der Proteine auf eine Membran können mittels der Western Blot Analyse zu untersuchende Proteine durch Zugabe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Um die Proteine auf eine zuvor mit Methanol aktivierte und im Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) zu übertragen, wurde eine Spannung von 100V in einer Naß-Tankblotkammer von BioRad angelegt. Um freie Bindungsstellen auf dem Blot zu besetzen, wurde die Membran für 1h in 5%iger Milchlösung geschwenkt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran wurde 3 mal 10 min mit TTBS gewaschen. Der Sekundärantikörper, der Peroxidase-konjugiert war, wurde 1:5000 in TTBS verdünnt und schwenkte 1h bei RT mit der Membran. Danach wurde die Membran 3 mal 10 min mit TTBS gewaschen und bis zur ECL-Reaktion in 1xTBS aufbewahrt..

2.2.6.4 ECL-Reaktion

Mithilfe des Amersham ECL-Detektion Kit TM (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) wurden die Proteine auf der Membran mittels spezifischer Antikörperinteraktion sichtbar gemacht. Für Phospho-Proteine wurde meist das Amersham ECL-Detection Kit PLUSTM genutzt, da dieses ECL in der Detektion sensitiver war. Die Lösungen wurden nach Herstellerangaben gemischt und in der Dunkelkammer auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde ein Film auf die Membran gelegt und die Proteine wurden durch die ECL Reaktion der Lösung mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Zur Weiterverwendung der Membran wurde diese nach der ECI-Reaktion 3 x 5 min mit 1 x TBS gewaschen und entweder in 1 x TBS im Kühlschrank gelagert, gleich wieder neu blockiert oder aber es wurden die Antikörper von der Membran entfernt.

2.2.6.5 Ablösen der Antikörper für eine erneute Verwendung einer Membran

Beim Ablösen der Antikörper einer vorher bereits verwendeten Membran werden die primären sowie die sekundären Antikörper von den auf der Membran befindlichen Proteinen abgelöst. Dazu muss die Membran nach der ECL Reaktion wie vorher beschrieben gewaschen werden und danach 15 min bei 50°C mit „ECL Stripping Buffer“ im Wasserbad geschwenkt werden. Anschließend wurden durch intensives Waschen mit 1 X TBS alle ECL Stripping Buffer Rückstände entfernt. Die Membran kann nach erneutem Waschen mit 1 xTBS in 5% Blockmilch geschwenkt und später mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert werden.

3 Ergebnisse

Die konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors durch die Insertion einer internen Tandem Duplikation führte in dem verwendeten C57BL/6 Mausmodell zu einer aggressiven B-Zell Leukämie. Es stellte sich die Frage, welche Signalwege durch die konstitutive Aktivierung angeschaltet wurden und wichtig für das Aufrechterhalten des leukämischen Wachstums sind.

Das erste Ziel der folgenden Analysen war es, herauszufinden, welche Signalwege stromabwärts von FLT3-ITD in den Tumorzellen aktiviert sind und ob das Überleben und die Proliferation der Zellen von allen Signalwegen oder nur von einem Teil der Signalwege abhängig sind. Bevor die verschiedenen Signalwege analysiert werden konnten, musste eine größere, ergiebige Quelle an Tumorzellen bereit gestellt werden. Um mehrere FLT3-ITD Tumore zu erhalten stellte sich die Frage, ob die FLT3-ITD Tumore in sekundäre C57BL/6 Mäuse transplantierbar waren.

3.1 Die FLT3-ITD Tumorzellen sind retransplantierbar

Um zu sehen, ob die FLT3-ITD Tumorzellen in der Lage sind, in sekundären Rezipienten wieder eine Leukämie auszulösen, wurden subletal bestrahlten C57BL/6 Mäusen je 5×10^5 FLT3-ITD Milzzellen einer vorher an der FLT3-ITD B-Zell-ALL erkrankten Maus retransplantiert. Nach einer medianen Latenzzeit von 21 Tagen wiesen die sekundären, mit FLT3-ITD retransplantierten Rezipienten einen leukämischen Phänotyp auf. Die Mäuse wurden abgetötet und die Knochenmarkszellen, die von drei Mäusen gemischt wurden, wurden am Durchflusszytometer untersucht.

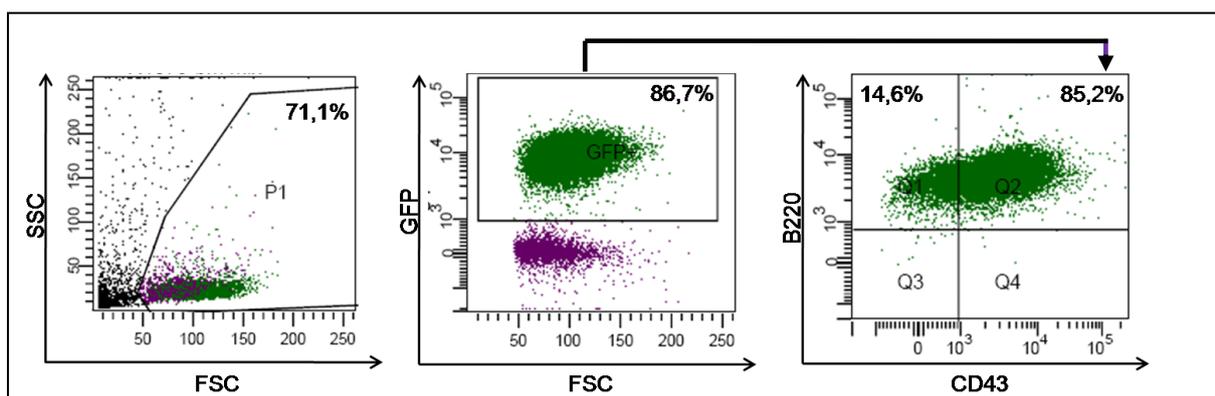


Abbildung 3.1: FACS Analyse der Knochenmarkszellen aus retransplantierten FLT3-ITD Mäusen. Die Knochenmarkszellen von drei FLT3-ITD retransplantierten Mäusen wurden gemischt und anschließend auf die Marker GFP, B220 und CD43 untersucht. Der schwarze Pfeil kennzeichnet, dass im Weiteren nur die GFP/FLT3-ITD positiven Zellen auf die Marker CD43 und B220 untersucht wurden. Die GFP und CD43/B220 positive Zellen wurden für spätere Analysen sortiert.

Anhand der Abbildung 3.1 ist zu erkennen, dass die Mäuse einen hohen Anteil von ca. 87% an GFP positiven Zellen im Knochenmark aufwiesen. Bei der GFP positiven Population handelte es sich um ca. 85% CD43/B220 doppelt positive Zellen. Somit zeigten die retransplantierten Mäuse einen FLT3-ITD Tumor, der genau wie der Primärtumor eine vergrößerte B220/CD43 positive Population aufwies. Anhand der Expression dieser Oberflächenmarker war ersichtlich, dass die Tumorzellen frühe B-Zellen sind, die in ihrer Differenzierung zwischen dem Pro- und Prä-B Zellstadium blockiert sind.

Es war den FLT3-ITD Tumorzellen in kurzer Zeit möglich wieder eine Leukämie in einem sekundären Empfängertier auszulösen, was für eine aggressive Form der Leukämie spricht. Die isolierten Knochenmarkzellen aus dem beschriebenen Reimplantationsversuch, die vorher aus drei Mäusen vereinigt wurden, wurden auf den Marker GFP sortiert und für die Kultivierungsversuche eingesetzt.

Um in weiteren Versuchen FLT3-ITD Tumorzellen mit wt Pro-B Zellen vergleichen zu können, wurden fünf C57BL/6 Mäusen das Knochenmark entnommen, die isolierten Knochenmarkzellen vereinigt und per FACS Analyse auf die Oberflächenmarker B220, CD43 und IgM untersucht

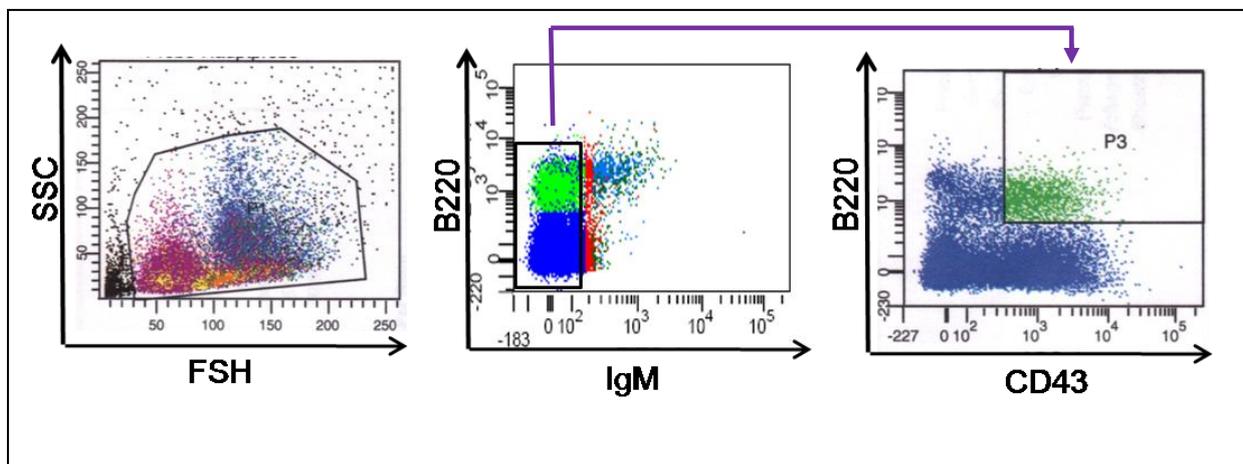


Abbildung 3.2: Sortieren von Pro-B Zellen aus C57BL/6 Knochenmarkzellen. Für diese Analyse wurde fünf C57BL/6 wt Mäusen das Knochenmark entnommen, die verschiedenen Knochenmarkzellen gemischt und anschließend auf die Oberflächenmarker IgM, B220 und CD43 untersucht. Die IgM negativen (mittlere Abbildung) aber für B220/CD43 doppelt positiven (rechte Abbildung) Pro-B Zellen wurden sortiert und für weitere Versuche (RT-PCR und Western Blot Analyse) als Kontrollzellen genutzt. SSC-side scatter FSC- forward scatter.

Aus allen Knochenmarkzellen wurden zuerst die für den Oberflächenmarker IgM negativen Zellen als Ausgangspunkt für das Sortieren der Pro B-Zellen ausgewählt, da die Pro-B-Zellen für den in der B-Zell Differenzierung späten Marker negativ sind. Als Pro-B Zellen ließen sich

eindeutig B220 und CD43 doppelt positive Zellen und zugleich für den Oberflächenmarker IgM negative Zellen im FACS-Sorter erkennen (siehe Abb.3.2). Diese Zellen wurden sortiert und für weitere Analysen wie Western Blot oder RT-PCR verwendet.

3.2 Analyse der für die FLT3-ITD Tumorzellen wichtigen Signalwege

Welche Signalwege sind wichtig für die FLT3-ITD Tumorzellen, die in der Lage sind sich selbst zu erneuern sowie unkontrolliert zu proliferieren? Wie in der Einleitung (siehe 1.5) beschrieben, sind in den Leukämiezellen wahrscheinlich Signalwege dysreguliert, die für die Proliferation (Ras/MAPK Signalweg), Apoptose (PI3K/AKT Signalweg), sowie Differenzierung (STAT-Signalweg) der Zellen eine entscheidende Rolle spielen.

Um verschiedene stromabwärts von FLT3-ITD gelegene Signalwege zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Analysen anderer Arbeitsgruppen (Serve et. al.) von lymphoiden 32D-Zellen, die den wt FLT3 Rezeptor exprimierten und dann mit dem FLT3 Liganden stimuliert wurden, zeigten, dass infolgedessen die FLT3 Rezeptor Tyrosinkinase aktiviert und somit auch phosphoryliert wurde, dass die RAS/MAPK Signalkaskade sowie der PI3K/AKT Signalweg aktiviert wurde. Die stromabwärts liegenden Effektoren der oben genannten Signalwege wie die MAPK (Ras/MAPK Signalweg) oder aber AKT (PI3K/AKT Signalweg) wurden im Zuge der FLT3 Aktivierung phosphoryliert. Durch das Einbringen einer FLT3-ITD Mutation in diese Zellen wurde zusätzlich zur Aktivierung der oben genannten Signalwege auch eine Phosphorylierung von STAT5 festgestellt, die bei der Aktivierung des wt FLT3 Rezeptors nicht so stark auftrat. Bisher ist nicht bekannt, ob die Aktivierung von STAT5 direkt durch FLT3 erfolgt oder aber durch ein noch unbekanntes Effektormolekül.

Die entscheidende Frage war, ob in den FLT3-ITD Tumorzellen aus den C57BL/6 Mäusen auch eine Aktivierung dieser Signalwege stattfand und ob diese Signale vergleichbar mit denen von C57BL/6 sortierten Pro-B Zellen (siehe 3.1), in dessen Differenzierungsstadium sich die Tumorzellen befanden, sind. Für diese Analyse dienten FLT3-ITD Knochenmarkzellen, aus retransplantierten Mäusen, die auf den Marker GFP sortiert wurden (siehe 3.1). Das Gesamtprotein der FLT3-ITD / GFP positiven Zellen wurde mittels TCA-Lyse isoliert und als Kontrolle für den Western Blot dienten C57BL/6 Wildtyp Pro B-Zellen (positiv für die Oberflächenmarker CD43 und B220 und negativ für IgM), die zuvor isoliert wurden (siehe Abb. 3.2)

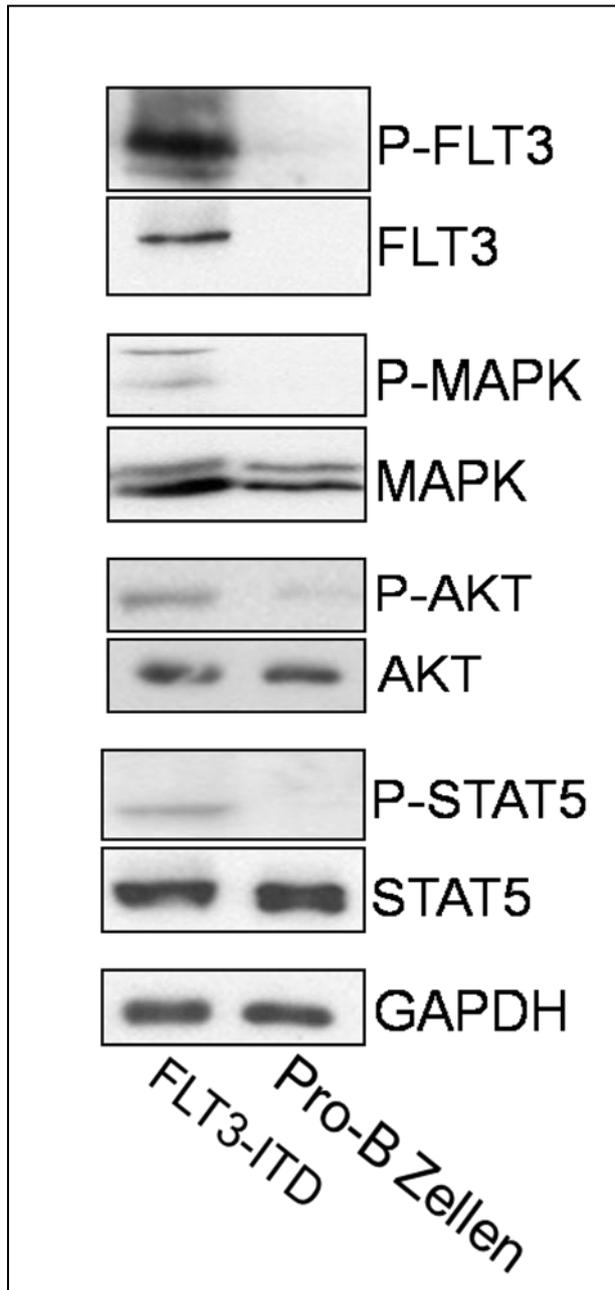


Abbildung 3.3: Western Blot Analyse zur Signaltransduktion von FLT3-ITD.

Analysiert wurden FLT3-ITD Tumorzellen und sortierte Pro B-Zellen (B220 und CD43 positiv, IgM negativ). Die Detektion von verschiedenen Signalproteinen zeigt die Aktivierung des FLT3-Rezeptors, der MAPK von AKT, sowie von STAT5 der B-ALL Tumorzellen im Gegensatz zu den B220/CD43 positiven Kontrollzellen. Die Ladekontrolle GAPDH zeigt, dass gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden.

Anhand der Western Blot Analyse (Abb. 3.3) ist zu erkennen, dass in den sortierten Pro B-Zellen FLT3 kaum bzw. nicht detektierbar exprimiert wurde im Gegensatz zu den FLT3-ITD Tumorzellen, die eine starke Phosphorylierung und somit eine durch die interne Tandem Duplikation konstitutive Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase aufwiesen.

STAT5 war in den Pro B-Zellen auf der Proteinebene detektierbar, jedoch kaum durch Phosphorylierung aktiviert, was gleichermaßen für die MAPK gilt. Die Aktivierung von STAT5 durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 694 wurde bei den FLT3-ITD exprimierenden Zellen festgestellt, was jedoch nicht auf die sortierten Pro B-Zellen zutraf. Im Hinblick auf

AKT ist festzustellen, dass das Protein in Pro B-Zellen durch Phosphorylierung aktiviert wurde, jedoch nicht deutlich geringer als in den FLT3-ITD Tumorzellen. Der Ladekontrolle GAPDH ist zu entnehmen dass hier gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Ras/MAPK Signalweg sowie der PI3K/AKT Signalweg in den FLT3-ITD Tumorzellen konstitutiv aktiv war, was durch die jeweilige Phosphorylierung von der MAPK und AKT in der Western Blot Analyse nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass FLT3 durch die Phosphorylierung konstitutiv aktiv war und dass STAT5 in einer aktiven, phosphorylierten Form vorlag.

3.3 FLT3-ITD Tumorzellen ließen sich in Methylzellulose supplementiert mit murinem IL7 aber nicht in Flüssigkultur kultivieren

Um weitere Versuche zur Proliferation und Apoptose der Tumorzellen, die mit verschiedenen Inhibitoren behandelt werden sollten, durchzuführen, musste eine Methode außerhalb der Retransplantation in C57BL/6 Mäuse entwickelt werden, um die Tumorzellen in vitro in Kultur zu halten. Bei der Methylzellulose handelt es sich um ein semiliquides Medium, welches den Zellen erlaubt sich an einer Stelle im Medium aufzuhalten. Die Methylzellulose enthält nach Angabe des Herstellers StemCellTechnologies® FCS, BSA, Glutamin sowie Beta-Mercaptoethanol, jedoch keine Zytokine. Durch die Proliferation der Zellen können nach sieben Tagen der Kultivierung Zellkolonien gezählt werden. Von den GFP positiven FLT3-ITD Zellen (siehe 3.2) wurden 3×10^3 Zellen in jeweils 3 ml Methylzellulose mit 10 ng/ml mIL7 eingesät. Nach einer Woche wurde überprüft, ob es den Tumorzellen möglich war Kolonien auszubilden. Als Kolonien wurde eine Anhäufung von über 100 Zellen definiert, zudem wurde die Lebendzellzahl durch die Trypanblaufärbung bestimmt.

Tabelle 6: Anzahl von Kolonien und lebenden Zellen von FLT3-ITD Tumorzellen, die in Methylzellulose supplementiert mit IL7 kultiviert wurden.

	Versuch 1			Versuch 2		
Ansätze	1	2	3	4	5	6
Anzahl der Kolonien / 10^3 Zellen	289	234	286	259	262	252
Anzahl der lebenden Zellen/ 10^3 Zellen	$1,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	2×10^6

Anhand der Tabelle 6 ist zu erkennen, dass die FLT3-ITD Tumorzellen in der Lage waren in Methylzellulose mit IL7 zu proliferieren. Die Anzahl der Kolonien schwankte um +/- 21 Kolonien und die Zellzahl um +/- 7×10^5 Zellen. Die Schwankungen der Gesamtzellzahl ergeben sich wahrscheinlich durch die unterschiedliche Größe der Kolonien, die gezählt wurden. So können im Ansatz drei 286 Kolonien gezählt worden sein, die aber im Verhältnis zu Ansatz eins relativ klein waren und somit eine niedrigere Zellzahl ergaben.

Eine Frage, die sich für die weiteren Versuche stellte, war ob es den FLT3-ITD Zellen, die den IL7R auf ihrer Zelloberfläche exprimierten, auch möglich war in Methylzellulose ohne IL7 zu wachsen und somit Faktor-unabhängig proliferieren zu können. Dafür wurden wiederum 3×10^3 Zellen pro 3 ml Methylzellulose (diesmal ohne IL7) ausplattiert. Als Kontrolle wurden drei Ansätze mit mIL7 ausgesät, um eine Positivkontrolle für die Proliferation mitzuführen.

Tabelle 7: Zählen von Kolonien und Bestimmung der Lebendzellzahl von FLT3-ITD Zellen in Methylzellulose ohne IL7.

	Versuch 1			Versuch 2		
Ansätze +/- IL7	1 +	2 +	3 +	1 -	2 -	3 -
Anzahl der Kolonien / 10^3 Zellen	189	211	184	0	0	0
Anzahl der lebenden Zellen / 10^3 Zellen	$0,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	-	-	-

Anhand dieser Ergebnisse aus Tabelle 7 ist zu erkennen, dass es den FLT3-ITD Tumorzellen anscheinend nicht möglich war ohne IL7 zu proliferieren und zu überleben, da keine Kolonien sowie keine lebenden Zellen nach einer Woche der Kultivierung vorhanden waren. Die Tumorzellen, die wie bereits beschrieben, den IL7 Rezeptor exprimieren, sind offensichtlich abhängig von dem Faktor IL7. Der Entzug führte zum Tode der leukämischen Zellen.

Ist es den FLT3-ITD Tumorzellen auch möglich in Flüssigkultur zu proliferieren? Dazu wurden verschiedene Grundmedien wie IMDM oder RPMI1640 mit verschiedenen Zusätzen wie Glutamin, β -Mercaptoethanol, IL7 und verschiedene fetale Kälberseren in verschiedenen

Prozentsätzen getestet. Der Großteil der Zellen starb allerdings nach 48h Stunden in Flüssigkultur, wie Abb 3.3 zeigt.

Um den Anteil der apoptotischen Zellen bestimmen zu können, wurden die Zellen mit Annexin 5 und 7AAD gefärbt. Dabei bindet Annexin 5 spezifisch an Phosphoserinreste, die in frühen apoptotischen Zellen durch den Verlust der Integrität der Plasmamembran auf die Außenseite der Plasmamembrandoppelschicht translozieren (Andree et al., 1990). Durch die Kopplung von Annexin 5 an das Fluorochrom Phycoerythrin (PE) war es möglich, den von Annexin 5 und Phosphoserinresten gebildeten Komplex via FACS-Analyse nachzuweisen. Die Zellen wurden zusätzlich mit 7-Aminoactinomycin (7AAD) gefärbt, welches mit der DNA interkaliert (Crothers und Ratner, 1968) und von toten aber nicht von lebenden Zellen aufgenommen wird. Dies ist ein weiteres Kriterium um apoptotische Zellen mittels FACS-Analyse feststellen zu können. Annexin 5 positive zugleich 7AAD negative Zellen befinden sich in einer frühen Phase der Apoptose, während Zellen, die positiv für beide Marker sind sich bereits in einer späten apoptotischen Phase befinden.

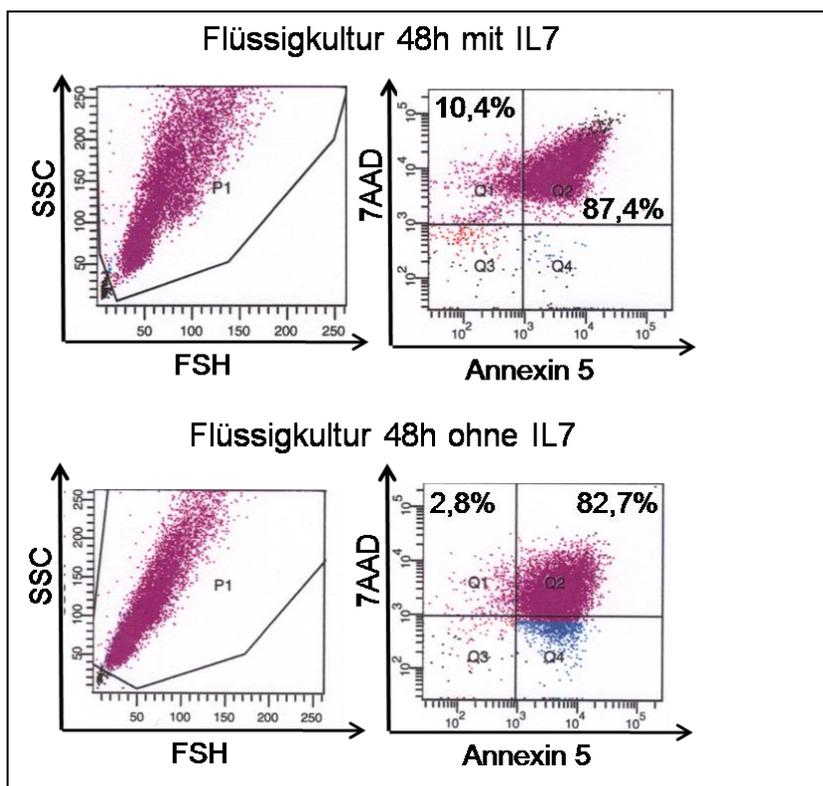


Abbildung 3.4: FACS Analyse von FLT3-ITD Zellen, die in Flüssigkultur gehalten wurden. Nach 48h in Flüssigkultur (IMDM Medium, 20% FCS für Pro-B Zellen von Stem Cell Technologies, 2% Glutamin, 1% Pen/Strep, 1% Natriumpyruvat und +/- 10 ng/ml IL7). Die Zellen wurden auf die apoptotischen Marker Annexin 5 sowie 7AAD untersucht. Über 80% der FLT3-ITD Tumorzellen waren nach 48h in Flüssigkultur mit oder ohne IL7 positiv für beide Marker.

Die FLT3-ITD Tumorzellen wurden für den Haltungsveruch aus der Methylzellulose gelöst und in Flüssigmedium eingesät. Bereits nach 48h in der Kultur waren über 80% der Zellen apoptotisch und für beide Marker, 7AAD sowie Annexin 5, positiv. Dabei spielte es keine Rolle, ob in der Flüssigkultur das von den FLT3-ITD Tumorzellen benötigte IL7 vorhanden war oder nicht (siehe Abb. 3.4).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die FLT3-ITD Tumorzellen bisher nur in Methylzellulose mit Zusatz von Interleukin 7 kultivierbar waren und nicht in Flüssigkultur, weder mit noch ohne Zusatz von IL7.

3.4 Inhibition von verschiedenen Signalwegen in FLT3-ITD Tumorzellen

Es ist bekannt, dass Leukämiepatienten, die eine FLT3-ITD Mutation besitzen, schlechtere Überlebenschancen haben sowie ein höheres Rückfallrisiko besitzen als Leukämiepatienten, die keine FLT3-ITD Mutation aufweisen. Da Leukämiepatienten mit einer FLT3-ITD Mutation eine besonders schlechte Prognose gestellt bekommen, ist es besonders wichtig zu klären, ob sich das Tumorwachstum durch die Inhibition verschiedener Signalwege (PI3K/AKT Signalweg, MAPK Signalweg sowie Phosphorylierung von FLT3 und STAT5) hemmen lässt. Um dieses zu überprüfen, wurden FLT3-ITD Tumorzellen mit den unten genannten Inhibitoren behandelt. Zuvor musste jedoch die Spezifität der Inhibitoren auf Western Blot Ebene überprüft werden.

3.4.1 Spezifität der Inhibitoren

Die Spezifität der Inhibitoren zu überprüfen ist von großer Bedeutung, damit festgestellt werden kann, dass durch die Inhibition eines Signalweges die anderen analysierten Signalwege nicht beeinträchtigt werden. Für diesen Versuch wurden FLT3-ITD Tumorzellen, die zuvor sieben Tage in der Methylzellulose kultiviert wurden, in Flüssigkultur über Nacht mit den verschiedenen Inhibitoren (PKC4512, U0126, Ly294002) behandelt. Anschließend wurde die Proteinlyse sowie eine Western Blot Analyse durchgeführt.

3.4.1.1 Hemmung von FLT3 mittels PKC412 in FLT3-ITD Zellen

Für die Behandlung der FLT3-ITD Tumorzellen mit dem Inhibitor PKC412 wurden FLT3-ITD Tumorzellen aus der Methylzellulose gelöst und in Flüssigkultur eingesät. Zu den Zellen wurden 100 nM/ml des Inhibitors PKC412 oder als Kontrolle DMSO sowie jeweils pro Ansatz 10 ng/ml Interleukin 7 hinzugegeben. Über Nacht wurden die Tumorzellen mit dem Inhibitor oder DMSO inkubiert und anschließend wurden Proteinlysate beider Ansätze hergestellt.

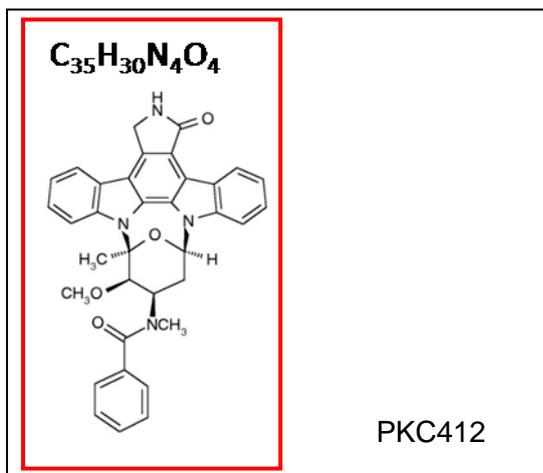


Abbildung 3.5: Strukturformel des FLT3-Inhibitors PKC412.

Bei PKC412 (N-Benzol-Staurosporin) (Strukturformel siehe Abbildung 3.5) handelt es sich um einen FLT3 Inhibitor, der aber auch andere Rezeptor-Tyrosinkinasen des Typ III wie c-Kit sowie Protein Kinase C und PDGFR β (*platelet derived growth factor receptor β*) hemmen kann. Laut Herstellerangaben (Novartis Pharma, Nürnberg) handelt es sich bei der Inhibition um eine direkte Inhibition, die kompetitiv im Hinblick auf ATP ist. Der IC₅₀Wert schwankt je nach der zu hemmenden Kinase in verschiedenen Zellsystemen (Wiseberg et al. 2002). Die hier eingesetzte Konzentration war 100 nM / ml.

Die Stimulation der FLT3-ITD Tumorzellen mit dem PKC412 Inhibitor resultierte in einer deutlichen bis kaum mehr detektierbaren Abnahme der Phosphorylierung von FLT3 in den PKC412 behandelten Zellen im Vergleich zu den mit DMSO behandelten FLT3-ITD Tumorzellen (Abb. 3.6). Die Phosphorylierungen der MAPK, von AKT sowie von STAT5 waren im Gegensatz zu den DMSO stimulierten Zellen deutlich reduziert, was dafür spricht, dass diese Signalwege über die Aktivierung von FLT3 durch die interne Tandem Duplikation aktiviert werden und somit für die Signaltransduktion der FLT3-ITD Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielen.

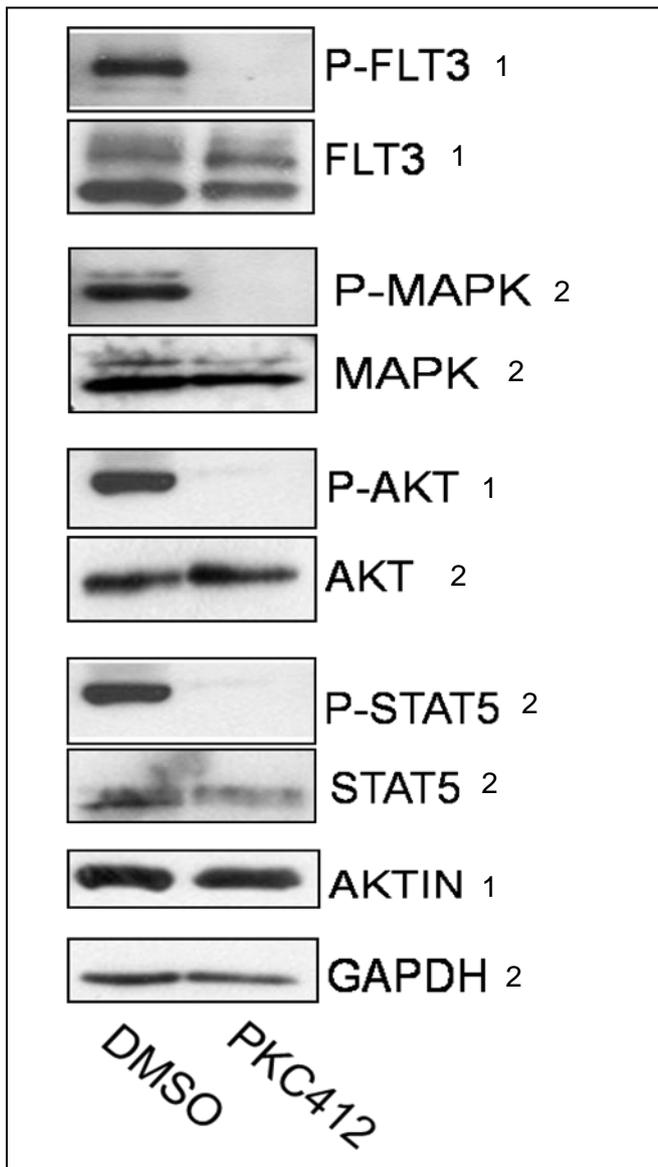


Abbildung 3.6: Hemmung von FLT3 durch den Inhibitor PKC412.

FLT3-ITD Tumorzellen wurden über Nacht in Flüssigkultur mit 100 nM PCK412 oder DMSO stimuliert, lysiert und mittels Western Blot Analyse untersucht. Da zwei unterschiedliche Membranen für die Analyse verwendet wurden, wurde hinter der Darstellung für das jeweilige Protein eine 1 für die Ladekontrolle AKTIN oder eine 2 für GAPDH vermerkt. Anhand der PKC412 stimulierten FLT3-ITD Zellen ist zu erkennen, dass die analysierten von FLT3-ITD stromabwärts gelegenen Signalwege inhibiert und somit die aktivierenden Phosphorylierungen der Proteine gehemmt wurden.

¹ Blot1; ² Blot 2

3.4.1.2 Hemmung von MEK mittels U0126 in FLT3-ITD Zellen

Für die Hemmung des MAPK-Signalweges wurde der MEK Inhibitor U0126 eingesetzt. Als stromabwärts liegender Effektor von MEK wurde die Aktivierung/Phosphorylierung der MAPK im Western Blot untersucht. Die FLT3-ITD Tumorzellen wurden aus der Methylzellulose gelöst und über Nacht mit 20 μ M U0126 oder DMSO in Flüssigkultur stimuliert. Proteinlysate wurden angefertigt und mittels Western Blot Analyse untersucht. Bei dem eingesetzten Inhibitor handelt es sich um U0126 (Strukturformel siehe Abb.3.7) (1,4-Diamino-2,3-dicyano-

1,4-bis (2-aminophenylthio) butadiene), welcher ein spezifischer MEK1 ($IC_{50} = 72 \text{ nM}$) und MEK2 ($IC_{50} = 58 \text{ nM}$) Inhibitor ist.

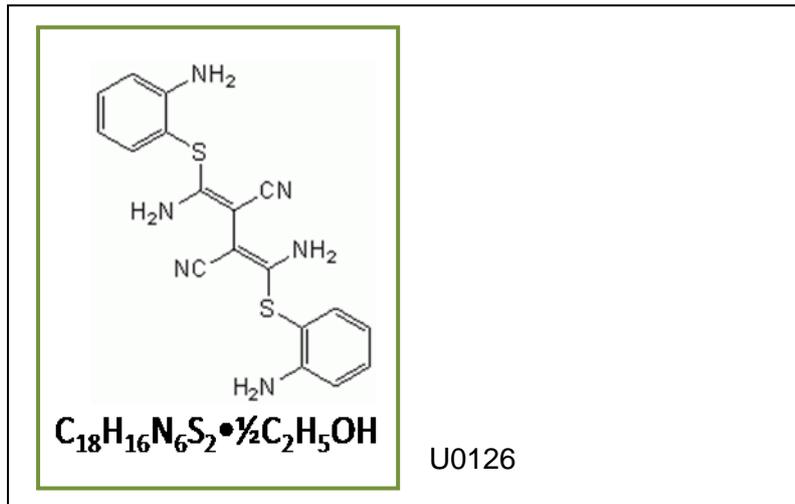


Abbildung 3.7: Strukturformel des MEK Inhibitors U0126.

Laut Herstellerangabe von Merck/Calbiochem ist die Inhibition nicht kompetitiv in Bezug auf ATP und ERK. Der Inhibitor kann auch hemmende Effekte auf andere Kinasen haben wie Abl, Cdk2, Cdk4, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, PKC, und Raf. Für die Inhibitorversuche wurde eine Konzentration von $20 \mu\text{M}$ / ml eingesetzt.

Dass der Inhibitor spezifisch agiert konnte mittels Western Blot Analyse gezeigt werden. Der Phosphorylierungsgrad und somit die Aktivierung von FLT3 und STAT5 waren in beiden Ansätzen der FLT3-ITD Tumorzellen, die mit DMSO oder mit dem Inhibitor U0126 stimuliert wurden, nahezu identisch (siehe Abbildung 3.8). Für den Stromabwärtseffektor AKT ist eine Zunahme der relativen Phosphorylierung zu erkennen, da die totale Menge des AKT Proteins in der mit dem MEK Inhibitor behandelten Probe reduziert war. Es kann davon ausgegangen werden, dass der MAPK-Inhibitor keinen der anderen untersuchten Signalwege beeinträchtigt hat. Die Abnahme der Phosphorylierung der MAPK konnte per Western Blot in den FLT3-ITD Tumorzellen, die mit U0126 behandelt wurden, eindeutig festgestellt werden.

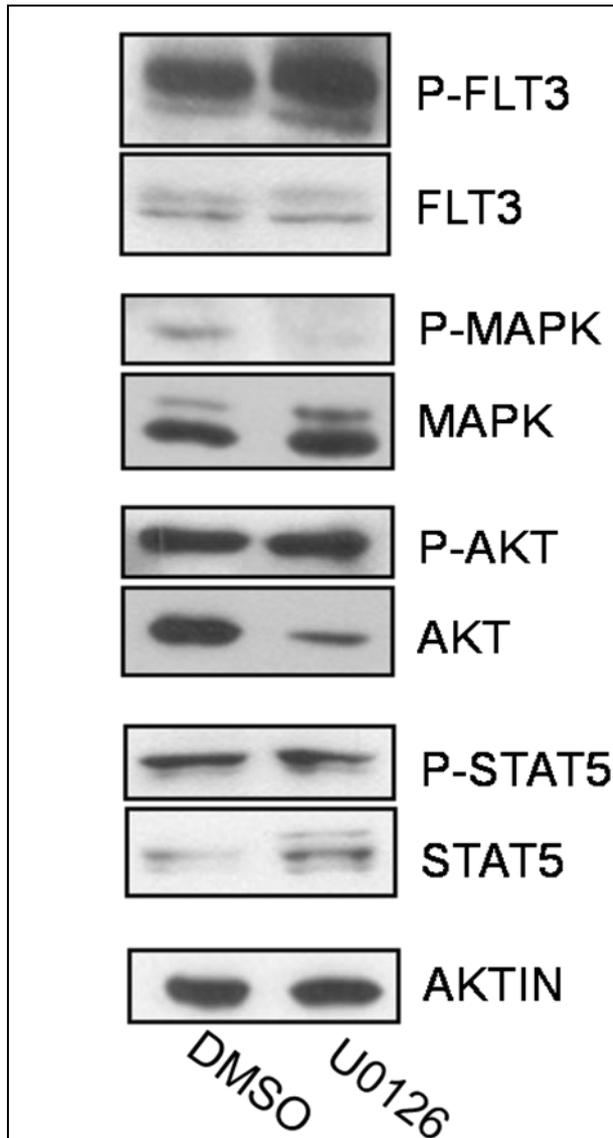


Abbildung 3.8: Hemmung der MEK durch den Inhibitor U0126.

FLT3-ITD Tumorzellen wurden in Flüssigkultur über Nacht mit 20 μ M U0126 oder DMSO stimuliert, die Proteine wurden lysiert und mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Spezifität des Inhibitors ist zu erkennen, da nur die Phosphorylierung der MAPK durch die Inhibitorbehandlung in FLT3-ITD Tumorzellen reduziert wurde, nicht aber die Phosphorylierung der anderen untersuchten FLT3-ITD stromabwärts Effektoren im Vergleich mit der DMSO Kontrolle.

3.4.1.3 Hemmung der PI3K in FLT3-ITD Tumorzellen

Auch bei diesem Versuch wurden FLT3-ITD Tumorzellen eingesetzt, die in Methylzellulose gehalten wurden. Für die Inhibition wurden die Tumorzellen aus der Methylzellulose gelöst und in Flüssigkultur überführt. Über Nacht wurden die Zellen mit 20 μ M Ly294002 oder aber für die Kontrolle mit DMSO stimuliert. Anschließend zur Proteingewinnung wurden die Zellen lysiert und per Western Blot Analyse untersucht. Der hier eingesetzte Inhibitor Ly294002 (Strukturformel: Abbildung 3.9) 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-eins ist ein spezifischer PI3K Inhibitor ($IC_{50} = 1.4 \mu$ M), der an der ATP Bindestelle der Kinase wirkt. Laut Herstellerangabe (MERCK/Calbiochem) wird auch die NHEJ (*non-homologous DNA end*

joining') Aktivität der 460 kDa ,Phosphatidylinositol 3-like kinase DNA-PKc_s', welche die katalytische Untereinheit der DNA-aktivierenden Proteinkinase ist, inhibiert. Die Inhibition hat selbst bei hohen Konzentrationen von 50 µM keinen Einfluss auf die EGF (epidermal growth factor) Kinase, MAP Kinase, PKC, PI4-Kinase, S6-Kinase sowie c-Src. Die in den Versuchen eingesetzte Konzentration war 20 µM / ml.

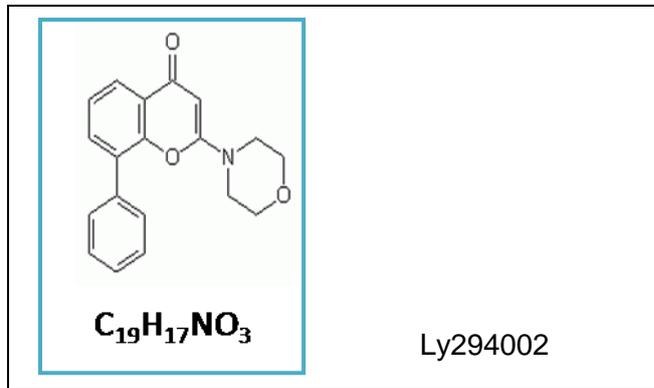


Abbildung 3.9: Strukturformel des PI3K-Inhibitors Ly294002.

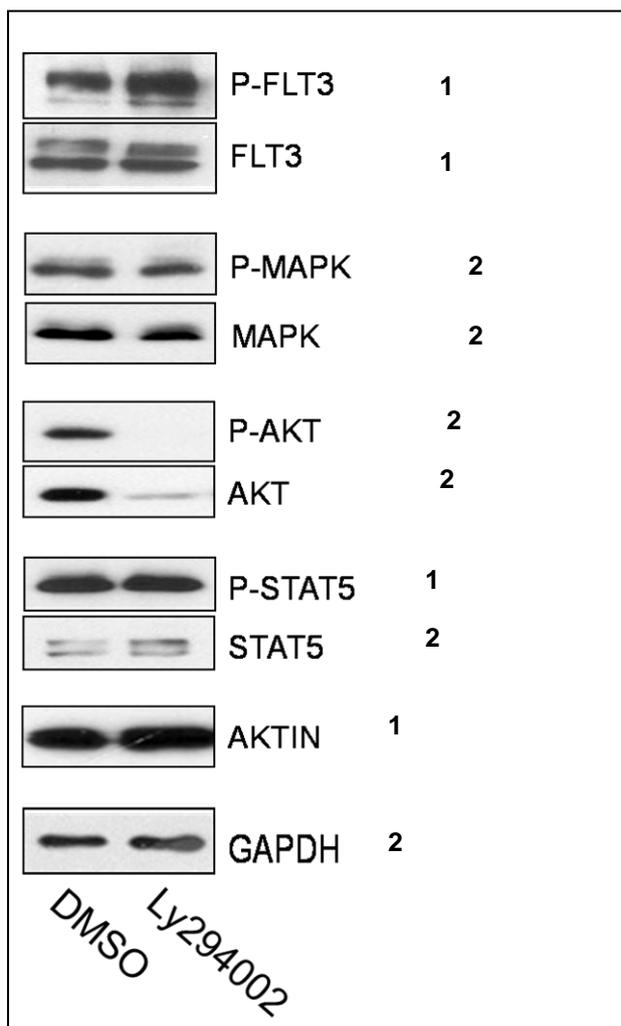


Abbildung 3.10: Hemmung der PI3K mittels Ly294002 in FLT3-ITD Tumorzellen

FLT3-ITD Tumorzellen wurden über Nacht im Flüssigmedium mit 20 µM des PI3K Inhibitors Ly294002 oder mit DMSO stimuliert. Proteinlysate wurden angefertigt sowie eine Western Blot Analyse durchgeführt. Für die Analyse wurden zwei unterschiedliche Membranen genutzt. Damit die Auftragung der Proteinmengen vergleichbar ist, wurden die Ladekontrollen AKTIN mit einer 1 und GAPDH mit einer 2 hinter den entsprechenden untersuchten Proteinen gekennzeichnet. Die Spezifität des Inhibitors kann durch die Herunterregulation des Phospho-AKT Signals bestätigt werden. Die anderen analysierten Signalwege zeigen keine Beeinflussung durch den Inhibitor.

Auch bei diesem Inhibitor konnte die Spezifität für den PI3K-AKT Signalweg festgestellt werden. Die Intensität der Phosphorylierungen von FLT3, STAT5 sowie der MAPK sind bei den FLT3-ITD Tumorzellen, die mit dem Inhibitor Ly294002 behandelt wurden, vergleichbar mit FLT3-ITD Tumorzellen, die mit DMSO als Kontrolle behandelt wurden.

Unterschiede konnten nur im Phosphorylierungsgrad des PI3K-Effektors AKT festgestellt werden: die Ly294002 behandelten Zellen wiesen im Gegensatz zu den mit DMSO behandelten FLT3-ITD Tumorzellen (Abbildung 3.10). ein auf Proteinebene nicht mehr detektierbares Phospho-AKT Signal auf. Allerdings nahm auch unerwarteterweise das AKT Signal in der mit dem Inhibitor behandelten FLT3-ITD Zellen ab, was später noch diskutiert werden muss. Es kann auch in dieser Analyse ein Einfluss auf die anderen untersuchten Signalwege ausgeschlossen werden, was die Spezifität des PI3K-Inhibitors Ly294002 bestätigt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die verschiedenen eingesetzten Inhibitoren spezifisch für ihre zu hemmenden Substrate waren und keinen Einfluss auf die stromabwärts von FLT3 gelegenen Signalwege aber auch keinen Einfluss auf die Aktivierung/Phosphorylierung von FLT3 selbst hatten.

3.4.2 Einfluss der Inhibition verschiedener Signalwege auf die Proliferation und Apoptose der FLT3-ITD B-ALL Tumorzellen

Die Anwendung verschiedener Inhibitoren für die zu charakterisierenden Signalwege kann auch in der Therapie von Leukämie-Patienten mit einer FLT3-ITD Mutation von Bedeutung sein, da geklärt werden könnte, ob die Tumorzellen durch die Hemmung der für sie wichtigen Signalwege absterben bzw. in ihrer Proliferation beeinträchtigt werden. Da sich die FLT3-ITD Tumorzellen nicht in Flüssigkultur kultivieren ließen (siehe 3.3), wurden alle Inhibitorversuche in Methylzellulose durchgeführt. Dazu wurden FLT3-ITD/ GFP positive Milzzellen aus FLT3-ITD C57BL/6 Mäusen wie vorher beschrieben (siehe 3.1) isoliert und es wurden 3×10^3 Zellen in 3 ml Methylzellulose eingesät. Zu 10 ng / ml mL-7 wurden die verschiedenen Inhibitoren (PKC412, Ly294002, U0126 und zusätzlich der Src-Kinase Inhibitor PP2) oder aber DMSO als Kontrolle dazu gegeben und die Zellen sieben Tage in der Methylzellulose kultiviert bevor die entstandenen Kolonien sowie die lebenden Zellen gezählt wurden. Die lebenden Zellen wurden durch die Trypanblau-Färbung von toten Zellen in der Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop unterschieden. Die gesamten Zellen der verschiedenen

Ansätze wurden zusätzlich mit Annexin 5 und 7AAD gefärbt, um am Durchflusszytometer die Prozentzahl apoptotischer Zellen bestimmen zu können.

Tabelle 8: Zählung der Kolonien sowie der lebenden Zellen nach Inhibitorbehandlung der Tumorzellen zeigt eine deutliche Abnahme in der Anzahl der Kolonien sowie der lebenden Zellen im Vergleich zu der DMSO Kontrolle. Gezeigt sind die Daten von drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse des PP2-Inhibitorversuchs sind einzeln aufgeführt, da dieser Versuche separat von den anderen Inhibitorversuchen durchgeführt wurde und somit auch eine andere DMSO-Kontrolle besitzt.

	Mittelwerte der Kolonien / 10^3 eingesäten Zellen			Mittelwerte der lebenden Zellen/ 10^3 eingesäten Zellen		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch3
DMSO	166	286	255	$0,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
PKC412	86	94	114	$1,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
U0126	52	45	66	1×10^5	$1,4 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$
Ly294002	56	101	23	6×10^4	3×10^4	1×10^4
DMSO	349	356	342	7×10^5	9×10^5	10×10^5
PP2	243	149	139	2×10^5	$0,7 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$

Die Ergebnisse der Zählung der Kolonien und der lebenden Zellen sind in Tabelle 8 gezeigt. Eine Abnahme der Anzahl von Kolonien sowie der Anzahl an lebenden Zellen, die nach sieben Tagen der Inkubation in der Methylzellulose mit den verschiedenen Inhibitoren gezählt wurden, ist in allen mit den Inhibitoren behandelte FLT3-ITD Zellen deutlich zu erkennen. Um alle Ergebnisse zusammenzufassen, wurde der prozentuale Wert der Inhibition bestimmt. Dabei wurden die Anzahl der Kolonien und der lebenden Zellen aus den drei voneinander unabhängigen Versuchen mit denen der DMSO Kontrolle verglichen und prozentual auf die DMSO-Kontrolle bezogen.

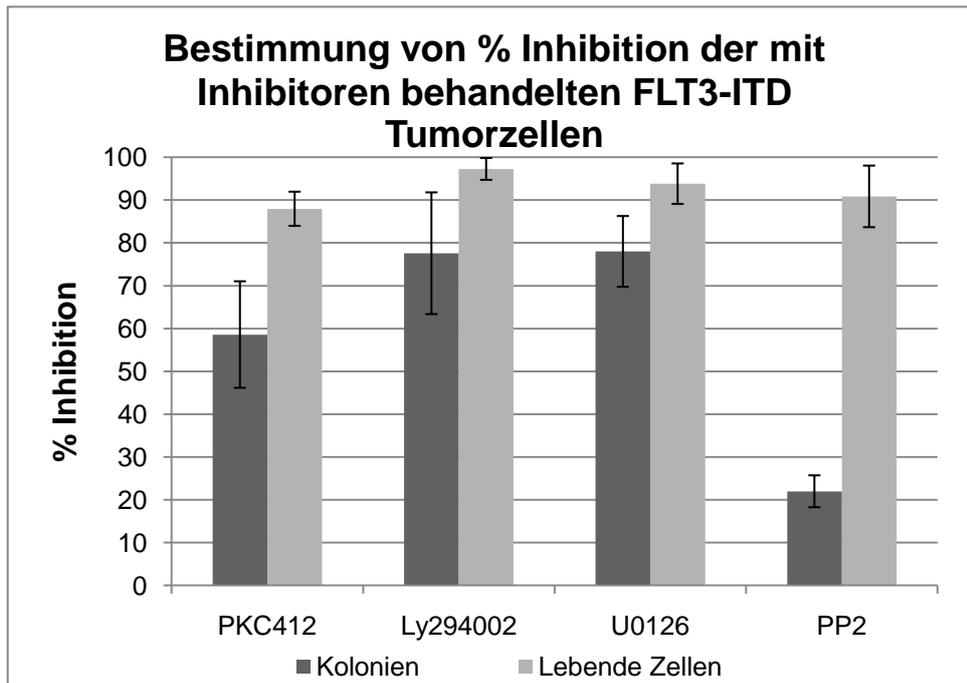


Abbildung 3.11: % Inhibition der FLT3-ITD Tumorzellen, die mit verschiedenen Inhibitoren (PKC412 – FLT3, U0126 – MEK, Ly294002 – PI3K, PP2 – Src-Kinase) sieben Tage in Methylzellulose kultiviert wurden. In Dunkelgrau ist der Wert für % Inhibition der gezählten Kolonien im Bezug auf die mit DMSO kultivierten Zellen, in Hellgrau ist der Wert für Inhibition der lebenden Zellen im Bezug auf die DMSO Kontrolle, abgebildet. Alle FLT3-ITD Tumorzellen, die mit Inhibitoren behandelt wurden, zeigten eine reduzierte Anzahl der Kolonien sowie der lebenden Zellen im Gegensatz zu FLT3-ITD Tumorzellen, die mit DMSO stimuliert wurden.

Anhand der Grafik ist zu erkennen, dass die verschiedenen eingesetzten Inhibitoren Einfluss auf die Proliferation, die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden sowie auf die Anzahl der lebenden Zellen zeigten. In allen Ansätzen war eine Reduktion der Anzahl der Kolonien sowie der lebenden Zellen zu verzeichnen.

Für die Zellen, die mit dem FLT3-Inhibitor PKC412 behandelt wurden, wurden zusammengefasst Inhibitionswerte von 58% für die Kolonien und 88% in Hinblick auf lebende Zellen kalkuliert (siehe Abbildung 3.11). Verglichen mit der DMSO Kontrolle zeigen diese Werte eindeutig eine Abnahme der Proliferation und somit einen Effekt des FLT3-Inhibitors auf die Proliferation der Zellen sowie auf die Fähigkeit der Tumorzellen Kolonien auszubilden.

Einen Einfluss auf die Proliferation hatten ebenfalls die beiden Inhibitoren U0126 und Ly294002 mit Inhibitionswerten von 78% bzw. 77% in Bezug auf die Kolonien und 94% bzw. 97% in Hinblick auf die lebenden Zellen (siehe Abbildung 3.11). Es konnte festgestellt werden, dass die FLT3-ITD Zellen, die mit dem MEK-Inhibitor U0126 oder dem PI3K-

Inhibitor Ly294002 behandelt wurden, weniger Kolonien gebildet haben und so einen niedrigeren Wert für die Inhibition aufwiesen im Vergleich mit Tumorzellen, die mit DMSO behandelt wurden. Einen in Hinblick auf den für die Kolonien gezeigten Inhibitionswert von 22% nicht ganz eindeutigen Effekt hatte der Src-Kinase Inhibitor PP2, was später diskutiert werden muss. In Bezug auf die Lebendzellzahl konnte allerdings ein Wert von 91% Inhibition festgestellt werden.

Für die Proliferation sowie das Überleben der FLT3-ITD Tumorzellen scheinen alle mit Inhibitoren gehemmten Signalwege eine wichtige Rolle zu spielen, denn alle Inhibitoren führten zu einer Hemmung der Koloniebildung sowie zu einer Reduktion der Lebendzellzahl.

3.4.3 Analyse des Einflusses von Inhibitoren auf die Apoptose der FLT3-ITD Tumorzellen

Dass die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren einen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen zeigten, wurde durch die vorangegangenen Ergebnisse (3.4.1/3.4.2) dargestellt. Im Anschluss daran stellte sich die Frage, ob die FLT3-ITD Tumorzellen, die in ihrer Proliferation durch die Hemmung der verschiedenen Signalwege gehemmt wurden auch vermehrt in Apoptose gegangen sind. Die für die Messung apoptotischer Zellen eingesetzten FLT3-ITD Tumorzellen stammten aus den Proliferationsversuchen (3.4.1): die Tumorzellen, die eine Woche mit den verschiedenen Inhibitoren oder DMSO in Methylzellulose gehalten wurden, wurden zuerst auf die Anzahl der gebildeten Kolonien und die lebenden Zellen hin untersucht und anschließend mit den beiden Markern 7AAD und Annexin 5 gefärbt, um den Anteil apoptotischer Zellen bestimmen zu können. Als Positivkontrolle für beide Marker dienten FLT3-ITD Tumorzellen, die für 48h in Flüssigkultur gehalten wurden (siehe 3.3). Die FACS Analysen wurden mit GFP-negativen Ba/F3 Zellen kompensiert, die 24h vor der Messung mit Staurosporin behandelt wurden, da die FLT3-ITD Zellen bereits positiv für GFP durch den retroviralen FLT3-ITD Vektor waren. Als apoptotische Zellen werden Annexin/7AAD doppelt positive Zellen sowie 7AAD positive Zellen gezählt.

Anhand der Analyse (siehe Abbildung 3.12) ist zu erkennen, dass die GFP positiven FLT3-ITD Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, eine basale Apoptose von 9,1% aufwiesen. Dieser Wert unterscheidet sich nicht wesentlich von Zellen, die mit dem FLT3-Inhibitor PKC412 behandelt wurden, die einen Anteil von 8,4% apoptotischen Zellen aufwiesen.

Anhand der FACS-Analyse sind Unterschiede in Bezug auf DMSO und PKC412 behandelte Zellen in der Verteilung der apoptotischen Zellen bei den Inhibitoren U0126 und Ly294002 zu erkennen. Zu den zwei Zellpopulationen, die entweder doppelt positiv für Annexin 5 und 7AAD oder einzelpositiv für 7AAD sind, kommt eine dritte Zellpopulation hinzu, die sich von der 7AAD/Annexin5 negativen Zellpopulation zu der 7AAD/Annexin5 doppelt positiven Population verschiebt. Dieser Effekt kann verschiedene Gründe haben; zum Beispiel dass diese Population durch die Kompensation der GFP hoch exprimierenden Zellen zu den GFP niedrig exprimierenden Zellen zustande kommt. Es wurde schon häufig beobachtet, dass GFP-positive Zellen während apoptotischer Prozesse den Marker GFP verlieren. Die Werte für den Prozentsatz apoptotischer Zellen liegt bei den mit dem Inhibitoren U0126 behandelte Zellen bei 28% bzw. bei mit dem PI3K-Inhibitor behandelte Zellen bei ca. 16%, welches kein großer Anstieg apoptotischer Zellen in Bezug auf die DMSO Kontrolle darstellt. Auch die mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 behandelte Zellen zeigten einen Wert von ca. 19% apoptotischer Zellen. Einen sehr hohen Wert an apoptotischen FLT3-ITD Tumorzellen von ca. 90% zeigte die Probe, die für 48h in Flüssigkultur gehalten wurde.

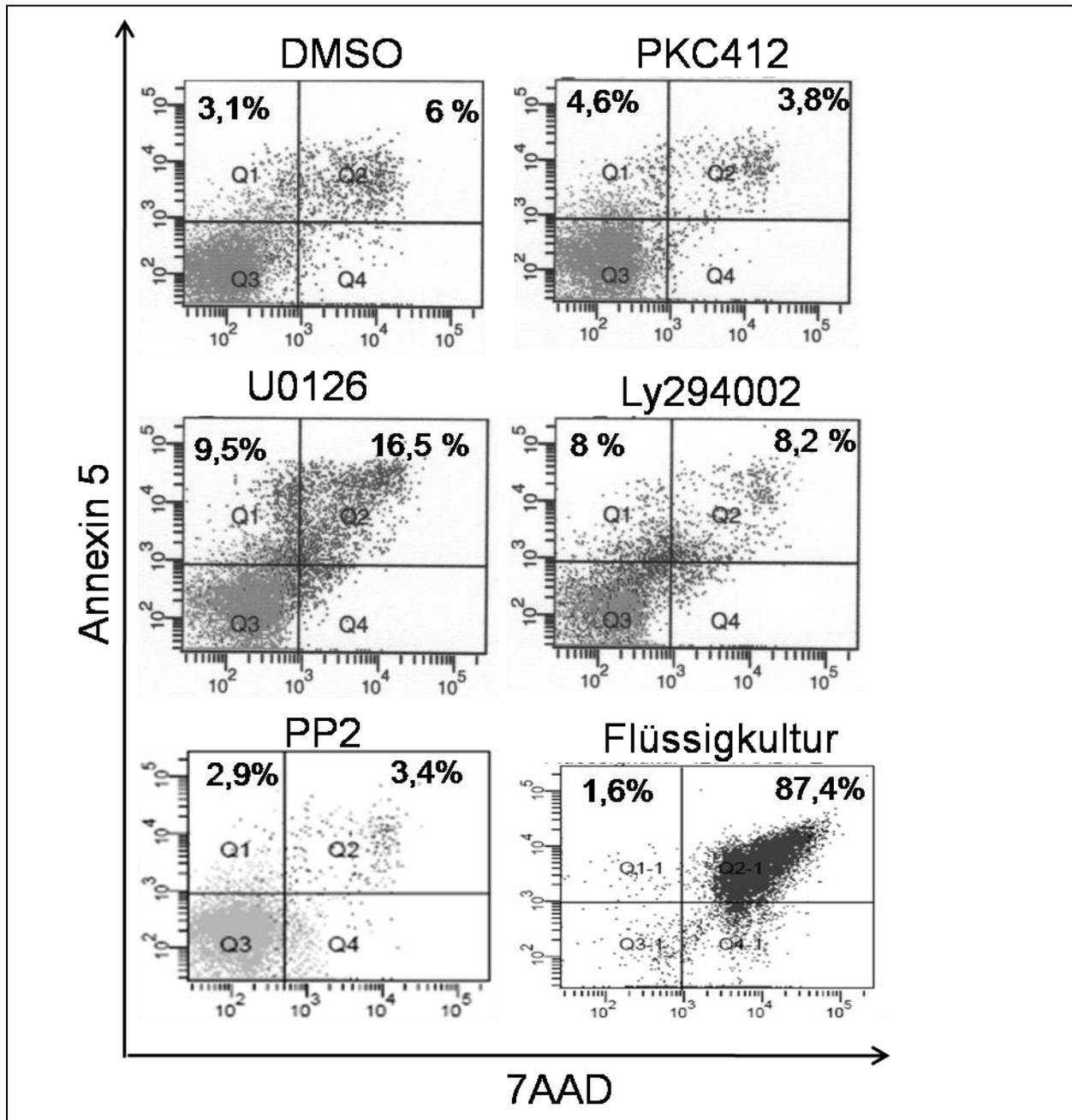


Abbildung 3.12: FACS Analyse der GFP positiven FLT3-ITD Tumorzellen, die mit verschiedenen Inhibitoren behandelt wurden. Auf der Y-Achse ist der Marker Annexin 5 aufgetragen und auf der X-Achse der Marker 7AAD. Die Daten stehen repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche. Die Flüssigkultur, die mit IL7 gehalten wurde, dient als Positivkontrolle für beide Marker während die in der Methylzellulose gehaltenen und mit DMSO behandelten Zellen als unbehandelte Kontrolle gezeigt wird. In allen mit den Inhibitoren behandelten FLT3-ITD Zellen sind apoptotische Zellen (positiv für beide Marker) vorhanden. Die Gesamtheit der apoptotischen Zellen ist in den behandelten Proben nicht signifikant größer als in der mit DMSO behandelten Probe.

Um alle drei Inhibitorversuche, in denen der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt wurde, zusammen zu fassen (siehe 3.4.3) wurde von allen FACS-Analysen der Mittelwert der

apoptotischen Zellen (7AAD positiv/ 7AAD/Annexin 5 doppelt positiv) gebildet (siehe Abb.3.13). Wie bereits beschrieben (vergleiche 3.3), starben die FLT3-ITD Tumorzellen in Flüssigmedium in der Zellkultur. Als Positivkontrolle für apoptotische Zellen konnten daher Zellen dienen, die in Flüssigkultur gehalten wurden. Nach 48h in der Haltung waren in allen drei Versuchen ca. 96% der Zellen positiv für Annexin 5 und 7AAD. Um die Werte für die basale Apoptose zu bestimmen, wurden auch FLT3-ITD Tumorzellen, die mit DMSO als Kontrolle kultiviert wurden, analysiert: sie wiesen einen Anteil von 12% apoptotischer Zellen auf. FLT3-ITD Tumorzellen, die mit PKC412 inkubiert wurden, wiesen nur einen leicht erhöhten Anteil apoptotischer Zellen von 16% im Hinblick auf die DMSO Kontrolle auf. Ly294002 sowie PP2 behandelte Zellen zeigten einen Prozentsatz von 16% bzw. 13% apoptotischer Zellen, währenddessen die mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelten Zellen einen im Gegensatz zur DMSO Kontrolle leicht erhöhten Wert von 28% aufwiesen.

Es kann jedoch festgehalten werden, dass die mit den verschiedenen Inhibitoren PKC412, PP2 und Ly294002 behandelten FLT3-ITD Tumorzellen trotz verminderter Proliferation sowie der Fähigkeit, Kolonien in der Methylzellulose auszubilden, keine erhöhten Werte für die beiden Apoptosemarker Annexin 5 und 7AAD im Vergleich zu DMSO-Kontrollzellen zeigten. Die U0126 behandelten Tumorzellen allerdings zeigten einen leichten Anstieg apoptotischer Zellen im Gegensatz zur DMSO Kontrolle, was nochmals die Wichtigkeit des Ras/Raf/MAPK/ERK Signalweges für die FLT3-ITD Tumore unterstreicht.

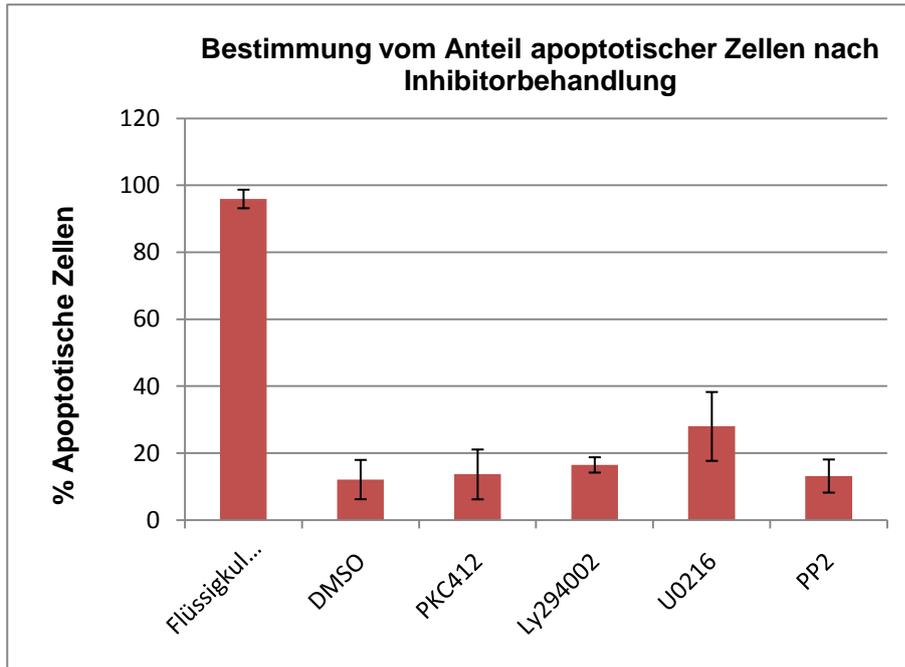


Abbildung 3.13: Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mit Hilfe der Apoptosemarker Annexin 5 und 7AAD. Die Gesamtheit aller Zellen, die mit den verschiedenen Inhibitoren oder DMSO in Methylzellulose gehalten wurden, wurde mit beiden Markern gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Die verschiedenen Messwerte setzen sich aus drei getrennt voneinander durchgeführten Analysen zusammen. Es war keine erhöhte Apoptose der mit Inhibitoren behandelten Zellen zu erkennen.

3.5 Inhibition von STAT5 durch Infektion der FLT3-ITD Tumorzellen mit dominant negativen STAT5 Mutanten

Da bisher keine effektiven STAT5 Inhibitoren käuflich zu erwerben sind, weil alle Mitglieder der STAT Familie eine große Homologie aufweisen, wurden für die Inhibition des STAT5 Proteins dominant negative Formen (STAT5a sowie STAT5b) in den FLT3-ITD Tumorzellen über retrovirale Vektoren exprimiert.

Normalerweise bildet das phosphorylierte, aktive STAT5 Protein ein Homo- oder ein Heterodimer durch die intermolekulare Interaktion zwischen der SH₂-Domäne und den Phosphotyrosin-Resten des STAT5s. Das STAT5-Dimer wandert dann in den Nukleus und bindet an Promotorregionen von Zielgenen und aktiviert deren Transkription.

Alle STAT-Moleküle haben eine hoch-konservierte Tyrosin-Phosphorylierungsseite, die sich um den Aminosäurebereich 700 gelegen befindet. Die Phosphorylierung wird für die

Dimerisierung und Translokation in den Nukleus benötigt. Bei der dominant negativen Mutation von STAT5a und STAT5b handelt es sich um einen Aminosäureaustausch eines Tyrosins zu einem Phenylalanin an der Aminosäure 701. Dieser Austausch täuscht strukturell einen phosphorylierten Tyrosinrest vor, sodass es zur Dimerbildung des mutierten inaktiven STAT5 mit einem funktionalen aktiven STAT5 Protein kommen kann. Die DNA-Bindekapazität des Dimers jedoch durch die fehlende Phosphorylierung der anderen Tyrosinreste des mutierten STAT5 stark herabgesetzt wird. So kann die Expression von Zielgenen wie Oncostatin M oder BCL-X_L stark vermindert sein (Gouilleux et al 1996).

Die dominant negativen Mutanten wurden in retrovirale MPEV-Vektoren kloniert (siehe Abb. 3.14), die als Selektionsmarker Neomycin (G418) exprimieren. Somit konnten infizierte Zellen auf die Neomycin/G418-Resistenz selektioniert werden. Zusätzlich wurden STAT5A und STAT5B jeweils mit einem Myc- bzw. HA-Tag versehen, damit in der Western Blot Analyse zwischen den beiden STAT5-Isoformen unterschieden werden konnte.

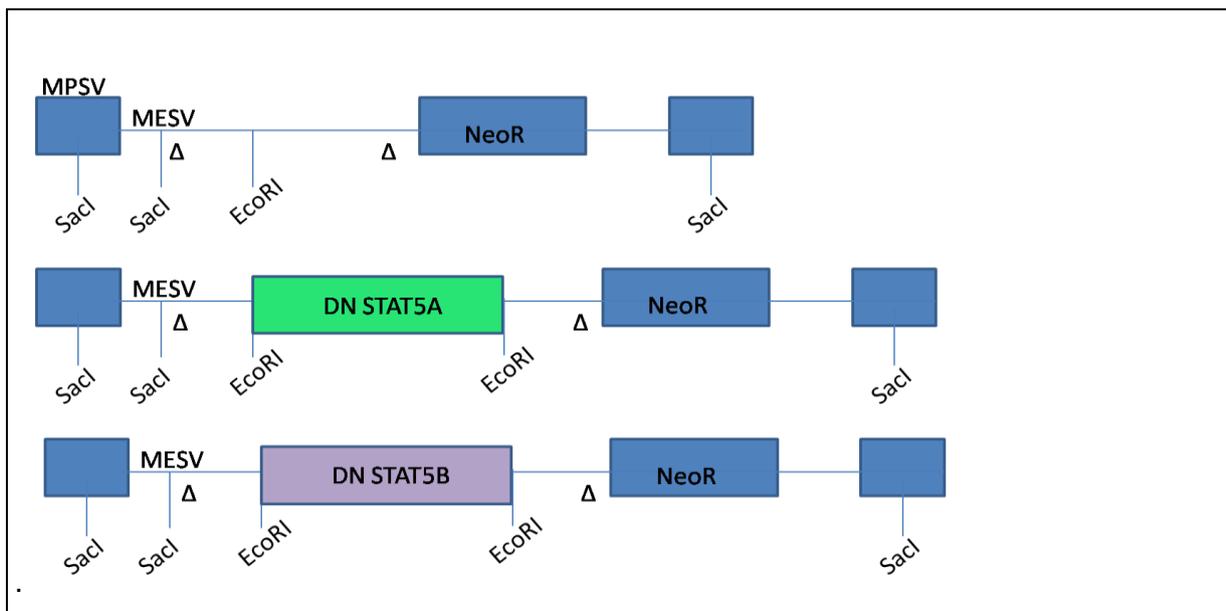


Abbildung 3.14: Retrovirale MPSV-Vektoren mit dominant negativen STAT5 Konstrukten, die für die Infektion von FLT3-ITD Tumorzellen verwendet wurden. Jeder Vektor besitzt als Selektionsmarker ein G418-Resistenzgen. Die Vektoren mit DN STAT5A sowie DN STAT5B besitzen jeweils ein MYC-Tag bzw. ein HA-Tag für das DN STAT5A bzw. DN STAT5B Protein.

3.5.1 Mit DN STAT5 Mutanten infizierte FLT3-ITD Tumorzellen zeigten eine verminderte Proliferation

Ziel der folgenden Experimente war es zu untersuchen, ob die Infektion der FLT3-ITD Zellen mit DN STAT5 Mutanten einen Effekt auf die Proliferation der leukämischen Blasten zeigen würde. Um eine erfolgreiche Infektion der FLT3-ITD Tumorzellen zu erreichen, wurden zunächst Tumorzellen in Methylzellulose vermehrt, anschließend in Flüssigmedium ausplattiert und mit den vorher in 293T Zellen produzierten retroviralen Pseudotypen infiziert.

24h nach der Infektion wurden dem Medium 1 mg/ml G418 zugesetzt, um die Selektion der G418 resistenten und somit infizierten Zellen zu begünstigen. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für sieben Tage in Flüssigmedium (FK) mit 10 ng mL7/ml und 50 ng/ml SCF kultiviert und der andere Teil für 7 Tage in Methylzellulose (MZ) supplementiert mit mL7. Beiden Ansätzen wurde 1 mg/ml G418 zugesetzt. Waren die Kontrollzellen tot, bei denen es sich um uninfizierte FLT3-ITD Zellen handelte, konnte von einer positiven Selektion auf G418 resistente Zellen ausgegangen werden. Die Zellen aus beiden Ansätzen wurden jeweils in Methylzellulose supplementiert mit mL-7 und G418 ausgesät, für sieben Tage kultiviert und anschließend wurden Kolonien sowie die lebenden Zellen beider Ansätze gezählt.

Tabelle 9: Mit DN Mutanten infizierte FLT3-ITD Tumorzellen zeigten eine verringerte Anzahl an Kolonien sowie lebenden Zellen im Vergleich zu der Neo-Kontrolle. Mit den DN STAT5 Formen infizierte FLT3-ITD Tumorzellen wurden in Flüssigkultur (FK) oder aber in Methylzellulose (MZ) selektioniert. Anschließend wurden die Zellen für 7 Tage in Methylzellulose mit mL7 kultiviert. Die Anzahl der Kolonien sowie der lebenden Zellen wurden in Triplikaten bestimmt.

FLT3-ITD Tumorzellen in Flüssigkultur selektioniert						
	Kolonien / 10 ³ Zellen			Lebende Zellen/ 10 ³ Zellen		
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz3
Neo Kontrolle	62	58	66	6,0x10 ⁵	5,1x10 ⁵	6,2x10 ⁵
DN STAT5A	12	14	9	1,0x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,0x10 ⁴
DN STAT5B	7	9	9	1,0x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,0x10 ⁴
FLT3-ITD Tumorzellen in Methylzellulose selektioniert						
	Kolonien / 10 ³ Zellen			Lebende Zellen/ 10 ³ Zellen		
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz3
Neo Kontrolle	59	54	39	5,9x10 ⁵	4,8x10 ⁵	3,9x10 ⁵
DN STAT5A	6	2	4	1,0x10 ⁴	3x10 ³	6x10 ³
DN STAT5B	0	3	1	0	4x10 ³	1x10 ³

Wie anhand der Tabelle 9 zu erkennen ist, haben die Zellen, die mit den dominant negativen STAT5 Mutanten infiziert wurden, in beiden Ansätzen weniger Kolonien ausgebildet. FLT3-ITD Zellen infiziert mit dem DN STAT5A und selektioniert in FK, haben 12 Kolonien (MW) ausgebildet, die Zellen mit DN STAT5B haben nur 8 Kolonien (MW) ausgebildet. Diese Werte sind vergleichbar mit den FLT3-ITD Tumorzellen, die in MZ nachselektioniert wurden (FK: 4 Kolonien, MZ: 2 Kolonien). FLT3-ITD Tumorzellen, die mit dem Kontrollvektor infiziert wurden, bildeten 62 Kolonien (MW der Zellen, die in FK selektioniert wurden) bzw. 51 Kolonien (MW der Zellen, die in Methylzellulose selektioniert wurden) aus. Die Infektion mit dem DN STAT5 Mutanten hatte auch einen Einfluss auf die Anzahl der lebenden Zellen: in beiden Ansätzen waren ca. nur 1/10 der lebenden Zellen im Vergleich zu denen mit dem Kontrollvektor infizierten FLT3-ITD Tumorzellen vorhanden. Die Ergebnisse waren im Hinblick auf Zellen, die in Methylzellulose selektioniert wurden, insgesamt etwas niedriger im Vergleich zu den mit DN STAT5 Mutanten infizierten FLT3-ITD Tumorzellen, die in Flüssigkultur selektioniert wurden. Um den Versuch der Infektion der Tumorzellen mit DN STAT5 Mutanten mit den Inhibitionswerten der vorangegangenen Inhibitorversuche (3.4) vergleichen zu können, wurden auch hier die Werte für Inhibition, diesmal allerdings im Hinblick auf die Neo-Kontrolle, ermittelt.

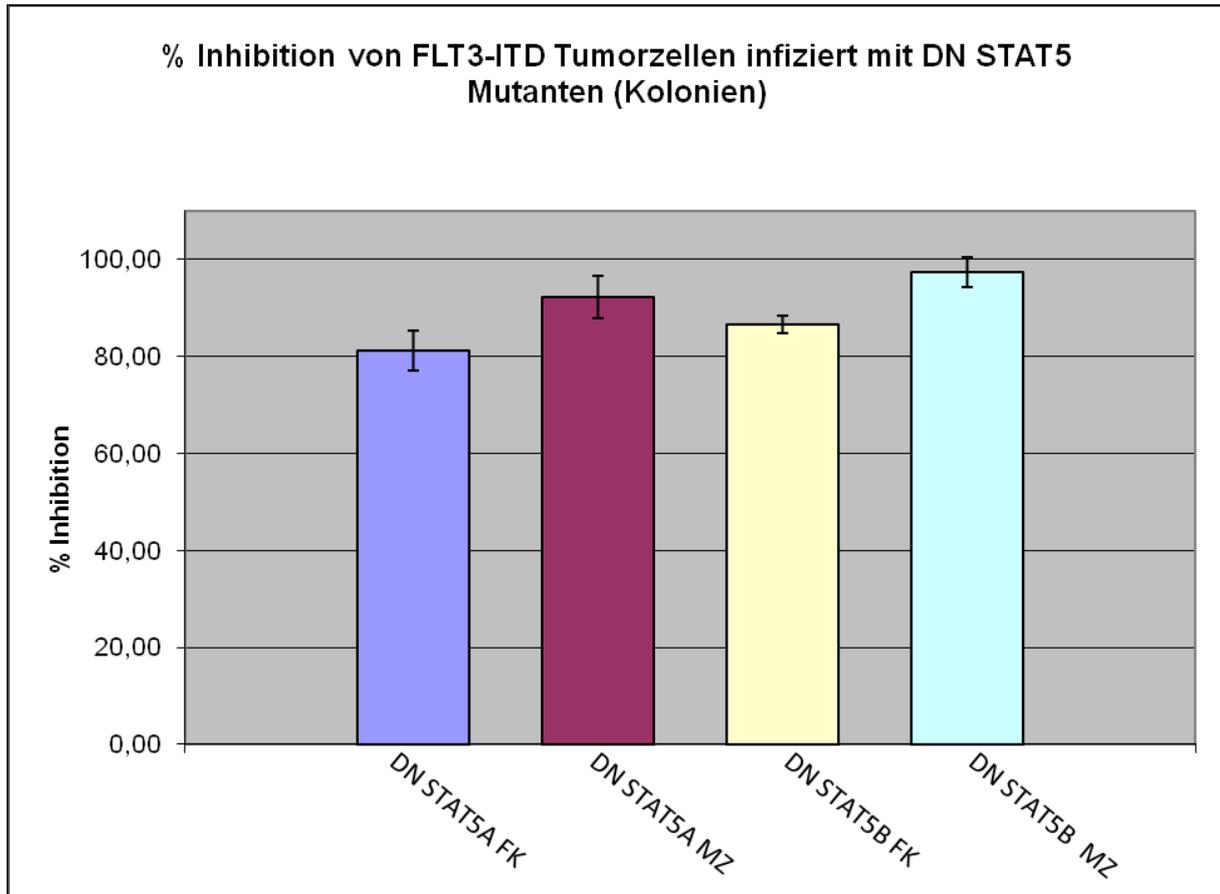


Abbildung 3.15: Inhibition von FLT3-ITD Tumorzellen, die mit dominant negativen STAT5 Mutanten infiziert wurden (Kolonien). In violett und pink sind die Werte für die Zellen, die mit DN STAT5A infiziert wurden zu sehen, in beige und hellblau sind die Werte für die Tumorzellen, die mit DN STAT5B infiziert wurden, gezeigt. Die % Inhibition liegt bei den Kolonien für DN STAT5A bei über 80% in beiden Ansätzen (FK oder MZ selektionierte Zellen), dies trifft auch auf die Tumorzellen zu, die mit DN STAT5B infiziert wurden. Dabei liegt die Inhibition bei annähernd 100% in Bezug auf Tumorzellen, die in Methylzellulose selektionierte wurden. Eine deutliche Reduktion in der Anzahl der Kolonien konnte somit im Vergleich mit den Kontrollzellen, die mit dem Neo-Vektor infiziert wurden, beobachtet werden. (FK: Flüssigkultur, MZ: Methylzellulose).

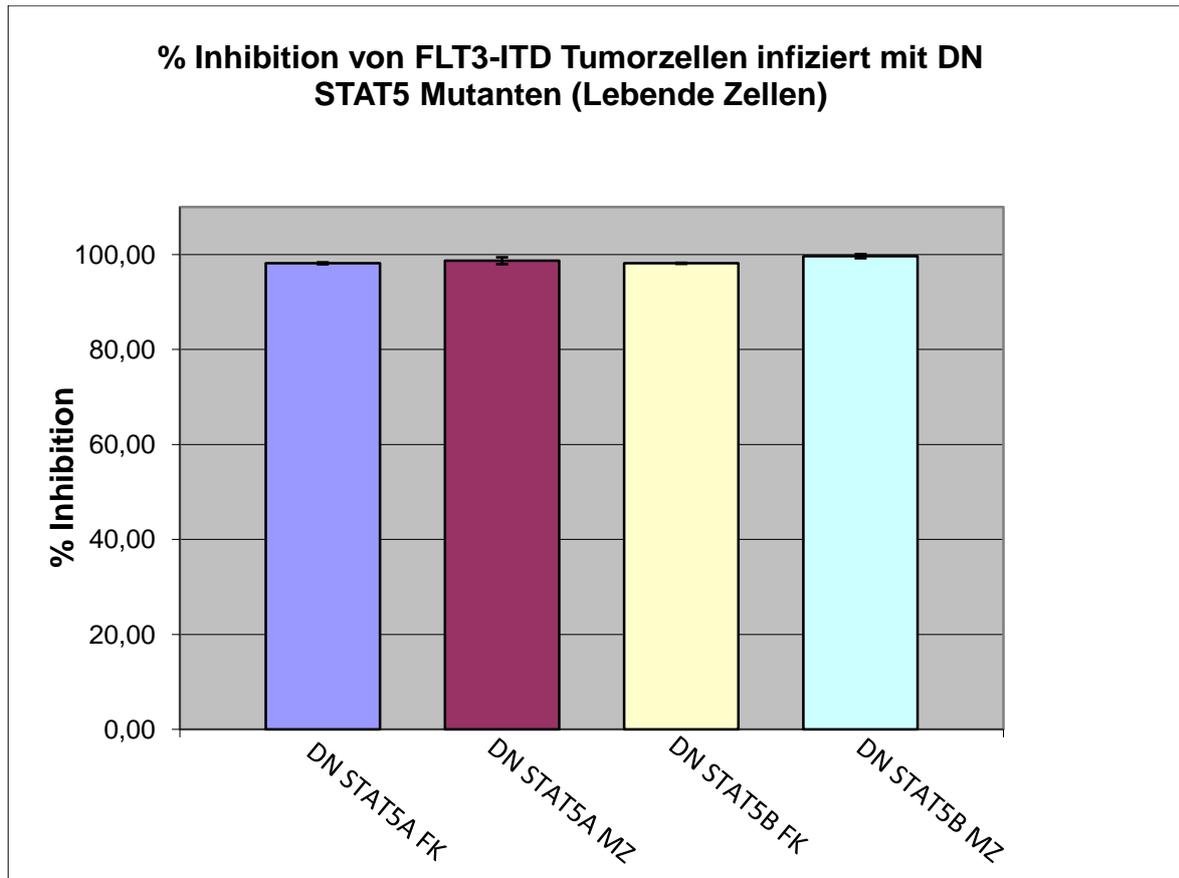


Abbildung 3.16: Inhibition von FLT3-ITD Tumorzellen, die mit dominant negativen STAT5 Mutanten infiziert wurden (lebende Zellen). In violett und pink sind die Werte für die Zellen, die mit DN STAT5A infiziert wurden zu sehen, in beige und hellblau sind die Werte für die Tumorzellen, die mit DN STAT5B infiziert wurden, gezeigt. Die % Inhibition liegt bei den lebenden Zellen für DN STAT5A bei über 98% in beiden Ansätzen (FK oder MZ selektionierte Zellen), dies trifft auch auf die Tumorzellen zu, die mit DN STAT5B infiziert wurden. Dabei liegt die Inhibition bei annähernd 100% in Bezug auf Tumorzellen, die in Methylzellulose selektionierte wurden. Es konnte eine deutliche Reduktion in der Zellzahl der mit DN STAT5 Mutanten im Vergleich mit den Kontrollzellen (mit dem Neo-Vektor infiziert) gezeigt werden. (FK: Flüssigkultur, MZ: Methylzellulose).

Anhand der beiden Abbildungen 3.15 und 3.16 ist erkennbar, dass beide dominant negativen Formen einen Einfluss sowohl auf die Koloniebildung als auch auf die Proliferation der FLT3-ITD Tumorzellen zeigten. In Hinblick auf die Anzahl der Kolonien sowie die Anzahl der lebenden Zellen zeigte die dominant negative Mutante des STAT5B einen leicht stärkeren Effekt auf den Inhibitionswert (Inhibition Kolonien: 86,6% FK, 97,3% MZ, Inhibition lebende Zellen: 98,1% FK, 99,6% MZ) als die dominant negative Form des STAT5A (Inhibition Kolonien: 81,2 % FK, 92,2 MZ; Inhibition Lebende Zellen: 98,2% FK, 98,7% MZ). Diese Werte ergeben sich daraus, dass die Anzahl der Kolonien sowie der lebenden Zellen bei den

Zellen, die mit DN STAT5B infiziert wurden, niedriger in Bezug auf die Neo-infizierten Kontrollzellen waren als die der Tumorzellen, die mit DN STAT5A infiziert wurden.

Beide DN Mutanten zeigten einen negativen Effekt auf die Proliferation und Kolonienbildung der FLT3-ITD Zellen, ungeachtet dessen Selektion in FK oder MZ, sodass davon ausgegangen werden kann, dass STAT5 ebenfalls ein wichtiger Signaltransduktionseffektor für die Signalgebung durch FLT3-ITD ist. Alle bisher untersuchten Signalwege sind wichtig für die Proliferation der FLT3-ITD Tumorzellen, was sich auch an den vergleichbaren Werten der Hemmung mit den verschiedenen Inhibitoren sowie der Anwendung der dominant negativen Mutanten zeigte.

3.5.2 Funktionalität der DN STAT5 Mutanten

Um die Funktionalität der DN STAT5 Mutanten zu überprüfen, wurde eine Western Blot Analyse stromabwärts gelegener Effektoren von STAT5 durchgeführt. Dazu wurden FLT3-ITD Zellen, die vorher in Methylzellulose mit IL7 kultiviert wurden, in Flüssigmedium überführt und mit den vorher beschriebenen retroviralen Vektoren infiziert, dann wurde auf die G418 Resistenz selektioniert. Anschließend wurde ein Teil der infizierten Zellen in Methylzellulose mit G418 und IL7 ausgesät um später die Kolonien und die lebenden Zellen zu zählen. Von den restlichen mit den dominant negativen Mutanten und Kontrollvektor infizierten Zellen wurden Proteinlysate angefertigt. In der Western Blot Analyse wurde nicht nur die Überexpression des STAT5 sowie die Phosphorylierung untersucht, sondern auch stromabwärts gelegene Effektoren, die durch STAT5 aktiviert werden, wie zum Beispiel Bcl-X_L.

Wie erwartet zeigten die FLT3-ITD Tumorzellen, die mit DN STAT5A oder DN STAT5B transduziert wurden, eine Überexpression von STAT5 im Gegensatz zur Leervektorkontrolle. Das überexprimierte DN STAT5 wurde nicht phosphoryliert (siehe Abb. 3.17). Dass in den FLT3-ITD Tumorzellen tatsächlich beide STAT5-Mutanten exprimiert wurden, sieht man eindeutig an dem Nachweis des HA-Tags für DN STAT5B und des MYC-Tags für mit DN STAT5A infizierten FLT3-ITD Zellen. Die Funktionalität der Mutanten ist an der Herunterregulation des Bcl-X_L Proteins in den FLT3-ITD Tumorzellen mit DN STAT5A oder DN STAT5B zu erkennen, welches in den G418-resistenten FLT3-ITD Tumorzellen, die mit dem Kontrollvektor infiziert wurden, nicht herunter reguliert ist.

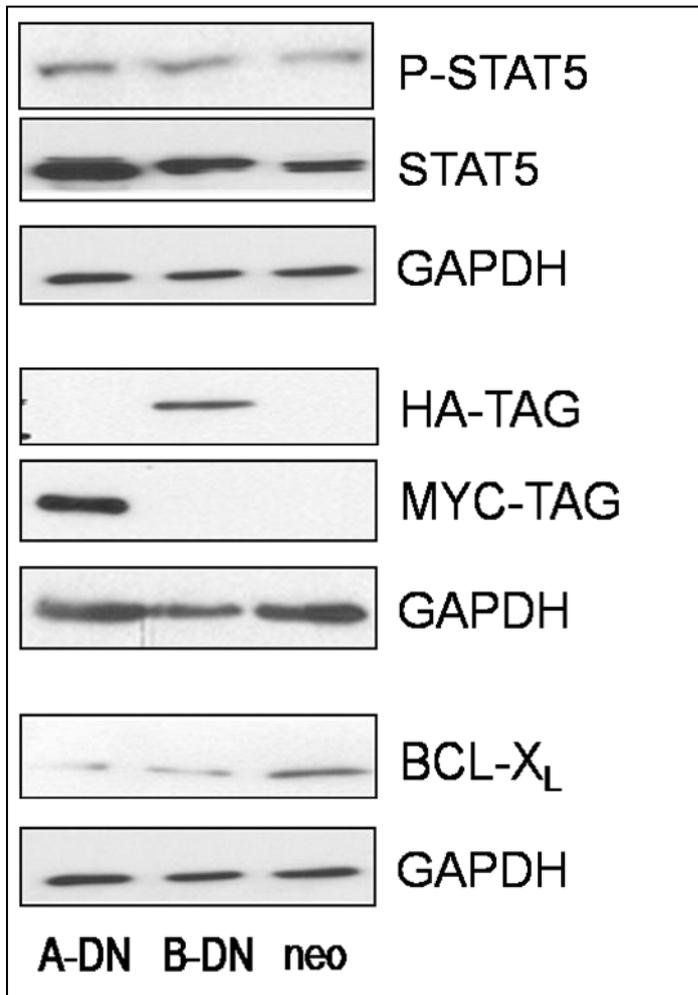


Abbildung 3.17: Western Blot Analyse der mit den dominant negativen STAT5 Mutanten und dem G418 (neo)-Leervektor infizierten FLT3-ITD Tumorzellen.

Untersuchung von STAT5/Phospho-STAT5 sowie der Nachweis des HA- bzw. MYC-Tags der beiden STAT5 Mutanten und dem stromabwärts STAT5 gelegenen Effektor BCL-XL. Es wurden zwei verschiedene Membranen verwendet; die zugehörige Ladekontrolle befindet sich direkt unter den Abbildungen der untersuchten Proteine. Es ist eine Herunterregulation von BCL-XL und somit ein hemmender Effekt der DN STAT5 Mutanten zu erkennen.

3.6 Klonalität der FLT3-ITD Tumore

Die Klärung, ob die FLT3-ITD Tumore klonal waren, spielt eine wichtige Rolle um zu charakterisieren, ob FLT3-ITD der einzige „onkogene Hit“ war, der zur Entstehung der akuten lymphatischen B-Zell Leukämie führte.

Tumore können polyklonal oder monoklonal sein: ist ein Tumor polyklonal, so gibt es keine oder wenig Selektion auf weitere genetische Mutationen und die Mehrheit der FLT3-ITD transfizierten hämatopoetischen Zellen hatte die gleiche Möglichkeit zu einem leukämischen Klon auszuwachsen. Die Leukämie würde dann mehrere Zellklone aufweisen, die jeweils verschiedene virale Integrationen besitzen. Ist ein Tumor monoklonal so bedeutet dies, dass eine Selektion auf weitere genetische Mutationen stattgefunden haben kann, die es diesem leukämischen Zellklon ermöglicht hat sich unentwegt zu vermehren und sich selbst zu

erneuern. Eine Transplantation des leukämischen Klons würde wieder eine Leukämie in den Empfängertieren auslösen und ein identisches Bandenmuster in der Southern Blot Analyse aufweisen.

Es stellte sich die Frage, ob die verschiedenen analysierten FLT3 Primärtumore klonal oder polyklonal sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden mehrere Tumore aus verschiedenen Mausexperimenten (Exp.) in der Southern Blot Analyse untersucht. Dazu wurde die genomische DNA aus FLT3-ITD Tumoren isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und auf eine Membran übertragen. Als Sonde für die Identifikation der verschiedenen Integrationsstellen in dem Mausgenom der an der B-Zell ALL erkrankter Mäuse diente ein GFP-Fragment, welches aus einem retroviralen Vektor herausgeschnitten wurde.

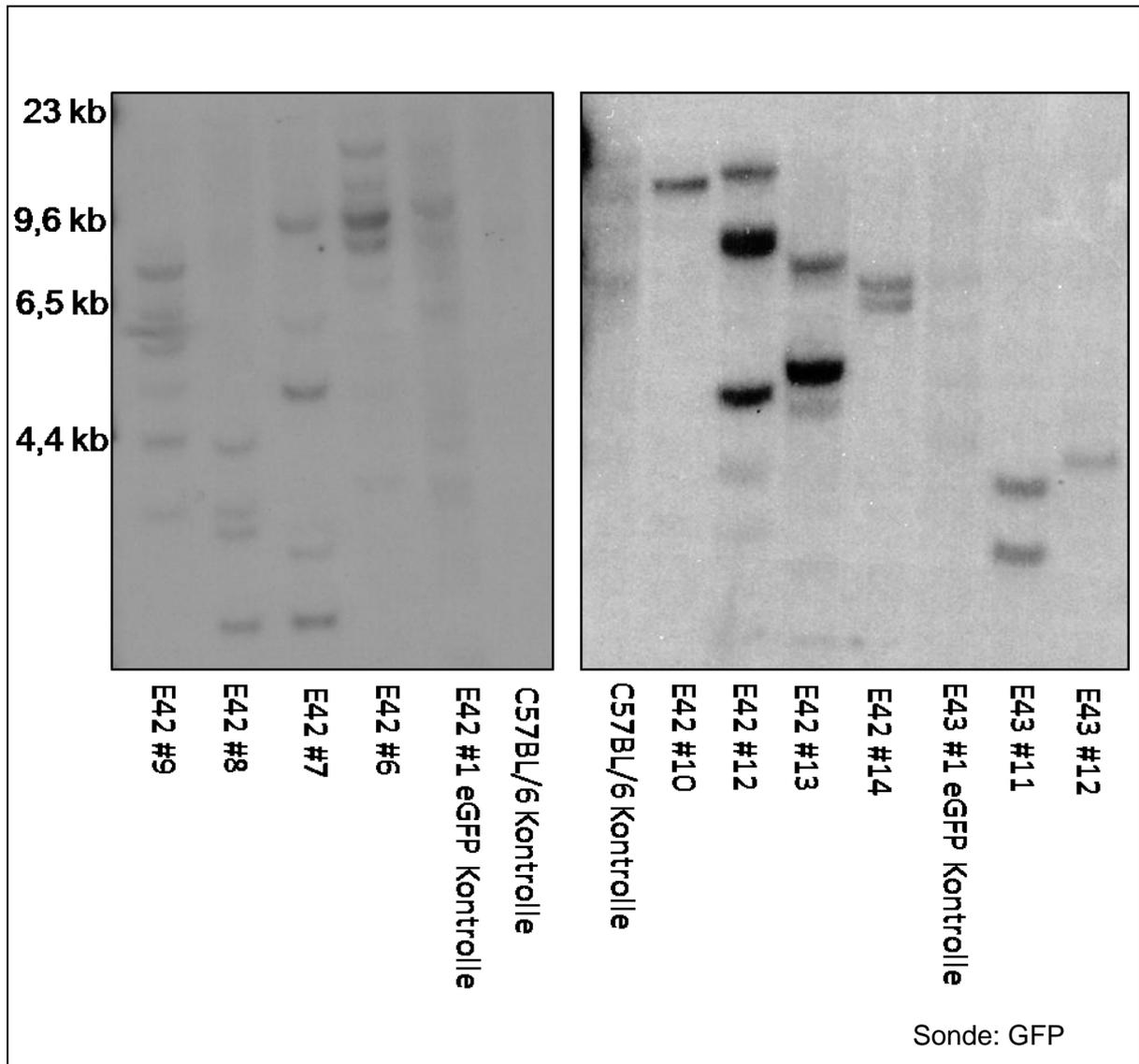


Abbildung 3.18: Southern Blot Analyse der voneinander unabhängigen FLT3-ITD Tumore. Aufgetragen sind mit EcoRI (rechter Blot) und mit BglIII (linker Blot) geschnittene genomische DNAs aus den Milzen der FLT3-ITD transduzierten Mäuse, C57BL/6 Kontroll-DNA und DNA einer Maus, die mit dem GFP-Kontrollvektor transduziertes Knochenmark erhielt. Als Sonde für den Blot wurde ein GFP-Fragment genutzt. Der Southern Blot zeigt, dass diese FLT3-ITD Tumore klonal sind und mehrere virale Integrationsstellen aufweisen.

Die verschiedenen FLT3-ITD Tumore zeigten in der Southern Blot Analyse Abb. 3.18 bis zu sechs Banden. Das bedeutet, dass die hier analysierten Tumore bis zu 6 retrovirale Integrationsstellen aufwiesen und oligoklonal waren. Die GFP Kontrolle-Milzen zeigten einen Schmier, der auf die Polyklonalität der analysierten Kontrollzellen hindeutet. Ob die FLT3-ITD Tumore sich aus mehreren Klonen mit verschiedenen viralen Integrationsstellen zusammensetzten oder aber aus einem Zellklon bestanden, der mehrere Integrationsstellen aufwies, sollte die Reimplantationen von FLT3-ITD Primärtumoren zeigen.

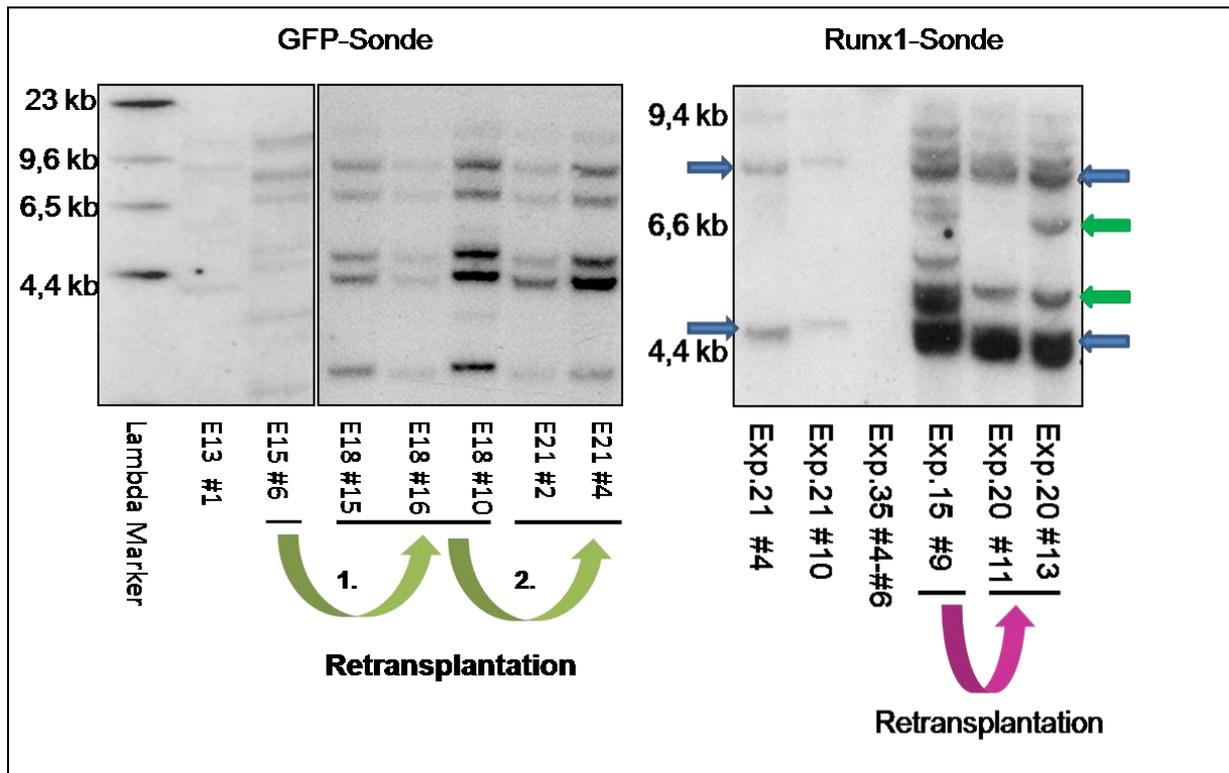


Abbildung 3.19: Klonalität der Sekundärtumore verschiedener an der B-Zell ALL erkrankten Mäuse. Der linke Southern Blot zeigt FLT3-ITD positive Knochenmarkszellen der Maus #6 aus Experiment (E) 15, die in Tiere des Experiments 18 transplantiert wurden. Tumorzellen von Maus #10 E18 wiederum wurden für die Retransplantation der Mäuse aus Experiment 21 eingesetzt. Als GFP-Kontrolltier wurde genomische DNA von Maus #1 aus Experiment 13 aufgetragen. Die Tumore sind klonal und weisen mehrere Integrationsstellen auf. Der rechte Southern Blot zeigt FLT3-ITD/Runx1 Tumore, die von Maus 9 aus Experiment 15 in die Mäuse #11 und #13 des Experiments 20 retransplantiert wurden. Die beiden ersten Spuren von links zeigen die endogenen Runx1 Banden (mit blauen Pfeilen gekennzeichnet) während die grünen Pfeile die retroviralen Integrationsstellen kennzeichnen. Die entstandenen retransplantierten Runx1/FLT3-ITD Tumore von Maus #9 aus Experiment 15 zeigen mehrere retrovirale Integrationsstelle. Die Tumore sind klonal.

Anhand der Southern Blots (Abb. 3.19) ist zu erkennen, dass die untersuchten retransplantierten FLT3-ITD Tumore mehrere virale Integrationsstellen aufwiesen, die als Banden auf der Membran klar erkennbar waren. Der ursprüngliche leukämische Klon aus Experiment 15 Maus #6 wies ein in den anderen retransplantierten Mäusen wiederkehrendes Bandenmuster auf. Dies spricht dafür, dass dieser FLT3-ITD Klon einen vielleicht durch die Integrationsstellen begünstigten Wachstumsvorteil hatte und somit in retransplantierten Tieren wieder zur Leukämie auswuchs. Um die Anzahl an viralen Integrationsstellen sowie die Klonalität von Runx1/FLT3-ITD Tumoren zu bestimmen, die kein Reporter gen exprimierten, wurde ein Runx1-Fragment als Sonde verwendet. Diese Tumore wiesen die gleiche B-Zell ALL auf wie die mit FLT3-ITD allein transplantierten Mäuse. Anhand des Southern Blots ist zu erkennen, dass der Primärtumor oligoklonal ist. Durch die

Retransplantation kamen in den beiden Empfängertieren #11 und #13 zwei verschiedene Bandenmuster zum Vorschein, was auf das Vorhandensein zweier dominanter Klone hinweist. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die untersuchten Tumore auf der Ebene der retroviralen Integration klonal waren und mehrere retrovirale Integrationsstellen aufwiesen.

3.6.1 Untersuchung der Klonalität und Rekombination auf der Ebene der schweren Kette des Prä-B-Zell Rezeptors in FLT3-ITD –Tumoren

Dass die FLT3-ITD Tumorzellen zwischen dem Pro-B und Prä-B Zellstadium in ihrer Differenzierung blockiert sind, konnte bereits deutlich durch vorangegangene FACS Analysen gezeigt werden (siehe 3.1.). Wichtig für die weitere Charakterisierung dieser Tumorzellen war es auch zu analysieren, ob in den FLT3-ITD Tumorzellen bereits somatische Rekombinationen in den Immunoglobulinen stattgefunden haben. Der funktionelle Prä-B Zell Rezeptor besteht aus zwei schweren und zwei ‚surrogate‘ leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die schwere Kette setzt sich aus vier Domänen zusammen: einer variablen Domäne (V_H), die für die Erkennung von Antigenen zuständig ist und drei konstanten Domänen (C_{H1-3}). Die V_H -Region wird von drei verschiedenen genetischen Clustern kodiert: den Variabilitätsgenen (V), den Diversitätsgenen (D) und den sogenannten ‚*joining*‘, den Verbindungsgenen (J). Mit dem Zusammenfügen eines D- und eines J-Fragments aus den entsprechenden Clustern beginnt die somatische Rekombination der schweren Kette (IgH). Erst dann erfolgt das Zusammenfügen des D-J Fragments mit einem V-Fragment. Die Rekombination (DJ) der schweren Kette der Immunoglobuline erfolgt bereits im Pro-B Zellstadium. In Prä-B Zellen ist die Rekombination bereits abgeschlossen und der Prä-B Zell Rezeptor wird auf der Oberfläche der Zellen exprimiert. In diesem Entwicklungsstadium beginnt die Rekombination der Gene für die leichte Immunoglobulinkette des BZR (*light chain*), die später die Ersatzleichte Kette ‚*surrogate light chain*‘ des Prä-B Zell Rezeptor ersetzt. Ist die Rekombination erfolgreich abgeschlossen, wird die schwere Kette mit der leichten Kette verbunden und auf der Oberfläche der unreifen und reifen B-Zellen exprimiert.

Um die Rekombination der schweren Kette (IgH) in den verschiedenen FLT3-ITD Tumoren zu untersuchen, wurden deren genomische DNAs im Southern Blot auf Rekombinationsereignisse untersucht. Die genomischen DNAs wurden zuvor mit dem Enzym EcoRI gespalten und mit der J_{H3-4} -Sonde, die spezifisch das Gencluster der murinen J-Fragmente erkennt, hybridisiert. Die hier aufgetragenen genomischen DNAs von

Sekundär- und Primärtumoren zeigte zwei unterschiedliche Ergebnisse. Auf dem linken Blot der Abb.3.20 konnte gezeigt werden, dass der Primärtumor als auch die Sekundärtumore auf der Ebene der Rekombination der schweren Kette klonal waren, was sich an dem identischen Bandenmuster in der Analyse erkennen ließ. In einer gesunden Maus (hier die GFP-Maus Experiment 13 #1) befinden sich die Immunoglobulingene in Zellen, die nicht zu der B-Zelllinie gehören, in der Keimbahnkonfiguration: es ist nur eine Bande auf dem Southern Blot zu erkennen (mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet). In den B-Zelltumoren ist nicht nur die Bande der Keimbahnkonfiguration zu erkennen, sondern zusätzlich noch zwei weitere Banden (mit grünen Pfeilen gekennzeichnet). In dem Primärtumor (E 15 Maus #6) sind die Banden nur schwach zu erkennen jedoch in den retransplantierten Mäusen (E18 und E21) kann man diese Banden erkennen, die durch die Rekombinationsereignisse in beiden Allelen des ursprünglichen leukämischen Klons zustande gekommen sind. Diese analysierten Tumore sind also nicht nur auf der Ebene der retroviralen Integration, sondern auch auf der Ebene der Rekombination der schweren Kette des Prä-B Zell Rezeptors klonal.

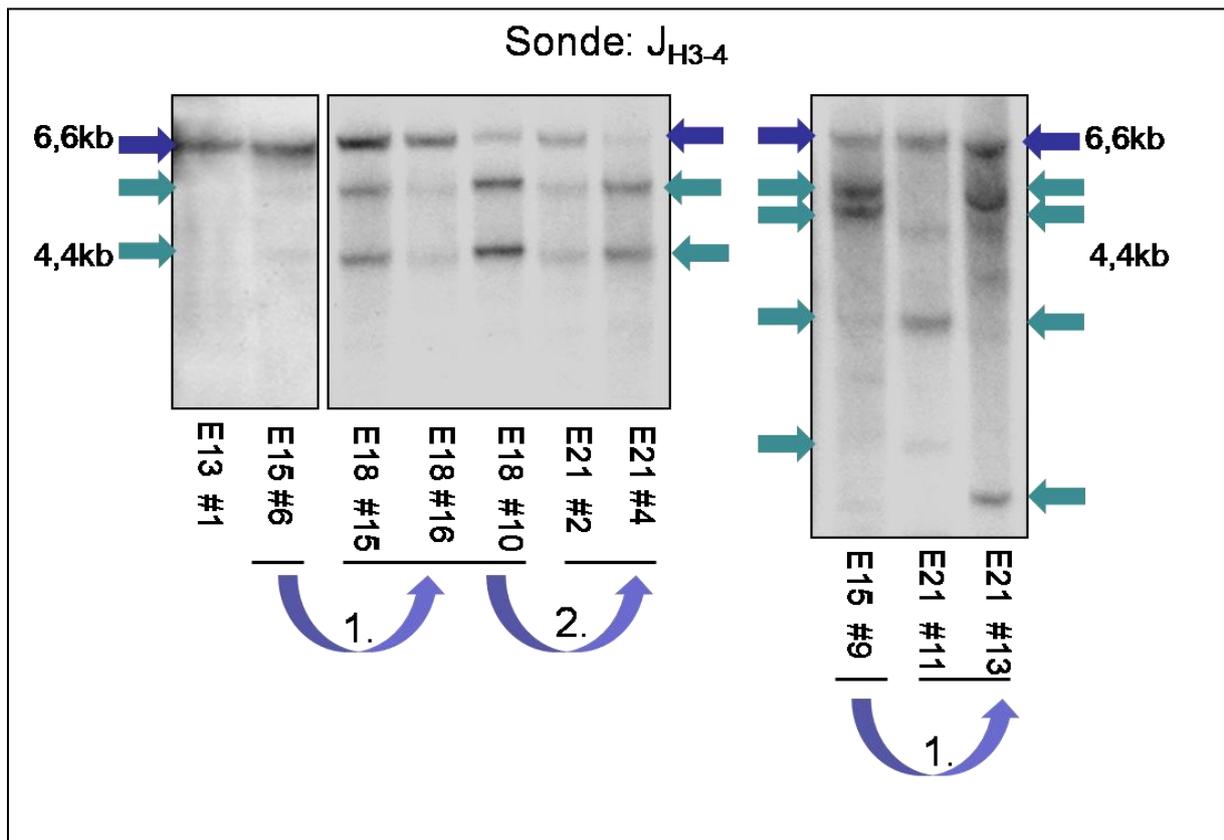


Abbildung 3.20: Somatische Rekombination der schweren Kette des Prä-B-Zell-Rezeptors. Die genomischen DNAs der FLT3-ITD Primär- und Sekundärtumore, verdaut mit dem Restriktionsenzym EcoRI, wurden mit der für das J-Fragment spezifischen Sonde JH3-4 hybridisiert. Als Kontrolle diente eine Milzprobe einer Maus, die nur den GFP-Vektor trug.

Anhand dieser Southern Blot Analyse auf der rechten Seite der Abb.3.20 ist erkennbar, dass diese Runx1/FLT3-ITD Tumore nicht klonal für die Rekombination der schweren Kette des Prä-B Zell-Rezeptors waren. Zu der Bande der Keimbahnkonfiguration (mit blauen Pfeilen gekennzeichnet) sind zusätzliche Banden und ein Schmier zu erkennen. Das Bandenmuster des Primärtumors (E15 Maus #9) stimmt nicht mit dem der retransplantierten Mäusen #11 und #13 aus Experiment 21 überein. Dass diese analysierten Tumore klonal in Bezug auf die retrovirale Integrationen waren, konnte mit der Southern Blot Analyse aus Abb. 3.19 gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Tumore auf der Ebene der IgH-Rekombination nicht klonal waren, könnte sein, dass die Rekombination des Rezeptors in den Zellen erst nach der retroviralen Integration stattfand.

3.7 Identifizierung retroviraler Integrationsstellen in FLT3-ITD Tumorzellen

Allgemein besteht die Hypothese, dass FLT3-ITD als aktiviertes Onkogen allein nicht ausreicht, um eine Leukämie auszulösen. Bei der Entstehung von Krebs bzw. Leukämien spielen mehrere Faktoren sowie genetische Veränderungen eine Rolle (Hanahan und Weinberg, 2000). Kooperierende Mutationen können durch die Integration retroviraler Vektoren zustande kommen. Die Insertion der Proviren in Gene, die für verschiedene Zellprogramme der Proliferation und Apoptose entscheidend sind, könnte hier letzten Endes in Kooperation mit der FLT3-ITD Mutation zur Entstehung einer Leukämie geführt haben. Die Chance einer kooperierenden Mutation durch retrovirale Integration, ist bei dieser hohen Anzahl an multiplen Integrationsseiten (2-5 pro Zellklon) erhöht. Um zu charakterisieren, ob durch die zufällige virale Integration in das Mausgenom ein oder mehrere Gene dysreguliert sind, wurde eine LM-PCR (*Ligation Mediated PCR*) durchgeführt. Mit dieser PCR können Provirus-flankierende DNA-Bereiche amplifiziert werden und durch die Sequenzierung dieser DNA-Fragmente können so die viralen Integrationsstellen identifiziert werden. Per Southern Blot Analyse werden die retroviralen Integrationsstellen nochmals mittels Hybridisierung des Blots mit den LM-PCR isolierten Fragmenten kontrolliert.

3.7.1 LM-PCR

Mittels der LM-PCR Analysen wurden FLT3-ITD Primär- sowie FLT3-ITD Sekundärtumore analysiert. Anhand dieser speziellen PCR (Ligation Mediated PCR) ist es möglich die verschiedenen viralen Integrationsstellen im Mausgenom festzustellen. Zuerst wird eine PCR

mit der genomischen DNA durchgeführt, die auf dem Prinzip beruht, dass die benachbarten DNA-Bereiche, ausgehend vom LTR des integrierten Provirus, amplifiziert werden. Die erhaltenen PCR-Fragmente oder aber direkt aus dem Agarosegel eluierte DNA der verschiedenen PCR-Fragmente, wurden anschließend in einen für die Sequenzierung genutzten Vektor subkloniert. Die Sequenzierung wurde durchgeführt und die Sequenzen wurden zuerst auf das Vorhandensein der retroviralen LTR Sequenz überprüft. Anschließend erfolgte der Vergleich der Sequenzen mit dem Mausgenom. Festgestellt wird, wo die retrovirale Integration zu finden ist und ob es sich bei der Integration um eine *Common Integration Site (CIS)* handelt. Eine CIS wird beschrieben als ein Genlocus, in dem zwei oder mehrere voneinander unabhängige Tumore eine provirale Integration aufwiesen (Uren et al., 2005). Bei einer großen Anzahl an Integrationsstellen, die sich auf das gesamte Genom verteilen, ist es unwahrscheinlich, dass zwei Integrationsstellen zufällig den gleichen Genlocus betreffen und in zwei voneinander unabhängigen Tumoren zu finden sind. So wird angenommen, dass die Integrationsstellen durch ihren Einfluss auf die Genexpression einen selektiven Vorteil für die betroffenen Zellen haben können und somit zur Expansion eines leukämischen Klons beitragen. Mit Hilfe der Datenbank RTCG (*retrovirus tagged cancer gene database/ Version mm9*) ist es möglich, die per LM-PCR identifizierten Gene auf die Identifikation einer CIS zu überprüfen und sich andere Integrationen in der Nähe dieser Integration anzeigen zu lassen.

3.7.2 LM-PCR von Experiment 15 Maus #6

Als erstes wurden FLT3-ITD Tumore analysiert, die von verschiedenen Retransplantationsansätzen der Maus #6 aus Experiment 15 stammten. Das Schema 3.21 erläutert die Retransplantationen sowie welche Mäuse mittels LM-PCR untersucht wurden.

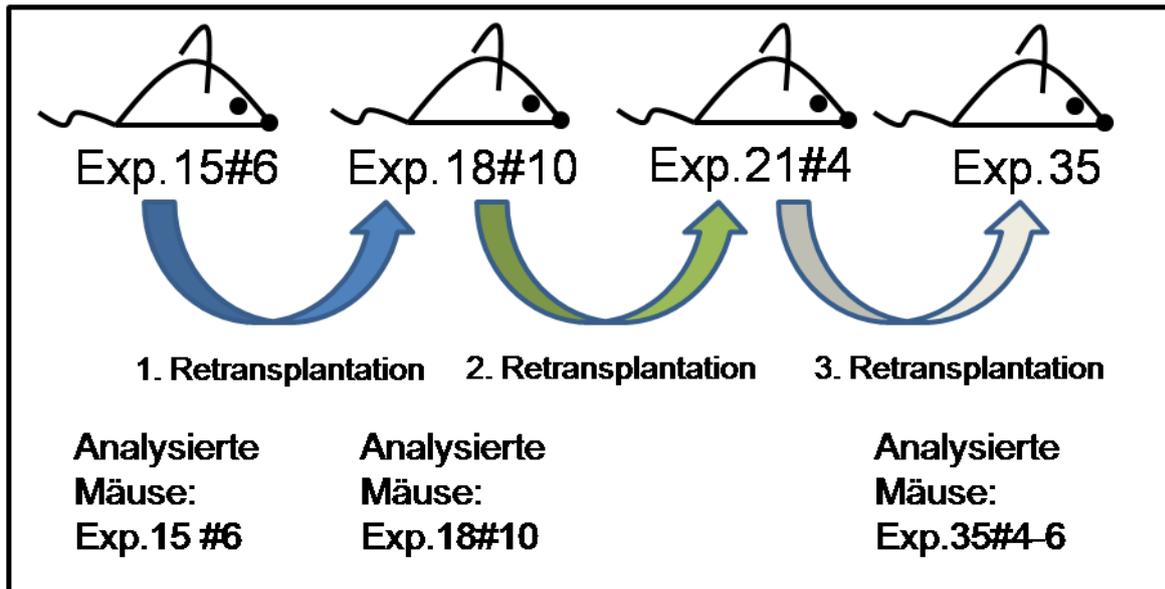


Abbildung 3.21: Übersicht der Retransplantation von FLT3-ITD Tumoren. Für die Retransplantationen wurden jeweils 1×10^5 Knochenmarkszellen (von Exp.15 #6 zu Exp.18) oder Milzzellen (Exp.18 #10 zu Exp.21 und von Exp.21 #4 zu Exp.35) genutzt.

Die Daten der LM-PCR von Maus #6 aus Experiment 15 wurden exemplarisch für die folgende Darstellung ausgewählt. Alle anderen LM-PCR-Gelbilder und Tabellen zu den verschiedenen identifizierten viralen Integrationsstellen werden im Anhang (5.1 und 5.2) gezeigt.

Zur Untersuchung der verschiedenen retroviralen Integrationen wurde genomische DNA der Maus #6 aus Experiment 15 isoliert und für die LM-PCR eingesetzt.

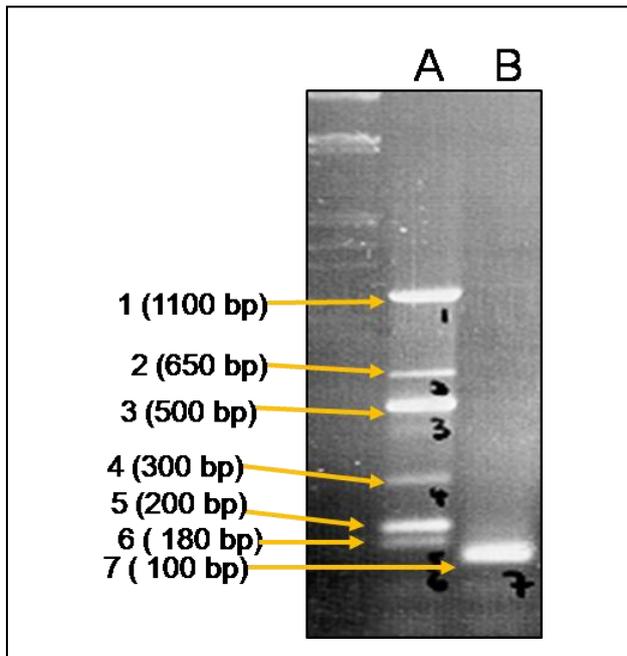


Abbildung 3.22: LM-PCR Gelbild der erhaltenen Fragmente für Maus #6 Experiment 15. Für die vorangegangene Restriktion wurden die Restriktionsenzyme A: PstI und B: Csp61 verwendet. Aus dem Gel ausgeschnitten wurden sieben verschiedene Fragmente mit unterschiedlichen Größen (durch gelbe Pfeile gekennzeichnet) und in einen Vektor für die folgende Sequenzierung subkloniert.

Die Analyse der Sequenzen ergab durch das Vergleichen mit dem Mausgenom (<http://genome.ucsc.edu>) folgende in der Tabelle 10 dargestellten Integrationsstellen: Für die Analyse wurde der UCSC genome mm9 browser (Mouse July 2007) benutzt.

Tabelle 10: Identifikation der viralen Integrationsstellen von Experiment 15 Maus #6. Gezeigt werden die in der LM-PCR erhaltenen Fragmente, deren Größe, deren Integrationsstelle im Mausgenom, die anhand von Sequenzvergleichen mit dem Mausgenom über die UCSC-Datenbank erhalten wurden sowie die Gene, in denen oder dessen Nähe sich die Integration befindet.

Fragment	Größe	Enzym	Integrationsstelle	Gene	LTR gefunden
1	1100 bp	PstI	Chr.2:167,595,070	<i>Ptpn1/Cebpb</i>	Ja
2	650 bp	PstI	Chr.1:137,182,796	<i>Timm17a</i>	Ja
3	500 bp	PstI	Chr.14:73,304,550	<i>Rcbtb2</i>	Ja
4	300 bp	PstI	Chr.1:520,687,55	<i>STAT4</i>	Ja
5	200 bp	PstI	Chr.8:125,914,781	Vektor	Ja
6	180 bp	PstI	Chr.5:118,826,788	<i>Thrap</i>	Ja
7	100 bp	Csp61	Chr.5:118,695,236	Vektor	Ja

Die Tabelle 10 zeigt, dass sieben verschiedene Fragmente unterschiedlicher Größe durch die LM-PCR amplifiziert und aus dem LM-PCR Agarosegel herausgeschnitten wurden. Die DNA wurde aus dem Gel eluiert und in einen für die Sequenzierung gebrauchten Vektor subkloniert. Unter den in der Tabelle dargestellten Integrationsseiten ist gezeigt, dass es sich bei den Sequenzen der Integrationen in STAT4, Ptpn1/Cebpb, Rcbtb2, Timm17a und Thrap um richtige Integrationen handelt während zwei Sequenzen nur Vektorkontaminationen waren. Für die weitere Analyse wurden nur die Sequenzen, bei denen es sich um eindeutige Integrationen handelte, verwendet. Bei den Integrationsstellen Rcbtb2 und Thrap stimmten allerdings nur ca. 50 bp des sequenzierten LM-PCR Fragments und der Mausgenom Sequenz überein. Unter allen identifizierten Integrationsstellen konnte nur Ptpn1/Cebpb als sogenannte „*Common Integration Site*“ (CIS) identifiziert werden. Diese Integration wird später per Southern Blot Analyse überprüft. Via LM-PCR wurde nicht nur der FLT3-ITD Tumor aus Experiment 15 Maus #6 untersucht, sondern auch andere von diesem Tumor retransplantierte Mäuse (siehe Abb.3.20). Diese Untersuchung sollte klären, ob die identischen oder aber unterschiedliche retrovirale Integrationsstellen in diesen retransplantierten Tumoren auftraten.

Die detaillierten Daten für die verschiedenen LM-PCRs der Maus #10 aus Experiment 18 und der Mäuse #4, #5 und #6 aus Experiment 35 sind im Anhang 5.1 und 5.2 abgebildet.

Tabelle 11: Zusammenfassung der per LM-PCR identifizierten retroviralen Integrationsseiten von dem FLT3-ITD Primärtumor und den retransplantierten Tumoren. Die CIS sind rot gekennzeichnet. Ein Schrägstrich kennzeichnet, dass die Integration zwischen zwei Genen liegt.

Identifizierte Integrationsstellen	Exp.15 #6	Exp.18 #10	Exp.35 #4, #5 und #6
<i>Ptpn1/Cebpb</i>	x	-	-
<i>STAT4</i>	x	-	x
<i>Thrap2</i>	x	x	x
<i>CysLTR2/Rcbtb2</i>	x	-	-
<i>Rock2/E2F6</i>	-	x	x

Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, wurden sechs verschiedene retrovirale Integrationsseiten per LM-PCR identifiziert. Allerdings wurde keine Integrationsseite gefunden, die in allen drei FLT3-ITD Tumoren vorkam. STAT4 wurde in dem Primärtumor aus Maus #6 Experiment 15 sowie in den Tumoren der dritten Retransplantation gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der LM-PCR nicht alle retroviralen Integrationen, die in

dem ursprünglichen Tumor zu finden waren auch in den retransplantierten Mäusen zu finden sind. Die Gründe dafür müssen diskutiert werden.

Tabelle 12: Detaillierte Daten der retroviralen Integrationen von Experiment 15#6, Experiment 18#10 und Experiment 35 #4, #5 und #6. In der Tabelle ist das Gen, die Position der Integration sowie die Lage relativ zum Gen und die Orientierung der Integration zu entnehmen. (STRAB: stromabwärts, STRA: stromaufwärts).

Chromosom/ Position der Integration (bp)	Gen	Relative Lage zum Gen	Orientierung des Provirus relativ zum Transkript
1/520,68,755	<i>STAT4</i>	3667 bp Intron1, STRAB des Transkriptionsstarts	Inverse Orientierung
12/16,877,147	<i>Rock2/ E2F6</i>	24637 bp STRA des Transkriptionsstarts von <i>Rock2</i>	Gleiche Orientierung
		59376 bp STRAB des Transkriptionsendes von <i>E2F6</i>	Gleiche Orientierung
5/118,826,788	<i>Thrap</i>	183940 bp STRA des Gens	Inverse Orientierung
2/16,763,958	<i>Ptpn1/ Cebpb</i>	126869 bp STRA des Transkriptionsstarts	Gleiche Orientierung
		315040 bp STRAB des Transkriptionsendes	Gleiche Orientierung

Vorerst werden die retroviralen Integrationsstellen für *Ptpn1/Cebpb* und für *STAT4*, die per UCSC BLAT Sequenzvergleich und anschließend mittels der RCGG Datenbank auf eine ‚common integration site‘ überprüft wurden, als Sequenzanalyse gezeigt. Bei den bereits identifizierten 23 Integrationen, die in der Nähe der gefundenen Integration bei *Ptpn1/Cebpb* liegen, handelt es sich bei den Ausgangstumoren laut Datenbank um B-Zell, T-Zell sowie myeloide Tumore und Lymphoma. Bei *Ptpn1* („protein tyrosine phosphatase non-receptor type1“) handelt es sich um eine Tyrosin-Phosphatase. Diese Phosphatase spielt unter anderem eine Rolle im Kalzium-Influx von Zellen (Schulz et al. 2003): Analysen in der HEK-

Zelllinie zeigten, dass die Transfektion von HEK-Zellen mit dem humanen Ptpn1 zu einer Inhibition des Kalzium Influx führte. Der Influx ist unter anderem durch die Tyrosin-Phosphorylierung und Dephosphorylierung mittels Ptpn1 reguliert. Bei C/ebpb (,CAAT/enhancer binding protein beta') handelt es sich um ein Protein der bZIP Familie, das in die Interleukin 6 Signaltransduktion eingebunden ist. Es ist in der Lage als Dimer an DNA zu binden. C/ebpb kann auch Komplexe mit C/ebp alpha und gamma bilden. In der Abb. 3.22 ist die identifizierte Integration im Zusammenhang mit beiden Genen *Ptpn1* und *Cebpb* gezeigt.

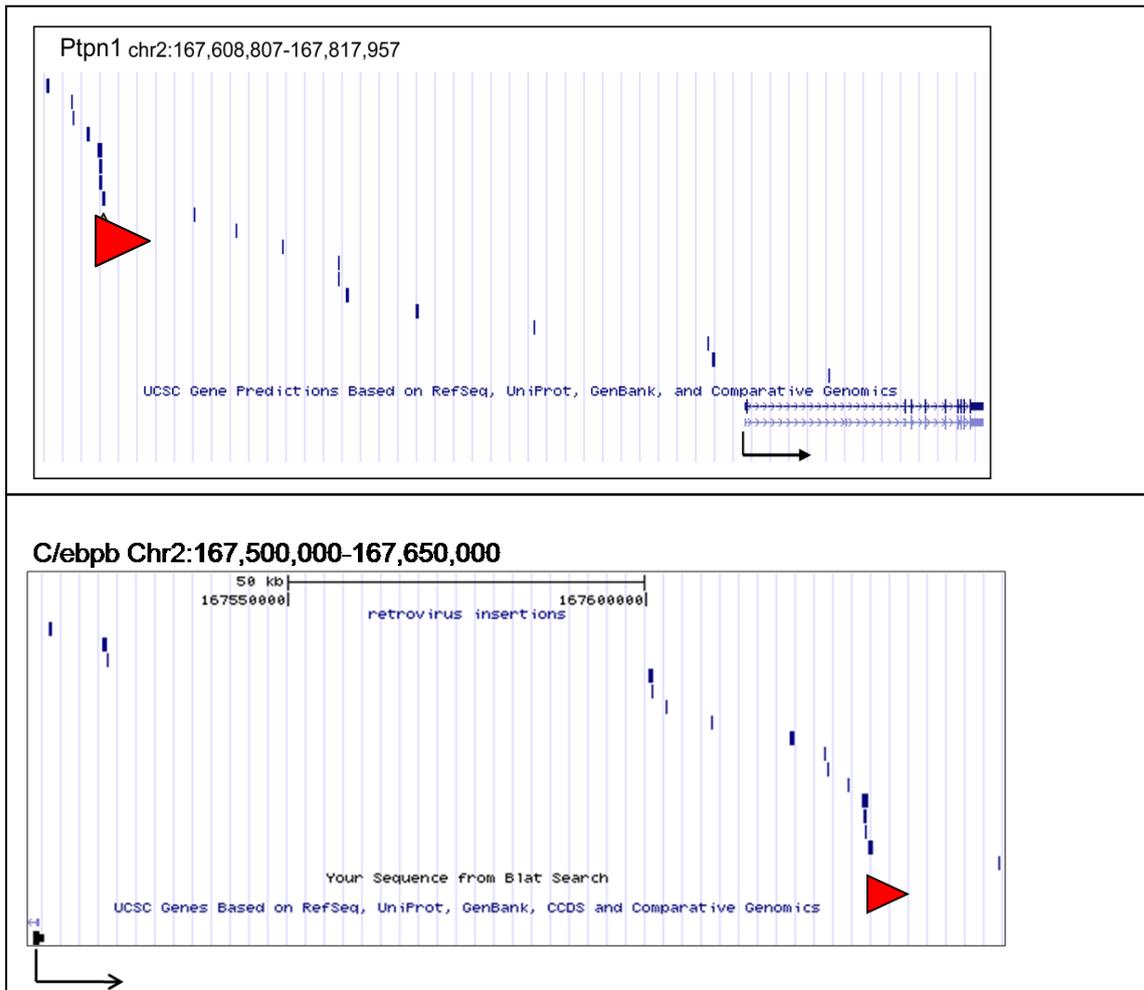


Abbildung 3.23: Identifizierte Integration in der Nähe des *Ptpn1* Gens und des *C/ebpb* Gens. Die obere Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Chromosoms zwei zwischen 167,608,807 bp und 167,817,957 bp. Durch blaue Striche sind die Integrationen markiert, die von anderen Arbeitsgruppen identifiziert wurden und als rotes Dreieck ist die über die LM-PCR identifizierte Integration sowie die Orientierung in dem FLT3-ITD Tumor aus Experiment 15 Maus #6 dargestellt. Der Pfeil unter dem Gen *Ptpn1* zeigt die Transkriptionsrichtung. Die untere Abbildung zeigt einen Abschnitt des Chromosoms 2 an der Position 167,500,000 bp und 167,650,000 bp. Die identifizierte Integration und die Orientierung ist als rotes Dreieck dargestellt und befindet sich an der identischen Position wie in der oberen Abbildung. Die Transkriptionsrichtung von *C/ebp beta* ist als schwarzer Pfeil dargestellt. Die bereits von anderen Arbeitsgruppen identifizierte CIS sind mit blauen Strichen dargestellt.

Anhand der Sequenzanalyse mittels der RCTG Datenbank konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Integration um eine ‚*common integration site*‘ handelt und dass sich die Integration in einer Region befindet, in der gehäuft virale Integrationen (in der Abbildung mit blauen Strichen gekennzeichnet) gefunden werden. Die Integration des Provirus, welche in der Abb.3.23 mit einem roten Dreieck gekennzeichnet ist, liegt in der gleichen Orientierung wie das *Ptpn1* als auch das *Cebpb* Transkript und liegt stromaufwärts von *Ptpn1* und stromabwärts von *Cebpb*. (siehe Tabelle 12). Welche Auswirkung die Integration in dieser

Region auf die Expression beider Gene in den FLT3-ITD Tumoren hat, wird später per RT-PCR analysiert.

Auch im *STAT4* Gen wurde eine Integration per LM-PCR ermittelt; auch hier erfolgte ein Abgleich der Sequenz mit dem Mausgenom mittels der UCSC-Datenbank. *STAT4* ist normalerweise nicht mit B-Zellen assoziiert, sondern ein wichtiger stromabwärts Effektor im Interleukin 12 (IL12) abhängigen Signalweg in der Entwicklung von T1-Helferzellen. Dabei sekretieren Makrophagen und dendritische Zellen IL12, welches am Interleukin-Rezeptor bindet. Durch die Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert die Janus Kinase 2 (JAK2) den Rezeptor sowie *STAT4*. Aktiviert werden auch MKK6 und p38, die *STAT4* am Serinrest 721 phosphorylieren und so zur vollen transkriptionellen Aktivierung des Gens beitragen.

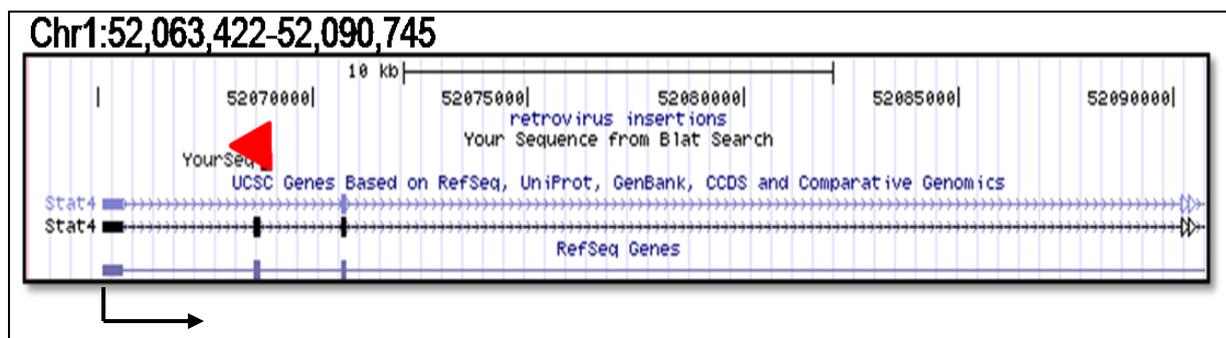


Abbildung 3.24: Identifizierte Integration in *STAT4* ermittelt via LM-PCR von Maus #6 aus Experiment 15. Die Integration liegt im Intron Nr.1 (Chr.1:520,687,55) in der entgegengesetzten Richtung des *STAT4* Transkripts. Das rote Dreieck kennzeichnet die Orientierung des Provirus und der schwarze Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Transkripts.

Wie per Sequenzvergleich gesehen werden konnte, handelt es sich bei dieser Integration in *STAT4* um keine CIS. Die Integration befand sich in Intron 1 in der entgegengesetzten Orientierung des *STAT4* Transkripts. Wie sich die Integration auf die Expression von *STAT4* auswirkte, wird später mittels quantitativer PCR dargestellt. Zunächst aber erfolgte die Überprüfung der verschiedenen retroviralen Integrationen per Southern Blot Analyse, um die identifizierte Integration nachzuweisen und um zu prüfen, ob es sich vielleicht fälschlicherweise um eine per LM-PCR identifizierte Integration eines endogenen Retrovirus, einer Integration, die nur in einer kleinen Subpopulation der Tumorzellen vorhanden war oder aber einer unspezifischen Bindung der in der PCR verwendeten Primer handeln könnte.

3.7.3 Überprüfung der Integrationsseiten per Southern Blot Analyse

Für die verschiedenen Southern Blot Analysen wurden die genomischen DNAs verschiedener FLT3-ITD Milzen mit Restriktionsenzymen verdaut und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Durch die Gelelektrophorese wurde die fragmentierte genomische DNA der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membranen wurden später mit P^{32} -markierten Sonden hybridisiert, wobei es sich um die per LM-PCR identifizierten Fragmente handelt.

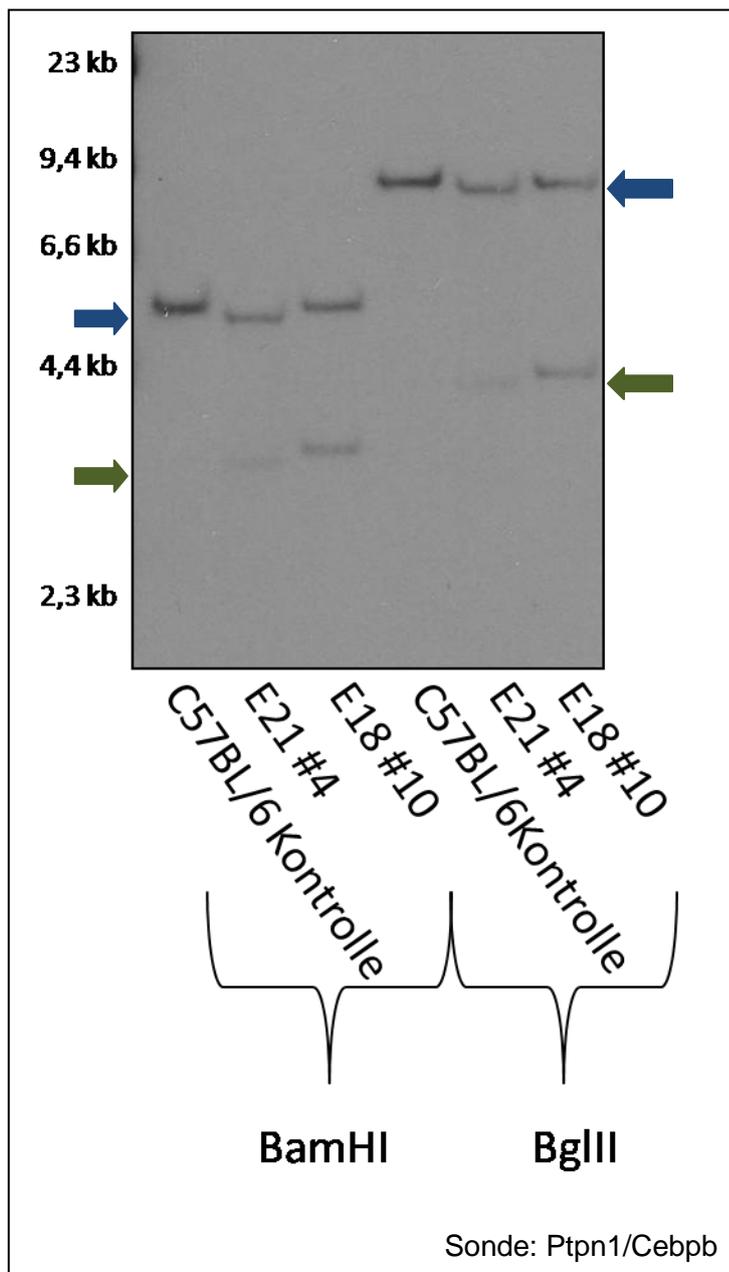


Abbildung 3.25: Southern Blot Analyse der Ptpn1/Cebpb-Integration.

Die genomischen DNAs der C57BL/6 Kontroll-Milz sowie der FLT3-ITD Tumore aus Experiment 21 #4 und Experiment 18 #10 wurden mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten (links: BamHI und rechts BgIII) und mit der Ptpn1/Cebpb-Sonde hybridisiert. Die Integration war per Southern Blot in den FLT3-ITD Tumoren eindeutig nachzuweisen. Die blauen Pfeile kennzeichnen die endogenen Ptpn1 Allele, während die grünen Pfeile die durch die Integration veränderten Allele kennzeichnen.

Anhand des Blots konnte die per LM-PCR identifizierte *Ptpn1/Cebpb* Integration in zwei aus Experiment 15 Maus #6 retransplantierten Sekundärtumoren nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.25). In der Kontrollmilz aus einer C57BL/6 Maus konnte nur eine endogene Bande nachgewiesen werden, während durch die retrovirale Integration die Zerstörung des anderen Allels in den Sekundärtumoren durch das Vorhandensein einer weiteren Bande (mit einem grünen Pfeil in Abb.3.24 gekennzeichnet) sichtbar war. Per LM-PCR konnte die *Ptpn1/Cebpb*-Integration nur in dem Primärtumor der Maus #6 aus Experiment 15 nachgewiesen werden. Somit ist ein Nachteil der LM-PCR Methode sichtbar geworden. Durch die LM-PCR Analyse wurden nicht alle retroviralen Integrationen identifiziert, sonst wäre die *Ptpn1/Cebpb*-Integration auch in den Sekundärtumoren nachweisbar gewesen. Es steht dennoch außer Frage, dass es sich bei der *Ptpn1* Integration um eine echte retrovirale Integration handelte.

Die Integration in STAT4 wurde auch per Southern Blot in FLT3-ITD Sekundärtumoren überprüft (siehe Abb. 3.26).

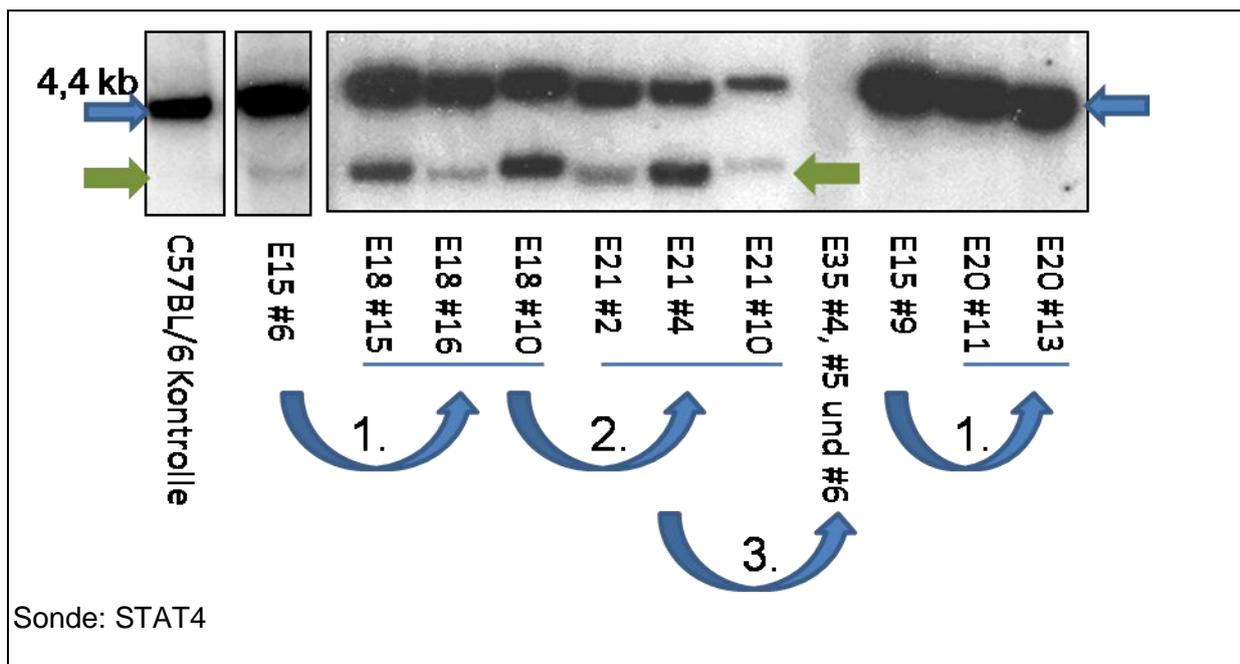


Abbildung 3.26: Nachweis der retroviralen Integrationsseite STAT4. Die verschiedenen genomischen DNAs von FLT3-ITD Primär- und Sekundärtumoren (Retransplantationen 1 bis 3 sind durch gebogene blaue Pfeile und die Ziffern 1 bis 3 gekennzeichnet.) wurden mit dem Enzym EcoRI gespalten und per Southern Blot Analyse auf die STAT4 Integration untersucht. Die Integration von STAT4 ist in allen Sekundärtumoren nachweisbar. Die Ausnahme bilden die drei Tumore aus Experiment 15 #9 und aus Experiment 20.

Anhand des Southern Blots konnte die STAT4 Integration in allen analysierten Sekundärtumoren aus den Experimenten 18 und 21 sowie in dem FLT3-ITD Primärtumor aus Maus #6 Experiment 15, nachgewiesen werden. Der leukämische Klon, der aus

Maus #6 aus Experiment 15 retransplantiert wurde und klonal war (siehe 3.6), zeigte in allen analysierten Sekundärtumoren auch eine STAT4 Integration. Allerdings sind die Intensitäten der beiden Banden, (endogene und durch die retrovirale Integration entstandene Bande) nicht in allen Tumoren gleich stark wie z.B. bei Maus #4 aus Experiment 21. Dies könnte damit zusammenhängen, dass für die Analyse Tumore genutzt wurden, die nicht 100% GFP-positiv waren und somit dementsprechend noch ein Teil an normalem Milzgewebe vorhanden war, der die Intensität der endogenen Bande begünstigte. In den Runx-1/FLT3-ITD Tumoren aus Experiment 15 und 21 war keine retrovirale Integration von STAT4 nachweisbar. Damit wurde gezeigt, dass es sich auch bei der STAT4-Integration um eine echte Integration handelte, die in allen aus Maus #6 des Experiments 15 retransplantierten FLT3-ITD Sekundärtumoren mittels Southern Blot Analyse jedoch nicht mittels LM-PCR in allen Tumoren nachweisbar war.

3.7.4 Analyse der mRNA Expression von *Ptpn1/Cebpb* und *STAT4* in FLT3-ITD Tumoren

Die Insertion eines Retrovirus in das Genom kann verschiedene Folgen für die Gene oder aber Promotorregionen, in die der Provirus für die Expression der Gene integriert, haben. Um den Effekt der retroviralen Insertion in den FLT3-ITD Tumoren für die Gene *STAT4* und *Ptpn1/Cebpb* zu studieren, wurde aus verschiedenen FLT3-ITD Tumoren RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend für eine PCR eingesetzt.

Für die quantitative PCR (realtime-PCR) in der die mRNA Expression von *STAT4* analysiert werden sollte, wurden als Kontrollen cDNAs, die aus C57BL/6 Mäusen sortierten Pro-B Zellen (B220/CD43 positiv und IgM negativ) sowie Prä-B Zellen (B220 positiv, CD43 und IgM negativ) gewonnen wurden, genutzt. Als Probe für myeloide Zellen diente die Zelllinie FDCP.1 und als Standard wurde ein B-Zell Tumor genutzt, der sich in der Differenzierung weiter als das Prä-B Zellstadium befand und somit positiv für den Oberflächenmarker IgM war. Als Proben für FLT3-ITD Tumoren wurden cDNAs von Knochenmark und Milz retransplantiertter Mäuse eingesetzt.

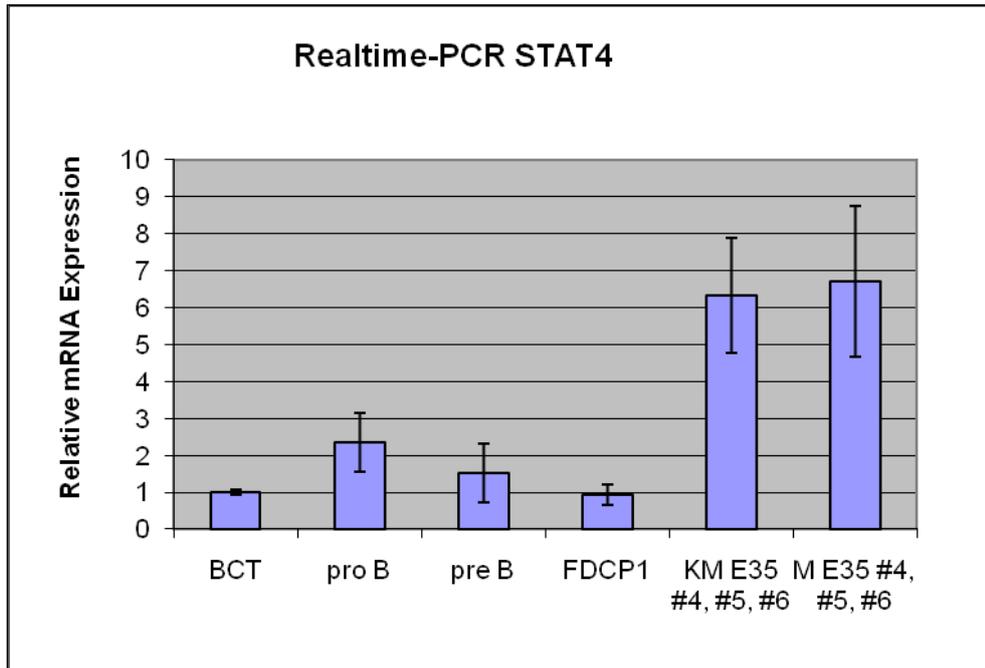


Abbildung 3.27: Realtime PCR Ergebnisse für die relative mRNA Expression von *STAT4*. Untersucht wurden drei retransplantierte FLT3-ITD Mäuse aus Experiment 35, die eine *STAT4* Integration aufwiesen (siehe Southern Blot Analyse XXX) im Vergleich zu sortierten Pro-B Zellen (B220/CD43 positiv, IgM negativ), Prä-B-Zellen (B220 positiv, negativ für IgM und CD43) einer myeloiden Zelllinie FDCP.1 und einem IgM positiven B-Zelltumor (BCT). Die relative mRNA Expression von *STAT4* ist im Knochenmark (KM) und in der Milz (M) der FLT3-ITD Tumore mit der Integration 6- bis 7-fach in Bezug auf die Kontrollen erhöht. Die PCR Ergebnisse der Ladekontrolle HPRT sind bereits auf die Werte der *STAT4* Expression abgeglichen.

Wie in Abb. 3.27 zu sehen ist, ist die relative mRNA Expression für *STAT4* in den Tumorzellen aus den Mäusen #4 bis #6 des Experiments 35 6- bis 7-fache erhöht. Als Standard (1) wurde der IgM positive B-Zelltumor (BCT) ausgewählt. Die Expression von *STAT4* ist in den myeloiden FDCP.1 Zellen im Vergleich dazu fast identisch. Die *STAT4* Expressionslevel liegen in Prä-B Zellen bei einem Wert von 1,5 und bei den Pro-B Zellen bei ca. 2,2 in Bezug auf die BCT Kontrolle. Die Insertion in *STAT4* hatte zur Folge, dass die Expression von *STAT4* in Milz- und Knochenmark Tumorzellen aus Experiment 35 auf ein 6- bzw. 7-fachen Wert der Kontrolle erhöht wurde.

Für die RT-PCR zur Analyse der relativen mRNA-Expression von *Ptpn1* und *Cebpb* wurden verschiedene cDNAs von retransplantierten FLT3-ITD Tumoren aus Experiment 18 und 21, untersucht. Zugleich wurde von den identischen Proben eine Aktin-PCR angefertigt, um eine cDNA Ladekontrolle zu haben. Wie anhand der Grafik 3.27 zu erkennen ist, wird *Ptpn1* in allen analysierten retransplantierten FLT3-ITD-Tumoren mehr oder weniger stark exprimiert. In blau sind in der Abbildung diejenigen Proben gekennzeichnet, in denen per Southern Blot

Analyse bereits die Integration zwischen *Ptpn1* und *Cebpb* nachgewiesen wurde. Anhand der PCR-Ergebnisse für *Cebpb* ist klar zu erkennen, dass in den Tumoren mit der identifizierten Integration so gut wie kein Transkript im Gegensatz zur C57BL/6 Kontrolle gebildet wurde. Die Integration scheint eine Herunterregulation der *Cebpb*-Expression bewirkt zu haben. Es ist festzuhalten, dass *Ptpn1* in den FLT3-ITD Tumoren, die die Integration zwischen den beiden Genen *Ptpn1* und *Cebpb* aufwiesen, exprimiert wird. *C/ebpb* dagegen wird kaum oder in nicht detektierbaren Mengen in den Tumoren exprimiert.

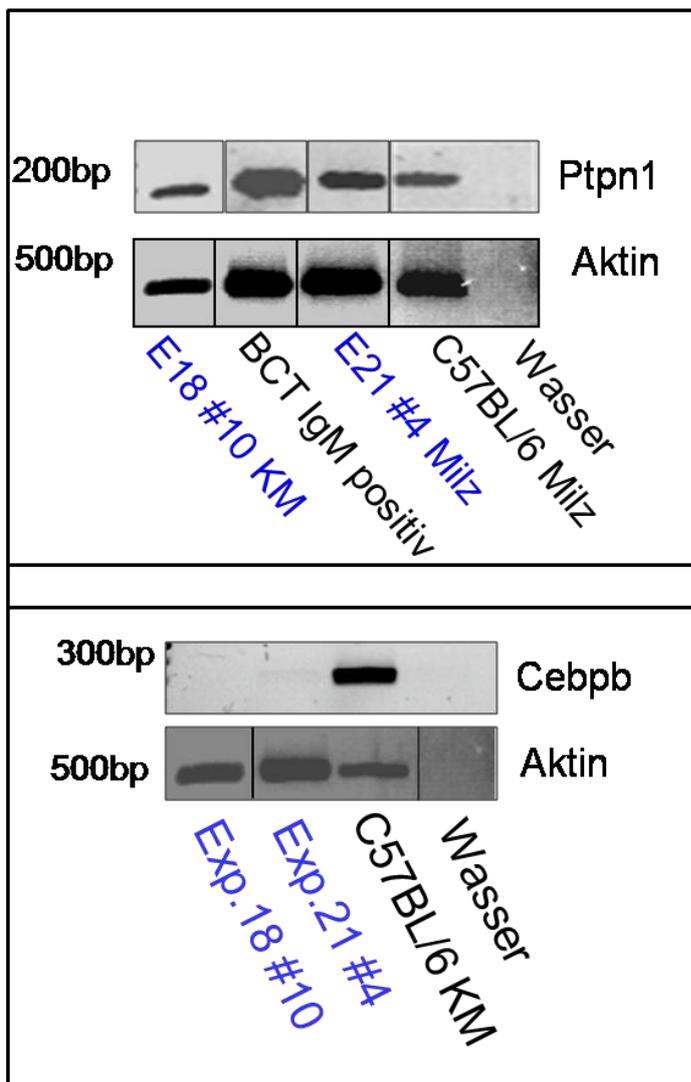


Abbildung 3.28: Gelbild der *Ptpn1* und der *Cebpb*-RT-PCR von verschiedenen Sekundärtumoren.

Die Expression von *Ptpn1* wurde per PCR mit verschiedenen FLT3-ITD retransplantierten Proben untersucht. Das PCR Produkt, welches gebildet wurde, war für *Ptpn1* 173 bp groß, für die Ladekontrolle Aktin war das PCR-Produkt 493 bp groß. In blau gekennzeichnet sind die Tumore, in denen per Southern Blot Analyse bereits eine retrovirale Integration festgestellt wurde. *Ptpn1* wird in allen analysierten Tumoren mehr oder weniger stark exprimiert. Die Expression von *Cebpb* wurde auch per PCR mit verschiedenen FLT3-ITD retransplantierten Proben untersucht. Die blau gekennzeichneten Proben zeigten in der Southern Blot Analyse eine Integration. *C/ebpb* wird in den Tumoren kaum exprimiert

3.7.5 LM-PCR von Experiment 21 Maus #11 und #13

Um weitere FLT3-ITD Tumore auf ihre retroviralen Integrationsseiten zu analysieren, wurden zwei Sekundärtumore, die aus der FLT3-ITD/Runx1 positiven Maus 9 des Experiments 15

retransplantiert wurden, ausgewählt (siehe Abb. 3.29) Mittels dieser LM-PCR sollte auch untersucht werden, ob diese Tumore, die die gleiche CD43/B220 positive Zellpopulation wie die Tumore, die nur mit FLT3-ITD allein aufgetreten sind, gleiche Integrationsstellen aufwiesen. Für die LM-PCR wurde die genomische DNA aus dem Milzgewebe isoliert und für die PCR sowie die folgenden Southern Blot Analysen eingesetzt.

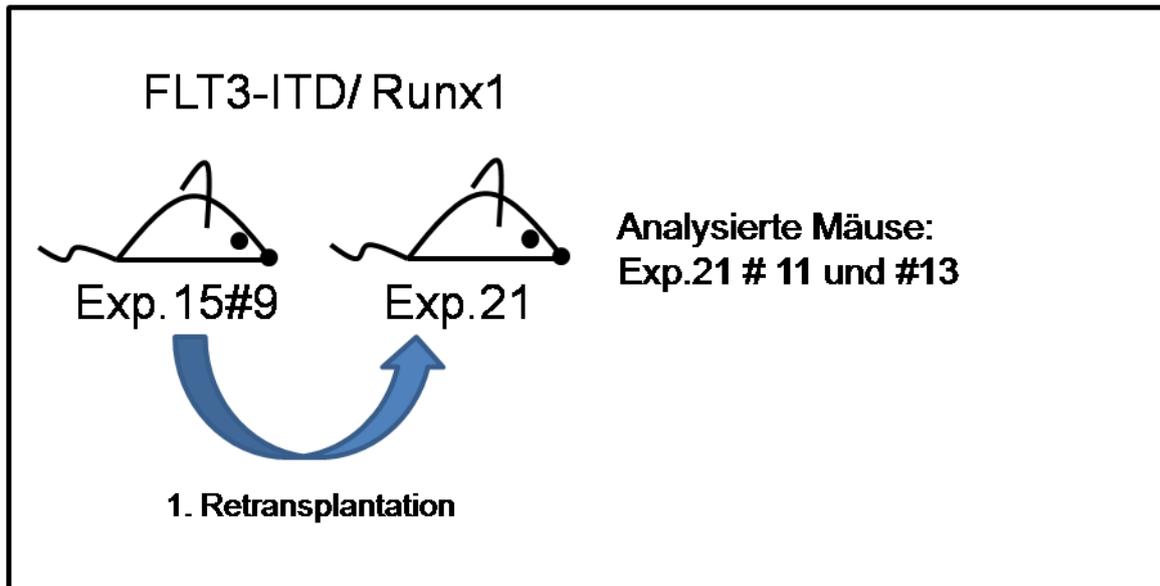


Abbildung 3.29: Retransplantationsschema von FLT3-ITD/Runx1 Mäusen. Es wurden 1×10^5 Knochenmarkszellen aus der Maus #9 des Experiments 15 in sublethal bestrahlte C57BL/6 Empfängertiere retransplantiert. Für die LM-PCR der später an der B-Zell ALL erkrankter Mäuse diente aus Milzgewebe isolierte genomische DNA.

Tabelle 13: Durch LM-PCR identifizierte Integrationsstellen in den Runx1/FLT3-ITD Mäusen Nummer 11 und 13 aus Experiment 21. Gezeigt werden die identifizierten Integrationsstellen aus den zwei verschiedenen Runx1/FLT3-ITD Mäusen und ob in den verschiedenen Sequenzen die retrovirale LTR-Sequenz wiedergefunden wurde. Die CIS sind rot gekennzeichnet.

Identifizierte Integrationsstellen	Exp.21 #11	Exp.21 #13	LTR gefunden
Mrvi1	x	x	Ja
Ahi1	x	-	Ja
Tex9	x	x	Ja
Pag1	x	-	Ja
Wwox	-	x	Ja

Tabelle 14: Detaillierte Daten der retroviralen Integrationen von Experiment 21#11 und 21#13. In der Tabelle ist das Gen, die Position sowie die Lage der Integration relativ zum Gen und die Orientierung der Integration zu entnehmen. (STRAB: stromabwärts, STRA: stromaufwärts).

Chromosom/ Position der Integration (bp)	Gen	Relative Lage zum Gen	Orientierung des Provirus relativ zum Transkript
10/208,033,36	Ahi1	3172 bp STRAB des Transkriptionsendes	Inverse Orientierung
7/118,097,851	Mrvi1	8150 bp STRA des Transkriptionsstarts im ersten Intron	Inverse Orientierung
3/98,329,36	Pag	694 bp STRAB des Transkriptionsstarts, im ersten Exon	Gleiche Orientierung
9/723,145,90	Tex9	25173 bp STRAB des Transkriptionsstarts im 9. Intron	Gleiche Orientierung
8/117757,936	Wwox	794340 bp STRAB des Transkriptionsstarts im letzten Intron	Gleiche Orientierung

Anhand der Zusammenfassung ist erkenntlich, dass sich unter den identifizierten retroviralen Integrationsstellen zwei verschiedene CIS befanden. Im Folgenden sollte die Integration in dem *Mrvi1* Gen weiter untersucht werden.

Nach der Überprüfung des sequenzierten LM-PCR Fragments auf die retrovirale LTR-Sequenz, wurde die Sequenz mit der RCG Datenbank verglichen. Es ist ersichtlich, dass es sich auch bei *Mrvi1* um eine CIS handelt. *Mrvi1*, welches als Synonym auch IRAG genannt wird, wurde zuerst als ein putatives Tumorsuppressorgen identifiziert, welches häufig durch das *Mouse-AIDS-related virus* (MRV) zerstört ist (Shaughnessy JD Jr. Et al., 1999). Von dem Protein existieren mehrere Isoformen. Weiterhin interessant ist, dass *Mrvi1* auch in den Kalzium-Signalweg involviert ist. Das Protein ist in der Lage den IP3-Rezeptor zu binden und so den Kalziumfluss zu inhibieren.

Die Sequenzanalyse in Abb. 3.30 zeigt, dass *Mrv1* eine *common integration site* ist, zwei weitere Integrationen, die von anderen Arbeitsgruppen gefunden wurden, liegen stromabwärts der in den Runx1/FLT3-ITD Tumoren identifizierten Integrationen. Die Integration des Provirus ist in der entgegengesetzten Richtung der zwei abgebildeten Transkripte gelegen. Ob die Integration in diesem Gen echt ist und keine Integration ist, die fälschlicherweise durch endogene Retroviren in der LM-PCR gezeigt wurde, sollte die anschließende Southern Blot Analyse zeigen. Dabei wurden die genomischen DNAs von verschiedenen FLT3-ITD und den FLT3-ITD/Runx1-Tumoren mithilfe von EcoRI geschnitten und anschließend der Größe nach in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragmente wurden auf eine Membran übertragen, die dann mit dem P32-markierten in der LM-PCR identifizierten *Mrv1* Fragment hybridisiert wurde.

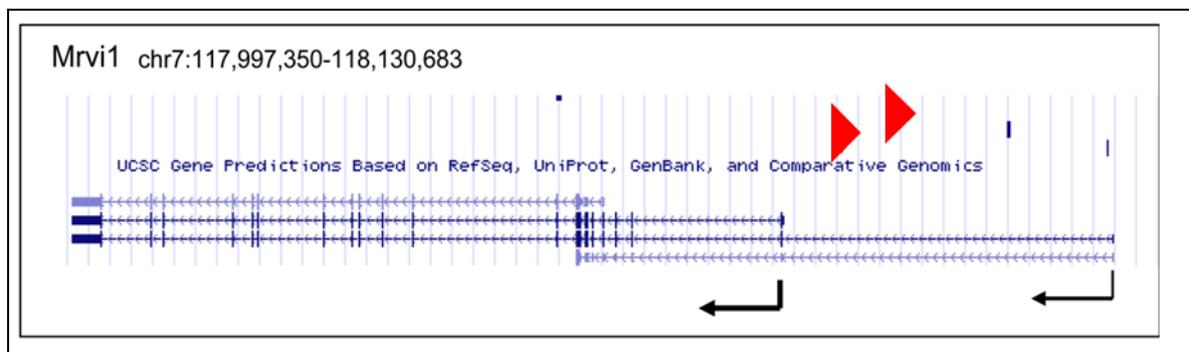


Abbildung 3.30: Integration des Provirus in die CIS *Mrv1*. Die Integrationen, die in den beiden Mäusen #11 und #13 aus dem Experiment 21 gefunden wurden, sind als rote Dreiecke, die gleichzeitig die Richtung der Integration anzeigen, gekennzeichnet. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtungen der *Mrv1* Transkripte an. Die blauen Striche kennzeichnen Integrationen, die bereits in anderen Tumoren in *Mrv1* identifiziert wurden.

Die Southern Blot Analysen zeigen, dass in den retransplantierten FLT3-ITD Mäusen aus Experiment 18 und 21 im Gegensatz zu dem Runx1/FLT3-ITD Primärtumor aus Experiment 15 Maus #9 sowie in den retransplantierten Sekundärtumoren aus Maus #11 und #13 des Experiments 21 keine *Mrv1*-Integration vorliegt. In beiden Mäusen wurde zuvor auch per LM-PCR die Integration nachgewiesen. Die Integration bestand augenscheinlich schon in dem Primärtumor. Die Southern Blot Analyse der unabhängigen FLT3-ITD Tumore aus Experiment 21 zeigt keine Integration in *Mrv1*, was dadurch gekennzeichnet ist, dass keine zweite rekombinierte Bande im Gegensatz zu den Runx1/FLT3-ITD Tumoren in der Abb.3.31 auf den Blot zu erkennen war. Es steht also fest, dass die Integration bisher nur in den per LM-PCR analysierten Runx1/FLT3-ITD Tumoren auch per Southern Blot identifiziert werden konnte.

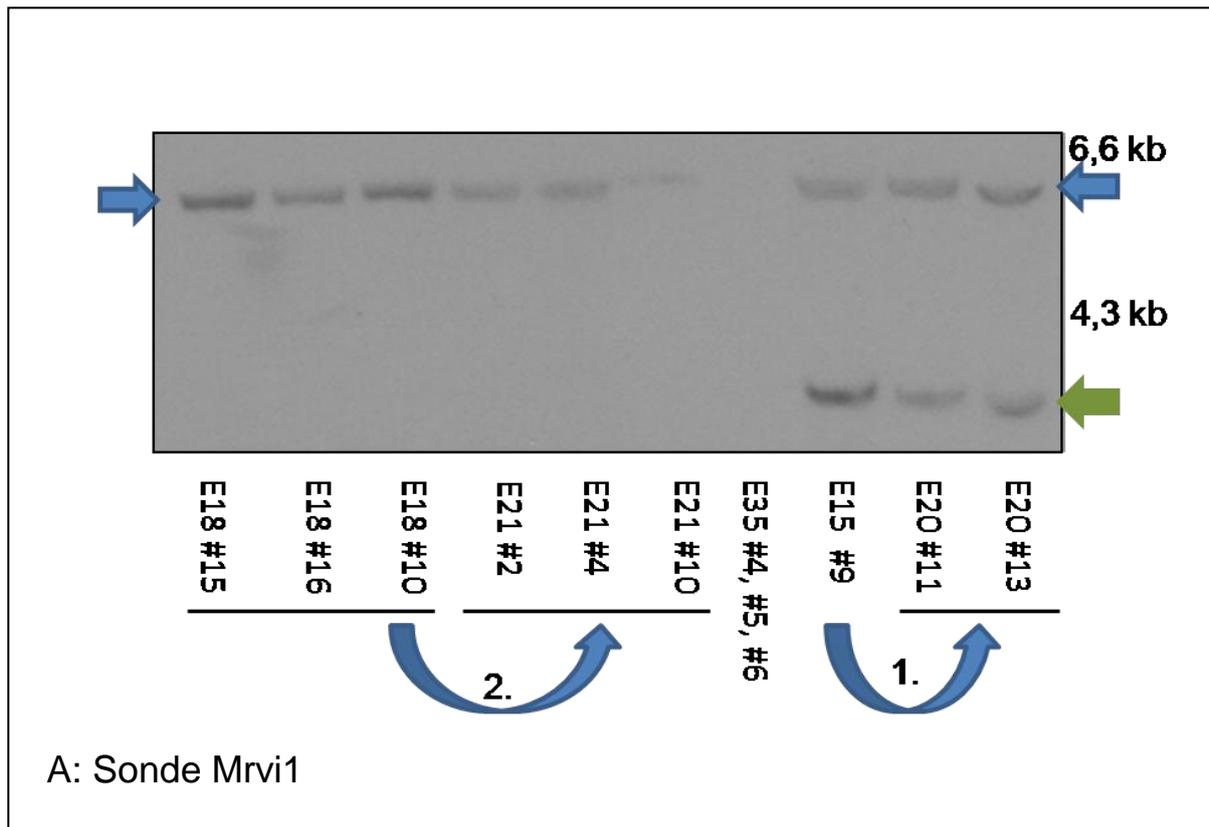


Abbildung 3.31: Southern Blot Analyse der mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdauten genomischen DNA von verschiedenen FLT3-ITD Sekundärtumoren. Als Sonde wurde das Mrvi1-Fragment der LM-PCR verwendet. In den FLT3-ITD Tumoren ist nur die Bande für das endogene Mrvi1 zu sehen (mit blauem Pfeil gekennzeichnet) während in den FLT3-ITD/Runx1 Tumoren die durch die Integration entstandene Bande (durch einen grünen Pfeil gekennzeichnet) eindeutig zu erkennen ist. Der gebogene blaue Pfeil mit den beiden Ziffern 1 und 2 kennzeichnet die stattgefundenen Retransplantationen.

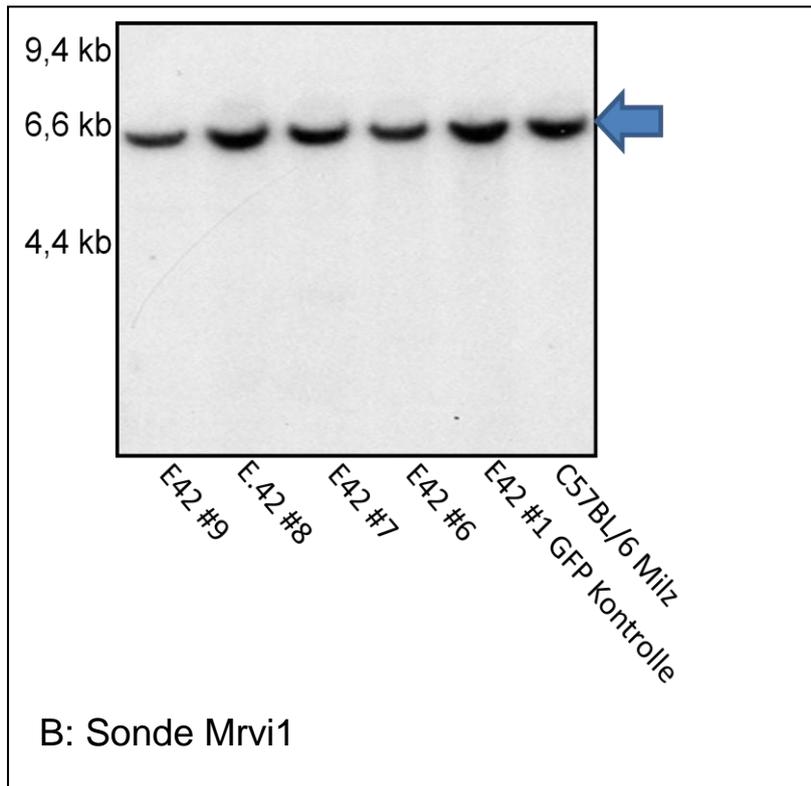


Abbildung 3.32: Southern Blot Analyse der mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdauten genomischen DNA von verschiedenen, voneinander unabhängigen FLT3-ITD Primärtumoren.

Als Sonde wurde das Mrvi1-Fragment der LM-PCR verwendet. In den FLT3-ITD Tumoren ist genau wie in der C57BL/6 Kontrolle nur die Bande für das endogene Mrvi1 zu sehen (mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet). Es ist folglich keine Integration in Mrvi1 nachweisbar.

3.7.6 Analyse der relativen mRNA Expression von Mrvi1 in den Runx1/FLT3-ITD Tumoren

Welchen Einfluss die Integration auf die Genexpression von *Mrvi1* hatte, wird im Folgenden durch eine RT-PCR untersucht. Dazu wurden die verschiedenen RNAs aus Sekundärtumoren, die eine *Mrvi1* Integration in der Southern Blot Analyse aufwiesen, isoliert, in einer reversen Transkriptase-Reaktion zu cDNA umgeschrieben und dann einer PCR unterzogen.

Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass *Mrvi1* in den FLT3-ITD Tumoren, die eine *Mrvi1* Integration aufwiesen (E1#1 und E1#2) nur sehr schwach bis nicht mehr detektierbar exprimiert wird. Allerdings zeigt auch die cDNA-Ladekontrolle (Aktin-PCR), dass im Vergleich zu dem IgM positiven B-Zelltumor (BCT) und zu dem Sekundärtumor aus Experiment 35 weniger cDNA eingesetzt wurde. Der FLT3-ITD Sekundärtumor, in dem keine Integration in *Mrvi1* festgestellt werden konnte, zeigte genau wie die Positivkontrolle BCT eine *Mrvi1*-Bande auf dem Agarosegel. Um eine genaue Aussage über die Expression von *Mrvi1* in den Tumoren, die eine *Mrvi1* Integration aufwiesen, zu treffen, müsste eine quantitative PCR durchgeführt werden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass *Mrvi1* in den Tumoren nur sehr schwach exprimiert wurde. Fest steht jedoch, dass es sich bei dieser

Mrvi1 Integration um eine echte Integration handelt (siehe Abb. 3.31), die bereits im Primärtumor nachweisbar war.

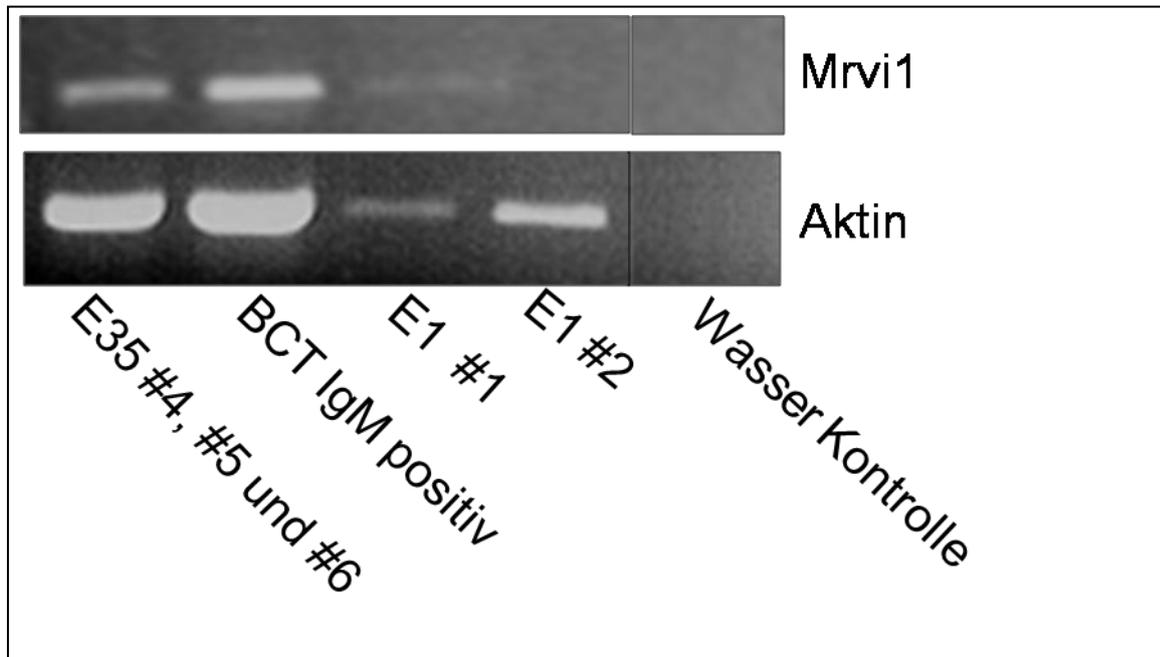


Abbildung 3.33: RT-PCR von Sekundärtumoren, die eine *Mrvi1* Integration aufwiesen. Die Abbildung zeigt die RT-PCR von Sekundärtumoren, die eine *Mrvi1* Integration aufwiesen (E1) und von Sekundärtumoren, die keine Integration aufwiesen (E35). Als Kontrolle wurde ein IgM positiver B-Zell Tumor aufgetragen und als cDNA negative Kontrolle wurde eine Wasserprobe mitgeführt. Als Ladekontrolle wurde eine *Aktin*-PCR mit denselben Proben durchgeführt. *Mrvi1* wird in den Sekundärtumoren aus Experiment 1 nur sehr schwach bis nicht mehr detektierbar exprimiert.

3.7.7 LM-PCR von Experiment 42 Maus #6, #7, #8 und #9

Um weitere retrovirale Integrationsseiten von voneinander unabhängigen FLT3-ITD Tumoren zu untersuchen, musste erneut eine LM-PCR durchgeführt werden. Die Sequenzierung der LM-PCR Fragmente der vier verschiedenen Mäuse ergab die Identifikation von sechs Integrationen, in denen die retrovirale LTR nachweisbar war (siehe Anhang 5). Drei der Integrationen konnten als CIS identifiziert werden, wobei zwei im Weiteren in den FLT3-ITD Tumoren näher analysiert werden sollen. Dabei handelt es sich um Tob2 und Dgkd. Tob2 gehört zu der Familie der anti-apoptischen BTG Proteine. Das erste Mitglied dieser Familie, BTG1, wurde in der Nähe einer chromosomalen ‚*Breakpoint*‘ Translokation gefunden, die in chronischen B-Zell Leukämien identifiziert wurde. Tob2 ist auch in den Kalzium-Stoffwechsel eingebunden; so zeigte die Arbeitsgruppe von Yamamoto in 2008, dass Tob2 an den Vitamin3 Rezeptor binden kann, welches zur Inhibition von Kalzium-Flux führt. DGKD (Diacylglycerol Kinase delta) ist in der Lage, das Produkt Diacylglycerol (DAG) der Spaltung

von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C (PLC) in Inositoltriphosphat (IP₃) zu phosphorylieren. Diese Kinase reguliert eine Vielzahl von Signalproteinen wie PKC und Phospholipase C. Es ist bekannt, dass PLC γ durch den Prä-B-Zell Rezeptor oder aber den B-Zell Rezeptor aktiviert wird und so PIP₂ in DAG und den sekundären Botenstoff IP₃ spaltet, welches an den IP₃-Rezeptor bindet und so zur Kalzium-Ausschüttung und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt.

Tabelle 15: Zusammenfassung der LM-PCR Ergebnisse für die analysierten Mäuse aus Experiment 42. Gezeigt werden die identifizierten Integrationsstellen, ob das retrovirale LTR in der Sequenz wiedergefunden wurde und die verschiedenen Mäuse #6 bis #9, in denen die Integration gefunden wurde. Eine per LM-PCR identifizierte Integration ist mit einem X gekennzeichnet. Die Identifikation als eine CIS ist mit einem roten Kasten markiert. Die Integration zwischen zwei Genen ist mit einem Schrägstrich markiert.

Identifizierte Integrationsstellen	Exp.42 #6	Exp.42 #7	Exp.42 #8	Exp.42 #9	LTR gefunden
Trim19	x	-	-	-	Ja
Tob2	-	x	-	-	Ja
Pip4k2a	-	-	x	-	Ja
Plcxd3	-	-	x	-	Ja
Dgkd/Sag	-	-	-	x	Ja
Abcd9/ Vps37b	-	x	-	-	Ja

Tabelle 16: Detaillierte Daten der retroviralen Integrationen von Experiment 42#6, #7, #8 und #9.

In der Tabelle ist das Gen, die Position sowie die Lage relativ zum Gen und die Orientierung der Integration zu entnehmen. (STRAB: stromabwärts, STRA: stromaufwärts).

Chromosom/ Position der Integration (bp)	Gen	Relative Lage zum Gen	Orientierung des Provirus relativ zum Transkript
12/714,500,90	Trim19	1489 bp STRAB des Transkriptionsstarts	Inverse Orientierung

Chromosom/ Position der Integration (bp)	Gen	Relative Lage zum Gen	Orientierung des Provirus relativ zum Transkript
5/124,501,431	Abcd9/ Vps37b	10435 bp STRAB des Transkriptions- endes von Abcd9	Inverse Orientierung
		19162 bp STRA des Transkriptionsstarts von Vsp37b	Inverse Orientierung
2/188,773,08	Pip4k2a	42440 bp STRAB des Transkriptions- starts im ersten Intron	Inverse Orientierung
1/897,531,20	Dgkd/ Sag	3258 bp STRAB des Transkriptionsstarts von Dgkd	Gleiche Orientierung
		11388 bp STRA des Transkriptionsstarts von Sag	Gleiche Orientierung

Die vorher erläuterten CIS wurden nur jeweils einmal in Maus #7 (*Tob2*) und in Maus #9 (*Dgkd*) gefunden: Es gab keine Integrationsstelle, die in den vorher analysierten Mäusen gefunden wurde, noch eine Integration die unter den Mäusen des Experiments 42 gleich war. Die Sequenzanalyse der Maus #7 des Experiments 42 (siehe Abb. 3.34) zeigte, dass sich die Integration des Provirus stromaufwärts von dem Gen *Tob2* befand und dass die Orientierung umgekehrt zu dem des Transkripts war. Auch zwei andere Integrationen wurden in der Nähe der FLT3-ITD B-Zelltumoren gefunden. Welche Auswirkung die Integration an dieser Stelle auf die relative mRNA Expression von *Tob2* hatte, wird in 3.7.8 mittels einer RT-PCR des FLT3-ITD Tumors aus Maus #7, in der die Integration identifiziert wurde, gezeigt. Die Sequenzanalyse der Maus #9 des Experiments 42 zeigte, dass sich die retrovirale Integration in *Dgkd* befand und das ganz in der Nähe von drei anderen Integrationen, die über die RCG Datenbank identifiziert wurden. Die Integration liegt in der

entgegengesetzten Richtung der gebildeten Transkripte von *Dgkd*. Ob es sich um echte Integrationen handelte, wurde per Southern Blot Analyse von FLT3-ITD Tumoren überprüft.

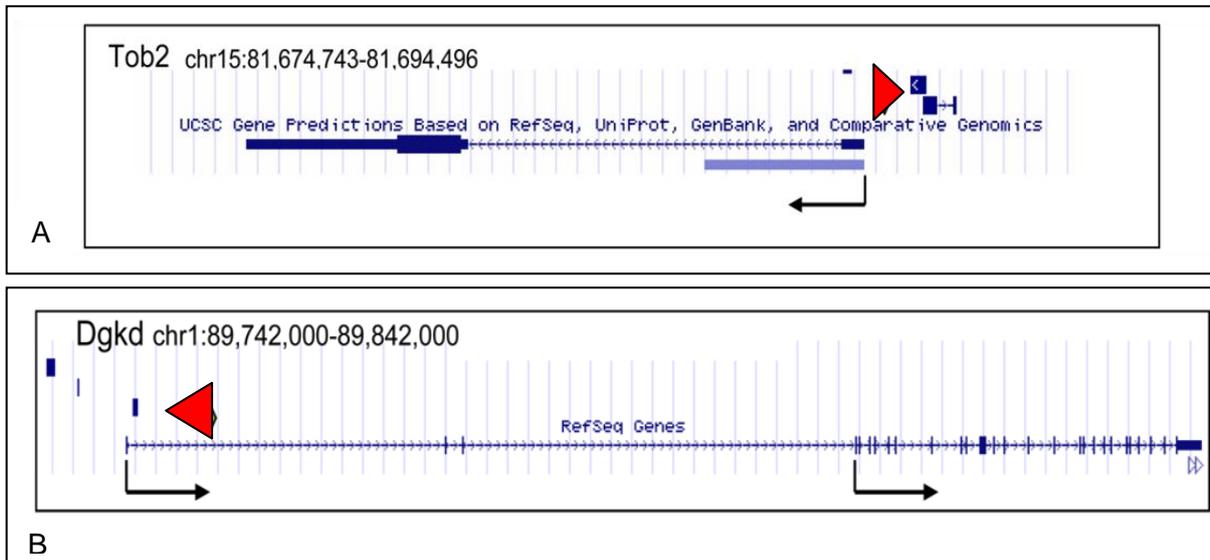


Abbildung 3.34: A: Vergleich der erhaltenen Sequenz des LM-PCR Fragments für *Tob2* anhand der RCTCG-Datenbank. Das rote Dreieck kennzeichnet die Richtung sowie den Ort der Integration des Provirus im Mausgenom. Der schwarze Pfeil zeigt die Orientierung des *Tob2* Transkriptes. Die Integration liegt in der Nachbarschaft zweier aus zwei unabhängigen Tumoren identifizierter Integrationen. **B: Vergleich der erhaltenen Sequenz des LM-PCR Fragments für *Dgkd* anhand der RCTCG Datenbank.** Das rote Dreieck kennzeichnet die Richtung sowie die Integrationsstelle des Provirus. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Orientierung der beiden von *Tob2* gebildeten Transkripte. Die Integration liegt in einem Locus, in dessen Nähe bereits drei andere retrovirale Integrationen gefunden wurden.

Für die Southern Blot Analysen wurden genomische DNAs aus Tumoren der FLT3-ITD Mäuse isoliert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und die erhaltenen Fragmente über Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Fragmente über ein Blot-Verfahren auf eine Membran übertragen und mittels einer Sonde, die aus dem jeweiligen LM-PCR Fragment bestand und mit dessen Hilfe die Integrationsstellen identifiziert werden konnten, hybridisiert. Anhand der Southern Blot Analyse mit der *Tob2* Sonde konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Integration um eine echte Integration handelte, die allerdings nur in der Maus #7 des Experiments 42 nachgewiesen werden konnte und nicht in anderen unabhängigen FLT3-ITD Tumoren des Experiments 42 sowie in den retransplantierten Tumore aus Experiment 18 und 21 (siehe Abb.3.35). Bei dem Nachweis der *Dgkd* Integration stellten sich zwei Probleme: Erstens wurde festgestellt, dass sich in der per LM-PCR identifizierten Integration am Anfang der Sequenz ca. 40 bp befanden, die repetitiv waren. Das bedeutet, dass diese kurze Sequenz auf vielen Chromosomen zu finden war. Hand in Hand damit ging das zweite Problem, dass die

hergestellte Sonde ebenfalls diese repetitive Sequenz enthielt und somit auf dem Southern Blot auch diese zahlreichen repetitiven Sequenzen markierte. Es war schwierig am Bandenmuster zu erkennen, was die rekombinante Bande für die *Dgkd*-Integration war und welches die repetitiven Elemente (siehe Abb. 3.36). Der Southern Blot kann so nicht eindeutig ausgewertet werden.

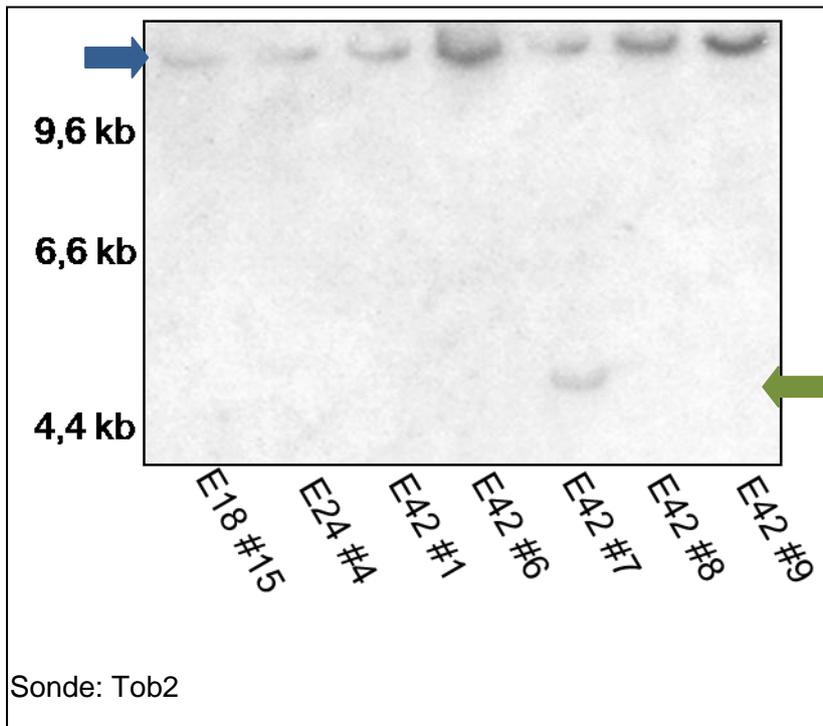


Abbildung 3.35: Southern Blot Analyse zur Untersuchung der Tob2 Integration.

Dargestellt sind die mit *EcoRI* geschnittenen DNAs aus der Milz von Sekundärtumoren aus Experiment 18 und 24, sowie voneinander unabhängige FLT3-ITD Tumore aus Experiment 42. Es ist nur eine durch die Integration entstandene Tob2 Bande (mit grünem Pfeil gekennzeichnet) in der Probe der Maus #7 aus Experiment 42 zu erkennen. Die anderen FLT3-ITD Tumore zeigten nur eine endogene Tob2-Bande (mit blauem Pfeil gekennzeichnet).

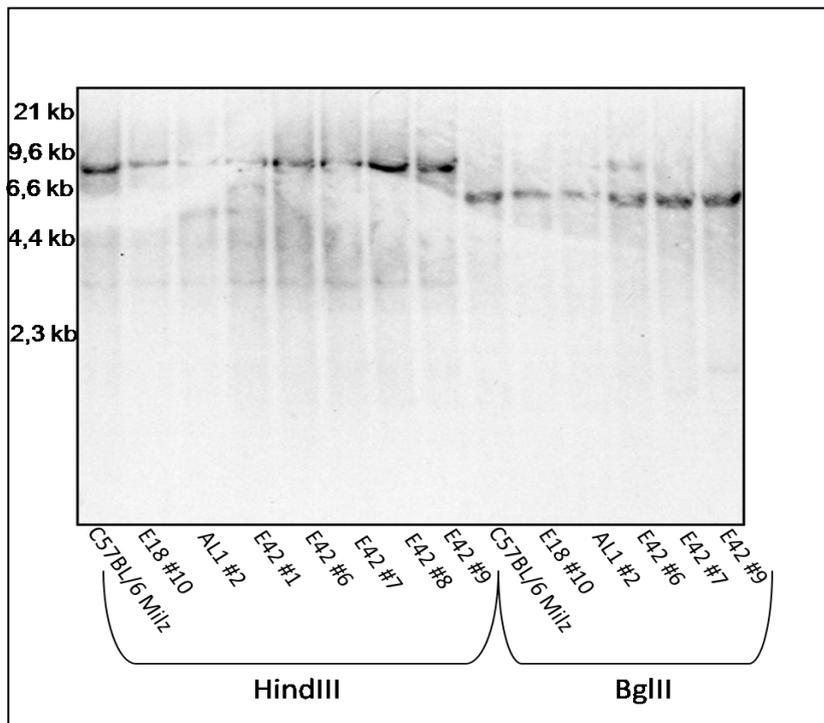


Abbildung 3.36: Analyse der retroviralen Integration in DGKD.

Diese Southern Blot Analyse zeigt verschiedene FLT3-ITD Tumore. Die aus den verschiedenen Tumoren isolierte DNA wurde mit HindIII (links) oder BglIII (links) geschnitten. Es konnte wegen des repetitiven Sequenzanteils keine eindeutige Aussage über die Integration in Maus #9 des Experiments 42 getroffen werden.

3.7.8 Analyse der relativen mRNA Expression in Maus #7 Experiment 42

Im Weiteren sollte geklärt werden, welche Auswirkung die Integration in der Nähe von *Tob2* für die Expression des Gens in der Maus 7 des Experiments 42 hatte. Die Integration konnte per Southern Blot Analyse nur in dieser Maus eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.35). Für die RT-PCR wurde RNA aus Knochenmarkszellen der Maus isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Mithilfe der anschließenden PCR konnte die relative mRNA Expression von *Tob2* in dem FLT3-ITD Tumor untersucht werden. Zusammen mit einer *Aktin*-PCR, um die Mengen der eingesetzten cDNAs vergleichen zu können, wurde die *Tob2* PCR angefertigt. Es zeigte sich, dass *Tob2* in dem FLT3-ITD #7 Tumor Experiment 42 überexprimiert wurde (siehe Abb.3.35). Ein anderer FLT3-ITD Tumor aus Maus 9 Experiment 42 zeigte in der Southern Blot Analyse keine Integration und wurde als negativ-Kontrolle in der PCR aufgetragen. In dem Knochenmark dieser Maus zeigte sich eine moderate Expression von *Tob2*, nahezu vergleichbar mit der Expression im Knochenmark einer C57BL/6 Maus. Die Aktin-PCR zeigte, dass für die Probe aus Maus 9 im Gegensatz zu den anderen beiden Proben mehr cDNA genutzt wurde. Die Wasserkontrolle zeigte keine Bande und somit die Spezifität der gebildeten PCR Produkte für *Aktin* als auch für *Tob2*. Weitere Analysen mit Hilfe der quantitativen Realtime PCR sollen zeigen, wie hoch genau die relative mRNA Expression in der Probe E42 #7 im Gegensatz zu anderen FLT3-ITD Tumorproben ist, die keine Integration in der Nähe der *common integration site* *Tob2* haben.

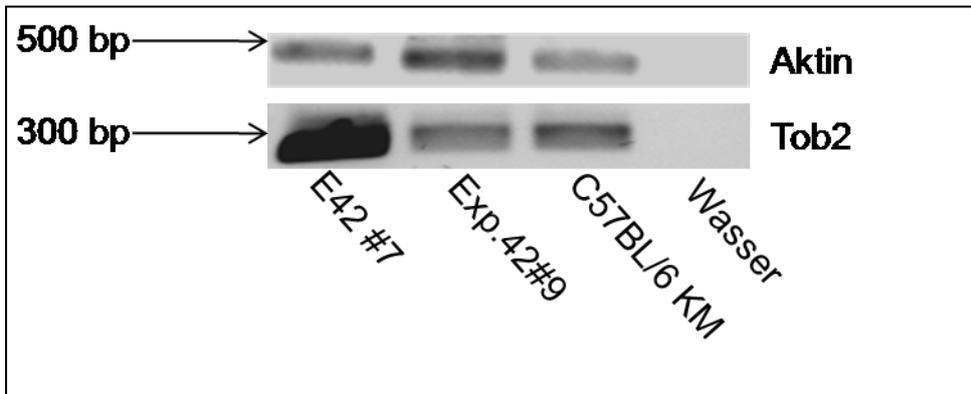


Abbildung 3.37: Tob2 Expression in FLT3-ITD Tumoren mit und ohne Tob2 Integration. Gezeigt ist eine PCR-Analyse von einem FLT3-ITD Tumor, in dem die *Tob2*-Integration festgestellt wurde (Exp.42#7) und einem FLT3-ITD Tumor in dem keine *Tob2*-Integration identifiziert werden konnte. Als Kontrollen dienten C57BL/6 Knochenmark und für die cDNA-Negativkontrolle ein Ansatz mit Wasser. Als Ladekontrolle wurde eine *Aktin*-PCR angefertigt. Es ist zu sehen, dass *Tob2* in dem Tumor #7 aus Experiment 42 stark überexprimiert ist im Gegensatz zu dem Tumor #9 aus Experiment 42 in dem keine *Tob2* Integration festgestellt werden konnte.

Weiterhin wäre es interessant, andere unabhängig voneinander entstandene FLT3-ITD Tumore, per LM-PCR zu analysieren, damit die verschiedenen Integrationen, die bisher per Southern Blot bestätigt wurden, auch in diesen Tumoren wiederzufinden. Nur so kann eine eventuelle Kausalität der retroviralen Integrationsseiten zur Entstehung einer Leukämie in Kooperation mit der FLT3-ITD Mutation hergestellt werden. Desweiteren müssten diese verschiedenen Gene zusammen mit FLT3-ITD über retrovirale Vektoren in Mäuse eingeschleust werden, um die Kooperation der beiden Mutationen im Zusammenhang mit der Ausbildung einer Leukämie zu prüfen.

4 Diskussion

FLT3 Mutationen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen die in akuten Leukämien gefunden wurden. Die aktivierende FLT3-ITD Mutation, die durch eine Insertion einer internen Tandem Duplikation (ITD) in der Juxtamembrandomäne der Rezeptor Tyrosinkinase entsteht, wird dabei häufiger in Leukämiepatienten identifiziert als Punktmutationen in den Kinasedomänen des Rezeptors. Da das *FLT3*-Gen häufig durch Mutationen verändert ist, bietet der Rezeptor ein Ziel für Therapieversuche mit Inhibitoren. Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, die Signaltransduktion von murinen FLT3-ITD Tumorzellen zu charakterisieren, um im Weiteren die aktivierten Signalwege in diesen Zellen zu hemmen. Für die Hemmung wurden niedermolekulare Inhibitoren (PKC412; FLT3 Inhibitor, Ly294002; PI3K Inhibitor, U0126; MEK Inhibitor, PP2-*Src*-Kinase Inhibitor) oder dominant negative Formen des STAT5-Proteins eingesetzt. So gelang es die für FLT3-ITD Tumorzellen essentielle Signalwege in Hinblick auf die Proliferation und Apoptose zu bestimmen. Das zweite Ziel der Analysen der FLT3-ITD Tumorzellen war es zu untersuchen, ob die FLT3-ITD Expression allein ausreichend war um die ALL auszulösen, oder ob sekundäre Mutationen in den Tumoren vorlagen, die die Leukämogenese der Tumore erhöht haben. Durch die Kombination von Southern Blot Analysen, um die retroviralen Integrationen zu detektieren, und den Retransplantationsexperimenten, konnte gezeigt werden, dass die FLT3-ITD Tumore klonal waren. Dies war ein Hinweis darauf, dass mit FLT3-ITD kooperierende, sekundäre Mutationen in den Tumoren vorlagen, die dazu beigetragen haben könnten, die Leukämie zu induzieren. Anschließend konnten mittels LM-PCR die retroviralen Integrationsstellen im Mausgenom identifiziert werden. Unter den zahlreichen retroviralen Integrationen befanden sich verschiedene, sogenannte ‚*common integration sites*‘, die bereits in anderen Tumoren durch andere Arbeitsgruppen identifiziert wurden. Diese Gene sind alle in den Kalziumsignalweg eingebunden. Die FLT3-ITD Tumorzellen sind in ihrer Differenzierung zwischen dem Pro- und dem Prä-B Zellstadium blockiert. Die verschiedenen Integrationen könnten die Signalgebung des Prä-BZRs in den Zellen gestört haben und so kooperierend mit FLT3-ITD auf die Blockade der Differenzierung sowie auf die Leukämogenese der Zellen gewirkt haben.

4.1 Mausmodelle, die dazu beigetragen haben, die Rolle und Funktion der internen Tandem Duplikation in der B-Zell ALL zu charakterisieren

Mausmodelle werden von vielen Forschungsgruppen verwendet, um die Entstehung einer Leukämie unter unterschiedlichen Bedingungen *in vivo* analysieren zu können. Seit längerer Zeit beschäftigen sich zahlreiche Forschungsgruppen mit den aktivierenden Mutationen der FLT3 Rezeptor-Tyrosinkinase. In dem hier genutzten Mausmodell gelang es zum ersten Mal durch die FLT3-ITD Mutation eine B-Zell ALL zu generieren, während die anderen Arbeitsgruppen mit ihren FLT3-ITD Konstrukten in den Mäusen vor allem myeloproliferative Erkrankungen (Kelly et al., 2002 und Grundler et al., 2005) oder Lymphome (Kelly et al., 2002, Lee et al., 2007) erhalten haben. FLT3-ITD Mutationen sind vor allem mit myeloiden Neoplasien in Patienten assoziiert und wurden überwiegend in AML-Patienten identifiziert. Bisher konnte die FLT3-ITD Mutation noch nicht in myeloproliferativen Neoplasien, wie sie mit RAS oder JAK2 Mutationen in Verbindung gebracht werden, gefunden werden (Kim et al., 2009; Wahlstrom et al., 2008; Olsen et al., 2008; Siemiątkowska et al., 2009). Ebenso spiegeln die Lymphome, die in einigen FLT3-ITD oder FLT3-TKD Mausmodellen gefunden, wurden keine Krankheit wider in der eine FLT3 Aktivierung identifiziert wurde. Dies steht im Gegensatz zu dem hier genutzten Mausmodell, das einer kindlichen B-Zell ALL ähnelt, in der FLT3-ITD und FLT3-TKD Mutationen bereits in Patienten gefunden wurden. Zusätzlich ein wichtiger Punkt im Vergleich zwischen unserem und den anderen Mausmodellen ist sicherlich die Transplantierbarkeit der FLT3-ITD Tumorzellen. In dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal, FLT3-ITD Tumorzellen zu transplantieren. Die Rezipienten entwickelten nach der Transplantation wiederum eine B-Zell ALL und das bereits nach einer sehr kurzen Latenzzeit, was die Aggressivität der Leukämie widerspiegelt. Es gelang in diesem Zusammenhang auch zum ersten Mal FLT3-ITD Tumorzellen, die direkt aus der Maus gewonnen wurden, in semi-flüssigen Medium unter Zusatz von IL7 zu kultivieren. Dies stellte ein *ex vivo*-System zur Verfügung, um die Signalwege zu untersuchen, die durch das aktivierte FLT3-ITD angeschaltet wurden und die Konsequenz ihrer Inaktivierung durch Inhibitoren.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in den FLT3-ITD Mausmodellen können durch eine Vielzahl an Modifikationen in der methodischen Vorgehensweise, der Länge der überexprimierten internen Tandem Duplikation des FLT3-Rezeptors oder aber durch den genutzten Mausstamm, entstanden sein.

Obwohl bekannt ist, dass die Länge der internen Tandem Duplikation einen Einfluss auf das Überleben und den Behandlungserfolg der Patienten hat (Meshinchi et al., 2008; Stirewalt et al., 2006), konnten experimentelle Mausmodelle bisher keinen Unterschied in der Pathologie der entstandenen Krankheiten zeigen, wenn verschiedene Längen der ITD zwischen 7 und 20 Aminosäuren für die Versuche verwendet wurden (Kelly et al., 2002; Ono et al., 2005; Grundler et al., 2005; Schessl et al., 2005; Stubbs et al., 2005). Die ITD, die in dem hier verwendeten Mausmodell genutzt wurde, war 30 Basenpaare lang und entsprach folglich einer Insertion von 10 Aminosäuren (AS). Somit schien die Länge der Insertion keine entscheidende Rolle in den Mausmodellen gespielt zu haben.

Welchen Einfluss hatte die Auswahl des genutzten Mausstammes auf den Phänotyp der Krankheit? In unserem Modell wurden C57BL/6 Mäuse genutzt, die durch die Überexpression der FLT3-ITD Mutation eine B-Zell ALL entwickelten. Dies steht im Gegensatz zu anderen Mausmodellen von Kelly et al. und Grundler et al., die unter der Verwendung von BALB/c Tieren jeweils den Phänotyp einer myeloproliferativen Krankheit erhielten. Frühere Studien haben gezeigt, dass stammeigene genetische Mutationen bei der Entstehung von Krankheiten in Mäusen eine wichtige Rolle spielen (Szymanska et al., 1999; Elefanty and Cory, 1992; Elefanty et al., 1990). Der BALB/c Stamm zum Beispiel weist im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen eine funktionelle Veränderung des Tumorsuppressorgens *Cdkn2a* auf (Zahng et al., 1998 und 2003). Diese genetische Anomalität könnte in den BALB/c Mausmodellen die Entstehung der Myeloproliferation begünstigt haben.

Weitere Faktoren wie die Art der Zielzelle, die Infektionsrate sowie die Kultivierung der Zellen während der Infektion und die Expressionssysteme, die für die Versuche genutzt wurden könnten sicherlich ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der verschiedenen Erkrankungen gespielt haben (Elefanty and Cory, 1990; Ilaria et al., 2003; van Etten, 1999).

4.2 Charakterisierung von Signalwegen, die durch die FLT3-ITD Mutation aktiviert werden

Der FLT3 Rezeptor wird normalerweise durch die Stimulation mit dem FLT3-Liganden (FL) aktiviert. Durch die interne Tandem Duplikation (ITD) wird der auto-inhibitorische Effekt der Juxtamembrandomäne des Rezeptors aufgehoben. Daraus resultiert eine vom Liganden unabhängige Aktivierung des Rezeptors. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu analysieren, welche Signalwege durch die Liganden-unabhängige Signaltransduktion von FLT3-ITD in den leukämischen B-ALL Zellen, wichtig sind, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Für den

Vergleich der Signale in der Western Blot Analyse wurden aus C57BL/6 islierte, sortierte Pro-B Zellen genutzt, da die FLT3-ITD Zellen eine Blockade im Differenzierungsgrad zwischen den Pro-B Zellen und den Prä-B Zellen aufwiesen. In den FLT3-ITD Zellen wurden aktiviertes STAT5, aktiviertes AKT und eine aktivierte MAPK im Gegensatz zu den Pro-B Zellen vorgefunden, die nur eine Aktivierung des PI3K Effektors AKT zeigten.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Analysen die mit Hilfe von verschiedenen Zelllinien angefertigt wurden, überein. Bereits in der Ba/F3-Zelllinie und der myeloiden 32D Zelllinie wurde gezeigt, dass die Expression der FLT3-ITD Mutation eine Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation zur Folge hatte. FLT3-ITD war somit in der Lage diese Zellen zu transformieren (Mizuki et al., 2000; Hayakawa et al., 2000). Der Vergleich der Signaltransduktion vom wt FLT3 Rezeptor mit dem FLT3-ITD Rezeptor in der myeloischen 32D Zelllinie hat gezeigt, dass die FLT3-ITD transformierten Zellen durch die konstitutive Aktivierung des Rezeptors in der Western Blot Analyse ein aktiviertes MAPK Signal (Phosphorylierung des Tyrosinrests 204), ein aktiviertes AKT Signal (Phosphorylierung am Serinrest S473) sowie ein aktiviertes STAT5 Signal (Phosphorylierung an den Tyrosinresten 694 und 699) aufwiesen. Auch in zwei lymphoiden Zelllinien wurde durch Takahashi et al. 2006 gezeigt, dass mittels retroviraler Infektion mit einer FLT3-ITD Mutante in diesen Zellen der RAS/RAF/MAEK/ERK Signalweg aktiviert war.

Ein Unterschied in der Aktivierung von STAT5 konnte im Vergleich zu dem FLT3 wt Rezeptor, dem FLT3-ITD Rezeptor und dem FLT3 Rezeptor mit einer Punktmutation in der Kinasedomäne in myeloiden Zellen analysiert werden. Dabei war besonders die Phosphorylierung des STAT5-Proteins und des FLT3-Proteins in den FLT3-ITD transformierten Zellen sehr stark. Es konnte bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass STAT5 nicht oder nur im ganz geringen Maße durch die FL-Stimulation aktiviert wird (Grundler et al., 2003; Mizuki et al., 2003; Kiyoi et al., 2002, Murata et al., 2003 und Choudhary et al., 2007). Wird eine FLT3-Punktmutante der Kinase-Domäne in 32D Zellen oder auch anderen Zelllinien exprimiert, so tritt ebenfalls eine Aktivierung des STAT5 Proteins ein, welche jedoch nicht so stark ist wie bei der ITD-Mutation (Schmidt-Arras et al., 2009).

Somit scheint sich die Signaltransduktion von den in der Arbeit verwendeten Zellen im Vergleich mit den FLT3-ITD 32D Zellen nicht zu unterscheiden. In der hier identifizierten akuten lymphatischen Leukämie scheint es keinen Unterschied zu myeloischen Zellen mit der gleichen Mutation in Hinblick auf die Signaltransduktion der oben genannten analysierten Signalwege zu geben.

4.3 FLT3 und dessen stromabwärts aktivierte Signalwege als Ziel von Therapien mit Inhibitoren in Leukämiepatienten

Die Entdeckung, dass FLT3 sehr häufig durch somatische, aktivierend wirkende Mutationen in AMLs wie ALLs verändert ist und dies mit einer sehr schlechten Prognose für die jeweiligen Patienten assoziiert ist, machte aus der FLT3 Rezeptor-Tyrosinkinase ein attraktives molekulares Ziel für die Entwicklung neuer Therapeutika. Mit diesen Therapeutika sollte die Kinasedomäne und somit die konstitutive Aktivität des Rezeptors in Patienten gehemmt werden. In der hier dargestellten Arbeit wurden die leukämischen FLT3-ITD Tumorzellen, die im Mausmodell eine B-Zell Leukämie verursacht haben, mit dem Staurosporin-Derivat PKC412 behandelt, um die Wirkung des Inhibitors auf die Proliferation und die Apoptose zu analysieren. Die Ergebnisse zeigten, dass der Inhibitor, der mit einer Konzentration von 100 nM eingesetzt wurde, FLT3 und alle von FLT3 stromabwärts gelegenen Signalwege (PI3K/AKT Signalweg, RAS/RAF/MEK Signalweg und STAT5) im Vergleich zu der DMSO behandelten Kontrolle inhibierte. Auch die Analyse der Proliferation zeigte, dass die Kontrollzellen wesentlich mehr Kolonien in der Methylzellulose ausgebildet haben als die mit dem Inhibitor behandelten Zellen. Auf der Ebene der lebenden Zellen wurde eine Inhibition von fast 90% erreicht. Dieser Effekt wird in der Literatur auch ‚*oncogene addiction*‘ genannt, ein Ausdruck der beschreibt, dass die leukämischen Zellen in hohem Maße abhängig von den Signalwegen sind, welche durch die mutierten Proto-Onkogene aktiviert werden (Small, 2006).

Die Ergebnisse der Inhibitorversuche unterstützen die Hypothese, dass die FLT3-Inhibitoren auch effektiv für die klinische Behandlung von ALL-Patientenproben genutzt werden können, wie es derzeit schon für AML-Patientenproben der Fall ist. Zurzeit werden für FLT3 immer mehr niedermolekulare Tyrosin Kinaseinhibitoren (TKI) entwickelt, die meist als kompetitive Inhibitoren in Hinblick auf ATP wirken und in der dafür vorgesehenen Bindungstasche der Kinasedomäne binden. Der erste TKI AG1295 wurde zufällig bei Tests von Inhibitoren des PDGF Rezeptors gefunden, der zur gleichen Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinasen wie der FLT3-Rezeptor zählt. Zusätzlich zu PKC412, dem Inhibitor der in dieser Arbeit eingesetzt wurde, sind andere gut charakterisierte Wirkstoffe/Inhibitoren CEP-701 (Lestaurinib), MLN518 und SU11248 (Levis et al., 2002; Weisberg et al., 2002; Kelly et al., 2002). Diese FLT3 TKI zeigen ihre Aktivität gegen FLT3 bereits im nM-Bereich und einige davon haben gezeigt, dass sie zytotoxische Effekte auf leukämische Zelllinien sowie Patientenproben hatten.

Die Zellen wurden nach der siebentägigen Kultivierung und Analyse der Proliferation (Zählung der Kolonien sowie der lebenden Zellen) mit den Apoptosemarkern 7AAD und Annexin 5 gefärbt. Dabei wurde der basale Wert der Apoptose durch die Messung von mit DMSO behandelten Tumorzellen bestimmt. Der basale Apoptosewert unterschied sich nicht wesentlich zu dem von mit PKC412 behandelten Zellen (7,1% apoptotische Zellen (DMSO), 8,4% apoptotische Zellen (PKC412). Es lässt sich nicht ausschließen, dass es zu einem anderen, früheren Zeitpunkt womöglich zur Apoptoseinduktion der Tumorzellen gekommen sein kann. Zum Zeitpunkt der Analyse zumindest war kein Hinweis auf ein apoptotisches Absterben der Zellen ersichtlich, obwohl der Induktionsweg für die Apoptose in den Zellen vorhanden war, was an den Ergebnissen der Versuche, die Tumorzellen in Flüssigkultur zu kultivieren, klar ersichtlich war. Das Fehlen der Induktion der Apoptose steht im Kontrast zu früheren Studien, in denen die Behandlung von myeloiden FLT3-ITD Zellen mit den FLT3-Inhibitoren AG1295 und AG1295 eine Inhibition der Autophosphorylierung von FLT3 und die Induktion der Apoptose mit einem IC_{50} von 300 nM zu sehen war (Levis et al., 2001).

Aber auch andere Studien zeigten, dass FLT3-ITD Patientenproben sowie retroviral infizierte FLT3-ITD Zelllinien durch die Behandlung mit Inhibitoren wie LS104 die Apoptose initiierten (Kasper et al., 2008). Mit PKC412 behandelte FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Ba/F3 Zelllinien zeigten, wie die hier genutzten B-ALL FLT3-ITD Zellen eine reduzierte Phosphorylierung von FLT3. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass die mit PKC412 behandelten Ba/F3 Zelllinien einen Zellzyklusarrest sowie die Induktion der Apoptose aufwiesen (Weisberg et al., 2002). Der Unterschied zwischen den Zelllinien und den in dieser Arbeit verwendeten Zellen liegt unter anderem darin, dass unsere Zellen auf den Wachstumsfaktor Interleukin 7 angewiesen sind (siehe 3.2), während die in anderen Studien verwendete Zelllinien so transformiert waren, dass sie keinen Wachstumsfaktor mehr benötigen haben. Ein weiterer Unterschied ist, dass unsere Zellen B-Zell ALL sind, die möglicherweise den Prä-BZR exprimieren. Ob dieser funktional ist konnte bisher noch nicht überprüft werden. Die Zellen könnten trotz der Behandlung mit den Inhibitoren vor der Apoptose durch einen anti-apoptotischen Effekt durch den Prä-BZR geschützt werden. Eine Studie hat gezeigt, dass die Apoptose in BZR positiven Zelllinien durch die erhöhte Expression von TNF α oder aber von NF- κ B anti-apoptotisch wirkende Proteine wie Bcl-2 hochreguliert werden und die Zellen vor Apoptose schützen können (Markus et al., 2002; Schauer et al., 1998).

Obwohl der FLT3-Inhibitor scheinbar keine Apoptose in den FLT3-ITD Tumoren ausgelöst hat, konnte er dennoch die Proliferation blockieren und die Fähigkeit der Zellen Kolonien zu bilden *in vitro* verringern. Mausversuche wären notwendig, um zu überprüfen, ob diese

Wirkung ausreichend für die Inhibition von Tumorwachstum *in vivo* ist, wie es bereits für myeloide Modelle der Fall ist, die FLT3-Inhibitoren anwenden (Kelly et al., 2002, Wiseberg et al., 2002, Levis et al., 2002). In den Mausmodellen vermittelten die Inhibitoren ein längeres Überleben der Versuchstiere und eine reduzierte Ausbreitung der AML Patientenproben.

Da einige Tumorzellen durch Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren auf diese nicht mehr reagieren und eine Resistenz entwickeln (Small 2006), werden immer mehr Inhibitoren entwickelt, die sich in verschiedenen Phasen der pre-klinischen Studien befinden. Eine weitere Erklärung dafür, dass in unseren Inhibitorversuchen keine erhöhte Apoptose in den mit den Inhibitoren behandelten FLT3-ITD Tumorzellen nachweisbar war, könnte sein, dass die Kultivierung der Zellen von 7 Tagen in der Methylzellulose für diesen Versuch zu lange erfolgte und Zellen entweder resistent gegenüber dem Hemmstoff geworden sind oder aber der Hemmstoff nur eine begrenzte Zeit in der Methylzellulose stabil war und so die restlichen überlebenden FLT3-ITD Tumorzellen auswachsen konnten, die in der Apoptosemessung nur eine basale, mit den DMSO-behandelten FLT3-ITD Zellen vergleichbare Apoptoserate aufzeigten. Es wurde von Pratz et al. 2008 gezeigt, dass nach der Behandlung mit dem Inhibitor KW-2449 in einer FLT3-ITD Tumorzelllinie, die aus einem Patienten mit akuter myeloider Leukämie isoliert wurde, nur geringe Apoptosewerte erzielt werden konnten, jedoch eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung von FLT3 und STAT5 in der Western Blot Analyse und eine verringerte Proliferation im Hinblick auf Kontrollzellen beobachten werden konnte. Dieses Ergebnis unterstützt unsere Beobachtungen, dass die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren nur geringe Apoptoseraten bewirkten. Relativ neue Wirkstoffe, die zurzeit getestet werden, sind zum Beispiel BAY43.9006, SU11657, KI23819 und KW-2449. Diese Inhibitoren hemmen aber nicht nur speziell FLT3 oder andere Tyrosinkinase Rezeptoren der Subklasse III wie c-KIT oder PDGFR sondern auch andere Kinasen wie die Aurorakinase. Meist sind für die verschiedenen Kinasen unterschiedliche IC_{50} -Werte der Inhibitoren einsetzbar, um so eine Hemmung mehrerer Kinasen zugleich zu verhindern.

Ein weiteres Problem an der Inhibitorentwicklung ist, dass die meisten Wirkstoffe sehr hydrophob sind, überwiegend in DMSO gelöst werden müssen und meist an die Plasmaproteine der Zellen binden. Nur freie Inhibitoren können an FLT3 binden und die Kinaseaktivität vermindern. Die Inhibitoren müssen in der Testphase zudem nicht nur in Zelllinien getestet werden, sondern auch im humanen Blutplasma, denn dort sollen sie später eingesetzt werden. Nur diese Tests lassen eine Vorhersage über die spätere anwendbare Konzentration zu. Allzu häufig werden in den Patienten viel höhere Konzentrationen des Wirkstoffs eingesetzt. Dabei werden die Hemmstoffe, die diese Phase

der klinischen Studie erreicht haben, durch orale Medikation meist gut toleriert (Smith et al., 2004, Stone et al., 2005, Fiedler et al., 2005). Dennoch ist es nicht selten, dass diese Patienten einen Rückfall erleiden und die leukämischen Zellen wieder auswachsen. Deshalb wenden immer mehr Studien die Kombination von klassischer Chemotherapie und zusätzlicher Gabe von Inhibitoren oder aber die Kombination zweier Inhibitoren zusammen an, um einen Rückfall oder eine Resistenz der Zellen zu umgehen (Brown et al., 2004 und 2005, Armstrong et al., 2003).

4.4 Bedeutung der PI3K/AKT und RAS/RAF/MEK/ERK Signalwege und aktiviertem STAT5 in akuten Leukämien und anderen Krebserkrankungen

4.4.1 RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT Signalweg

RAS-Proteine sind Signalüberträger, die auf Stimuli von einer Vielzahl von Rezeptoren reagieren und die Signale an stromabwärtsgelegene Signalkaskaden wie den RAF/MEK/ERK- oder den PI3K/AKT-Signalweg weiterleiten. Deswegen spielen RAS-Proteine eine wichtige Rolle für die Proliferation und das Überleben von hämatopoetischen Zellen und Vorläuferzellen. Die krankhaft veränderte Aktivierung von RAS Proteinen wurde in akuten myeloiden Leukämien bereits durch die mutierten und konstitutiv aktivierten RTKs c-Kit und FLT3 beobachtet (Malumbres et al., 2003; Van Meter et al., 2007). Die in dieser Arbeit analysierten FLT3-ITD Tumorzellen waren allerdings lymphoiden Ursprungs und zeigten in der Western Blot Analyse die Aktivierung der oben genannten Signalwege durch die ITD Mutation von FLT3. Durch die Hemmung dieser Signalwege mit spezifischen Inhibitoren in der Methylzellulose sollte die Bedeutung des jeweiligen Signalweges für die Proliferation sowie für die Apoptose charakterisiert werden. Dass beide Signalwege für die Proliferation wichtig waren, zeigte sich an der sehr eingeschränkten Fähigkeit dieser mit Inhibitoren behandelten Zellen Kolonien in der Methylzellulose auszubilden. Auch die Anzahl lebender Zellen war in den behandelten Proben auf <10% im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle reduziert. Dass die Apoptoseraten in diesen beiden Proben fast der der DMSO-Kontrolle entsprach (Apoptoserate bei mit U0126-MEK Inhibitor behandelten Tumorzellen etwas erhöht) könnte die gleichen Gründe wie die Länge der Inkubation der Zellen in Methylzellulose oder aber die Stabilität der Inhibitoren haben. Allgemein ist jedoch

festzustellen, dass die beiden Signalwege für die Proliferation und das Überleben der FLT3-ITD B-Zell ALL Tumorzellen eine wichtige Bedeutung hatten, was durch die in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitorversuche gezeigt werden konnte.

Die Wichtigkeit der PI3K/AKT- und RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwege, die durch FLT3-ITD stimuliert werden, die bereits in früheren Studien von Brandts et al., in 2005 gezeigt wurde, welche zeigten, dass ein aktiviertes AKT Signal für die Leukämogenese, die Proliferation und das Überleben von myeloiden FLT3-ITD transformierten Zellen unabdingbar war. Obwohl interessanterweise davon ausgegangen wird, dass RAS Mutationen in 10% der erwachsenen AML-Patienten vorkommen (Bos et al., 1987, Bowen et al., 2005), sind RAS Mutationen in ALL Patienten seltener vorzufinden. So zeigt eine Studie von Paulsson et al., 2008, dass RAS-Mutationen in ca. 20% (n=78) von ALL-Patienten vorkommen, die einen hyperdiploiden Chromosomensatz besitzen. Dennoch sind somatische Mutationen der Mitglieder der beiden Signalkaskaden wie AKT1 oder PI3KCA sehr selten in AML oder ALL Proben identifiziert worden. Auf der anderen Seite wurden diese Mutationen häufig in soliden Tumoren gefunden (Carpten et al., 2007, Davies et al., 2002). Es wurde zudem bestätigt, dass aktivierte Formen der PI3KCA zu der Transformation von myeloiden Zellen führen können (Horn et al., 2008). Obwohl die hier präsentierten Ergebnisse eine wichtige Rolle des PI3K/AKT sowie RAF/MEK/ERK Signalweges in den FLT3-ITD induzierten B-ALL bestätigen konnte, bleibt unklar, ob diese Signalwege auch in anderen ALL Subtypen, die keine aktivierende FLT3 Mutation besitzen, eine Rolle spielen. Aktivierte RAS/RAF/MEK/ERK- und PI3K/AKT Signalwege sind ein Kennzeichen für AML-Subklassen, was im Gegensatz zu ALL-Patientenproben steht (Martelli et al., 2006, Plataniias et al., 2003).

4.4.2 Aktivierung von STAT5

STAT5 wird häufig in Krebserkrankungen und Leukämien als aktiviertes Protein gefunden. So ist die Aktivierung von STAT5 mit dem Hodgkin-Lymphom (Scheeren et al., 2008), chronischer myeloider Leukämie (Poincloux et al., 2007) und Brustkrebs (Young et al., 2005) assoziiert. Aber auch in der akuten myeloiden Leukämie wurde die STAT5-Aktivierung durch FLT3-ITD beobachtet (Schmidt-Arras et al., 2009). Die transformierende Rolle von STAT5 in Leukämien, in denen FLT3 mutiert ist, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass durch die Stimulation des wt FLT3 Rezeptors mit dem FLT3-Liganden auf der einen Seite STAT5 kaum aktiviert wird, während auf der anderen Seite die FLT3-ITD Mutation und die

Kinasedomäne-Mutation von FLT3 eine starke Aktivierung von STAT5 zeigen. Die Phosphorylierung/Aktivierung von STAT5 ist bei dem FLT3-ITD Rezeptor am stärksten. Diese starke Aktivierung durch FLT3-ITD könnte dadurch zustande kommen, dass durch die interne Tandem Duplikation für die Aktivierung von STAT5 wichtige Tyrosinreste (589 und 591) verdoppelt wurden (Rocnik et al., 2006). Bisher wird angenommen, dass STAT5 durch einen Janus Kinasen-unabhängigen Weg in FLT3-ITD transformierten Zellen aktiviert wird (Choudhary et al., 2007). Ob dies durch einen zwischengeschalteten Effektor geschieht oder aber durch FLT3-ITD direkt ist noch unklar.

In dieser Arbeit konnte die Wichtigkeit der durch FLT3-ITD induzierten STAT5 Aktivierung durch die Expression von dominant negativen Formen von STAT5a oder STAT5b in FLT3-ITD Tumorzellen bestätigt werden. Die Transduktion der lymphoiden FLT3-ITD Tumorzellen mit dominant negativen STAT5 Mutanten hat ähnlich wie in den Inhibitorversuchen eine Reduktion in der Kolonienbildung als auch der lebenden Zellen im Gegensatz zum Neo-Kontrollvektor gezeigt. Die Western Blot Analyse der Tumorzellen hat gezeigt, dass das stromabwärts von STAT5 liegende Effektormolekül BCL-X_L durch die Expression der dominant negativen STAT5-Proteine herunterreguliert war. Dies zeigte abermals die Funktionalität der Mutanten in den Tumorzellen. Die Ergebnisse lassen darauf hindeuten, dass auch die Aktivierung des STAT5 Proteins für die Proliferation und das Überleben der FLT3-ITD Tumorzellen essentiell war.

Diese Ergebnisse waren unerwartet, da frühere Studien die Hypothese unterstützt haben, dass die Aktivierung von STAT5 durch FLT3-ITD eine wichtige Komponente der myeloiden aber nicht der lymphoiden Transformation darstellt (Grundler et al, 2005). In der Studie von Grundler et al. wurde gezeigt, dass eine FLT3-TKD Punktmutante im Mausmodell zu einem oligoklonalen lymphoproliferativen Phänotyp führte, dessen Latenzzeit im Vergleich zu der FLT3-ITD Mutation, die zu einem myeloproliferativen Phänotyp führte, wesentlich länger war. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass FLT3-TKD Mutationen, die eine viel schwächere Aktivierung des STAT5 Proteins zeigen, in einer ca. 8-fach höheren Frequenz im Gegensatz zu FLT3-ITD Mutationen in ALL gefunden werden. Das Gegenteil ist in AML-Proben der Fall: Hier kommt die ITD Mutation des FLT3 Rezeptors in ca. 10-27% der Patienten vor, während die TKD Mutation in etwa 3-7% der Fälle identifiziert wurde (Small 2006, Armstrong und Look, 2005, Paulsson et al., 2008, Taketani, 2004). Dieser Zustand könnte darauf hinweisen, dass niedrige Level des aktivierten STAT5-Proteins, die durch die FLT3-TKD Mutation induziert wurden, ausreichend sind, um die Transformation der frühen B-

Zelllinie zu bewirken, jedoch nicht der myeloiden Linie. Folglich angenommen, dass die Frequenz dieser Mutation in beiden hematopoetischen Linien gleich ist, kommt sie nicht exklusiv in der myeloiden Linie vor.

Zwei Anhaltspunkte unterstützen diese Hypothese: Erstens wird die Wichtigkeit von STAT5 in der Lymphopoese in einem Mausmodell gezeigt, in dem das Fehlen von STAT5 zu einer Störung der Entwicklung lymphatischer Zellen führte. Es kam zu einer Blockade der Differenzierung im frühen Pro-B Zellstadium (Goetz et al., 2004). Ein ähnlicher Phänotyp wurde in dem Knockout-Mausmodell beobachtet, in dem der IL7R ausgeschaltet wurde, was die Bedeutung von STAT5, das dem IL7R nachgeschaltet ist, wieder hervorhebt. Zweitens wurde in einem Mausversuch von B. Niebuhr aus unserer Arbeitsgruppe eine aktivierende STAT5 Mutante in C57BL/6 Mäuse eingebracht. Es gelang, einen ähnlichen Defekt in der B-Zell Differenzierung zu zeigen, wie es in dem FLT3-ITD Mausmodell in dieser Arbeit der Fall war. Allerdings konnte keine Leukämie durch das aktivierte STAT5 Protein induziert werden. Offensichtlich sind für eine stärkere Proliferation und Überlebenssignale, die Aktivierung des PI3K- und/oder des RAS/MEK-Signalwegs erforderlich, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. Die hier erlangten Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass auch STAT5 für die Blockade der Differenzierung der FLT3-ITD Tumorzellen wichtig ist und bringt die interessante Hypothese auf, dass die anormale Aktivierung von FLT3 in der Lage ist, Mutationen der Klasse eins sowohl als auch Mutationen der Klasse zwei zu modulieren. Jedoch verbleibt die Frage, ob andere kooperierende Mutationen, unabhängig von dem FLT3-ITD Signalweg, notwendig waren, um die Leukämie in dem FLT3-ITD ALL Mausmodell auszulösen.

4.5 FLT3-ITD Tumore sind klonal, was die Selektion auf kooperierenden Mutationen aufzeigt

Um Aufschluss darüber zu geben, ob sekundäre kooperierende Mutationen während des Auswachsens der leukämischen Zellen auftraten, welches durch die FLT3-ITD Transduktion induziert wurde, wurde die Klonalität der Tumore untersucht. Spontane Mutationen oder aber auch die integrierten Proviren könnten den FLT3-ITD Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft und so das Auswachsen eines leukämischen Klons gefördert haben. Hätte die FLT3-ITD Mutation allein ausgereicht, um eine Leukämie auszulösen, so wären die Tumore

alle polyklonal gewesen. Mittels einer GFP-Sonde konnten die Integrationsstellen in einer Southern Blot Analyse sichtbar gemacht werden, da der retrovirale Vektor das Reportergen GFP trug. In der Southern Blot Analyse der primären FLT3-ITD Tumoren zeigte sich, dass die FLT3-ITD Tumoren bis zu 6 retrovirale Integrationsstellen besaßen. Die mittels der GFP-Sonde detektierten Banden wiesen die gleichen Intensitäten auf. Das könnte auf der einen Seite einen einzelnen Zellklon mit multiplen Integrationsstellen vermuten lassen, oder aber auf der anderen Seite mehrere Zellklone mit einer limitierten Anzahl an Integrationen. Um zwischen den beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden zwei sekundäre Tumore untersucht, die aus Reimplantationsexperimenten von primären FLT3-ITD Tumoren in sekundäre Rezipienten stammten. Die Southern Blot Analyse des einen Tumors zeigte in jedem der sekundären Tumoren ein wiederkehrendes Bandenmuster. Es ist also davon auszugehen, dass der gleiche Zellklon in den sekundären Rezipienten wiederum in der Lage war, die B-Zell ALL auszulösen. Es handelte sich dabei um einen Klon mit mehreren Integrationsstellen. Durch die Reimplantation des zweiten zu analysierenden Tumors wurde allerdings gezeigt, dass es sich bei dem Primärtumor wahrscheinlich um zwei dominante leukämische Klone handelte, die in den Sekundärtumoren durch unterschiedliche Bandenmuster sichtbar wurden.

Dieses Ergebnis zeigte klar, dass die Mehrheit der Tumore mono- bis oligoklonal waren und bis zu sechs Integrationsstellen in demselben Zellklon auftraten. Die Statistik besagt, dass nur eine Chance von 0,05% besteht, dass in einer Zelle sechs Integrationsstellen bei einer Infektionsrate von ca. 20% auftreten (Fehse et al., 2004). Die unerwartet hohe Anzahl an retroviralen Integrationen in einer einzelnen Zelle ist höchstwahrscheinlich die Konsequenz von zwei Ereignissen. Erstens haben frühere Arbeiten gezeigt, dass nicht alle Zellen gleichermaßen responsiv auf die retrovirale Infektion reagieren und dass die Poisson-Verteilung nicht zwingend das genaue Infektionsniveau in einer gemischten Zellpopulation vorhersagt. Sicherlich ist die Rate der Zellen die sich aktiv im Zellzyklus befinden und nicht in einer Arrestphase, ein wichtiger Parameter der die Infektionsfrequenz beeinflussen kann. Jedoch könnte die Anzahl der Proviren pro Zelle durch Unterschiede in der Konzentration der viralen Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder theoretisch die Konzentration der zellulären Proteine, die dabei helfen könnten die virale Integration zu manipulieren, beeinflusst werden. Zweitens könnte die hohe Anzahl an retroviralen Integrationsstellen in karzinogenen Zellen einen Selektionsprozess anzeigen. Eine höhere Anzahl an Integrationen könnte die Chance erhöhen, dass eine Integration die Expression eines Onkogens oder eines Tumorsuppressorgens beeinflusst hat und somit zum Tumorwachstum beiträgt.

Es konnte ebenfalls durch Southern Blot Analyse eines FLT3-ITD Tumors, bei dem es sich wahrscheinlich um zwei dominante Klone handelte, gezeigt werden, dass die Sekundärtumore nicht klonal in Hinblick auf die Rekombination der schweren Immunoglobulinkette waren, da die Bandenmuster des Primärtumors nicht mit denen der Sekundärtumore übereinstimmten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die verschiedenen Klone sich in verschiedenen Entwicklungsstufen der B-Zellentwicklung befanden, als sie mit dem retroviralen Vektor infiziert wurden. Erst nach der Infektion erfolgte in diesen Tumoren die Rekombination der schweren Kette des Prä-BZRs. In einer weiteren Southern Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass ein klonaler FLT3-ITD Tumor, bei dem es sich um einen Zellklon mit mehreren Integrationsstellen handelte, auch auf der Ebene der Rekombination der schweren Ketten des Prä-BZRs klonal war. Dies zeigte sich an dem wiederkehrenden Bandenmuster des Primärtumors als auch der Sekundärtumore. Das lässt vermuten, dass die Zielzelle des Retrovirus bereits eine frühe B-Zelle war, in der die Rekombination der schweren Kette bereits vor der Infektion stattgefunden hatte oder aber dass die weiteren, sekundären Mutationen, die durch die retroviralen Integrationen zustande gekommen sind, zu der Klonalität geführt haben.

4.5.1 Kooperieren die Gene, die durch die retrovirale Insertion dysreguliert wurden mit FLT3-ITD in der Tumorgenese?

Die Wahrscheinlichkeit der in dieser Arbeit analysierten FLT3-ITD Tumore, dass die retroviralen Integrationen zu weiteren mit FLT3-ITD kooperierenden Mutationen geführt haben, steigt bei einer so großen Anzahl an Integrationsstellen. Um die retroviralen Integrationsstellen zu analysieren, wurde die genomische DNA der FLT3-ITD Tumore auf die Integrationsstellen mittels LM-PCR hin untersucht, um die mit FLT3-ITD kooperierenden Mutationen zu analysieren.

Vorerst sollte auf die retrovirale Integration an sich und deren Einfluss auf die Genexpression eingegangen werden. Die Inaktivierung oder aber die Aktivierung von Genen durch integrierte Proviren kann auf verschiedene Arten erfolgen. Bringt die Aktivierung oder aber die Inaktivierung von Genen einen direkten Selektionsvorteil für die Zellen, so kann eine klonale Expansion der Zelle eintreten. Die retroviralen Integrationen, die für die Tumorentwicklung wichtig sein können, werden in zwei Gruppen eingeteilt. Bereits Jonkers und Bern fassten 1996 zusammen, dass die Integration zum einen zur Aktivierung von Onkogenen oder zum anderen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann. Allerdings führt die Inaktivierung von Tumorsuppressoren nur dann zu einem

Selektionsvorteil, wenn beide Allele des Gens inaktiviert sind. Die Ausnahmen sind die Tumorsuppressoren mit Haploinsuffizienz oder die Bildung dominant negativer Proteine. Aktuellere Studien haben gezeigt, dass integrierte Proviren ebenfalls in der Lage sind, die Expression von microRNAs zu aktivieren (Wang et al., 2006, Brown et al., 2006), welche wiederum in der Lage sind, Einfluss auf die Genexpression ihrer Zielgene auf posttranskriptionaler Ebene zu nehmen.

Die LM-PCR Analyse sechs verschiedener und voneinander unabhängiger FLT3-ITD Tumoren hat ergeben, dass einige retrovirale Integrationsstellen in der Nähe von sogenannten ‚*common integration sites*‘ lagen, was ihre Signifikanz unterstreicht. Die festgestellten CIS konnten weiterhin nicht in voneinander unabhängigen Tumoren ein zweites Mal identifiziert werden, jedoch von anderen Arbeitsgruppen, die verschiedene Tumore auf ihre Integrationsstellen hin untersucht haben. Die Analyse weiterer FLT3-ITD Tumore ist notwendig, um mehrere Integrationsstellen zu erhalten und um weitere CIS oder bereits identifizierte CIS zu identifizieren. Die in dieser Arbeit gefundenen CIS sind: *Ptpn1/Cebpb*, *Mv11*, *Tob2*, und *Dgkd*. Diese Gene und dessen Funktionen sollen im Folgenden erläutert werden:

Es wurde eine Integration auf dem Chromosom zwei 125843 bp stromaufwärts des *Ptpn1* Gens und 116754 bp stromabwärts befindlich des *Cebpb* Gens identifiziert. Durch die RT-PCR Ergebnisse von FLT3-ITD Tumoren in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Tumoren mit der retroviralen Integration zwischen *Ptpn1* und *Cebpb* eine sehr geringe Expression von *Cebpb* aber eine moderate Expression von *Ptpn1* in der PCR nachweisbar war. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass die Integration stromabwärts von *Cebpb* zu einer verminderten Expression des Gens in dem FLT3-ITD Tumor mit der entsprechenden Integration geführt haben könnte. Die *Ptpn1/Cebpb*-Integration könnte auch in einer konservierten regulatorischen Domäne liegen, die Einfluss auf die Expression der entsprechenden Gene nimmt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass, wenn das Provirus stromaufwärts von einem Gen der gleichen transkriptionellen Orientierung integriert, wie in diesem Fall für *Ptpn1*, so kann der virale Promotor im 5' oder 3' LTR anstelle des zellulären Promotors genutzt werden. Eine deregulierte Transkription des Gens kommt dadurch zustande, da der retrovirale Promotor nicht den gleichen Regulationsmechanismen unterliegt wie der von dem betroffenen Gen normalerweise genutzte Promotor. Wird der Promotor im 5'-LTR genutzt, wird häufig das Polyadenylierungssignal im 3'-LTR überlesen und durch die Nutzung der viralen *Splice-Donor-Sequenz* (SD) ein Fusionstranskript generiert. Häufig ist aber auch bei Promotor-Insertionen die 5'-LTR-Sequenz deletiert,

wodurch der Promotor in der 3'-LTR-Sequenz genutzt wird (Westaway *et al.*, 1984). Promotor-Insertionen können auch im ersten Intron eines Gens lokalisiert sein. In diesem Fall ist das endogene Transkript durch Nutzung des viralen Polyadenylierungssignals (pA) verkürzt, jedoch vermittelt der provirale Promotor die Transkription aller stromabwärts liegenden Exons.

Das *Ptpn1* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type1*) Gen kodiert für die Tyrosin-Phosphatase 1B. Diese Phosphatase spielt eine Rolle in der Insulin-Rezeptor Regulation, ist aber auch in den intrazellulären Kalzium-Influx von Zellen involviert (Schulz *et al.* 2003). Analysen mit Hilfe der HEK-Zelllinie zeigten, dass die Transfektion mit dem humanen *Ptpn1* zu einer Inhibition des Kalzium-Influx führte. Der Influx ist unter anderem durch die Tyrosin-Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Komponenten des Kalziumsignalweges mittels Ptpn1 reguliert. Im Zusammenhang mit Krebserkrankungen wie Brustkrebs scheint die fehlende Expression von *Ptpn1* zu stehen (Tonks *et al.*, 2007; Julien *et al.*, 2007). Das *Cebpb* Gen kodiert für das ‚CAAT/ enhancer binding protein beta‘. Dabei handelt es sich um ein Protein der bZIP Familie, das in die Interleukin 6 Signaltransduktion eingebunden ist. Es ist in der Lage als Dimer an DNA zu binden und kann sowohl Komplexe mit dem Transkriptionsfaktor der gleichen bZIP Subfamilie C/EBP alpha als auch mit C/EBP gamma bilden. Bisher ist in Verbindung mit Krebs bekannt, dass in Patienten, die an Wilms Tumoren erkrankt sind und einen Rückfall erleiden, *Cebpb* höher exprimiert wird als in Patienten, die keinen Rückfall erleiden. Es wird angenommen dass *Cebpb* für das Überleben der Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt (Li *et al.*, 2005).

In einem FLT3-ITD Primärtumor und den daraus retransplantierten Sekundärtumoren wurde eine retrovirale Integration im *Mrv1* Gen gefunden. Dabei liegt die Integration, dessen Orientierung entgegengesetzt der des *Mrv1*-Transkriptes ist, auf Chromosom 7 und ist 8150 bp entfernt von dem *Mrv1*-Transkriptionsstart. In der RT-PCR Analyse der Tumore, die eine *Mrv1*-Integration aufwiesen, konnte eine nur sehr schwache Expression des *Mrv1* Transkripts im Vergleich zu FLT3-ITD Tumoren, die keine Integration aufwiesen, gezeigt werden. Allerdings war die PCR nicht quantitativ, da nicht genügend Material vorhanden war. Bei *Mrv1* handelt es sich um ein Protein, das zuerst als ein putatives Tumorsupressorgen identifiziert wurde, welches häufig durch das *Mouse-AIDS-related virus* (MRV) zerstört ist (Shaughnessy JD Jr. *et al.*, 1999). Von dem Protein existieren mehrere Isoformen. Eine weitere Funktion des *Mrv1* Proteins ist die Beteiligung am Kalzium-Signalweg. Es ist in der Lage an den IP₃-Rezeptor zu binden und so den Kalziumfluss zu inhibieren. Daher kommt auch das Synonym IRAG (Inositol,1,4,5 triphosphat (InsP₃) Rezeptor-assoziiertes cGMP

Kinase-Substrat) für Mrvi1, das in die cGMP-abhängigen Proteinkinase eingebundene NO/cGMP-abhängige Inhibition von InsP₃-abhängigen Kalzium-Flux in humanen Zellen der glatten Muskulatur involviert ist (Fritsch et al., 2004). 2007 konnten Antl et al. zeigen, dass in *Mrvi1* Knockout-Mäusen die Deletion die Interaktion zwischen dem IP₃R und Mrvi1 vollständig aufhob und eine Inhibition der Fibrinogen-Rezeptor Aktivierung und die Inhibition der Blutplättchen-Aggregation zur Folge hatte.

Die Integration in dem Gen *Dgkd* ist 3258 bp entfernt vom Transkriptionsstart in dem ersten Intron; dabei entspricht die Orientierung des Provirus der entgegengesetzten wie das *Dgkd*-Transkript. Da diese Integration bisher nicht eindeutig per Southern Blot Analyse in dem FLT3-ITD Tumor, in dem die Integration per LM-PCR identifiziert werden konnte, nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression von *Dgkd* in FLT3-ITD Tumoren bisher nicht charakterisiert. Die Diacylglycerol Kinase delta (DGKD) ist in der Lage, das Produkt Diacylglycerol (DAG) der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C (PLC) in Inositoltriphosphat (IP₃) zu phosphorylieren. Diese Kinase reguliert eine Vielzahl von Signalproteinen wie PKC und Phospholipase C, die in den Kalziumstoffwechsel der Zelle eingebunden sind. Es ist bekannt, dass PLC γ durch den Prä-B-Zell Rezeptor oder aber den B-Zell Rezeptor aktiviert wird und so PIP₂ in DAG und den sekundären Botenstoff IP₃ spaltet, welches an den IP₃-Rezeptor bindet, und so zur Kalzium-Ausschüttung und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt.

Eine andere in einem FLT3-ITD Tumor identifizierte Integration, war die Integration 584 bp stromabwärts des *Tob2*-Transkriptionendes in inverser Orientierung zu dem *Tob2* Transkript. *Tob2* gehört zu der Familie der anti-apoptotischen BTG Proteine. Das erste Mitglied dieser Familie, BTG1, wurde in der Nähe einer chromosomalen ‚Breakpoint‘ Translokation gefunden, die in chronischen B-Zell Leukämien identifiziert wurde. Da *Tob*-Proteine keine DNA-Bindedomäne besitzen, wird angenommen, dass sie als Co-Aktivatoren oder auch Co-Repressoren in Verbindung mit einer Vielzahl von TF agieren. Es wurde in WEHI-231 Zellen, einer B-Zell Lymphoma-Zelllinie gezeigt, dass die retrovirale Expression von *Tob*-Proteinen (BTG1 Und BTG2) in den Zellen zu einem Wachstumsarrest führt (Hata et al., 2007). *Tob2* ist auch in den Kalzium-Stoffwechsel eingebunden; so zeigte die Arbeitsgruppe von Yamamoto in 2008, dass *Tob2* an den Vitamin3 Rezeptor binden kann, welches zur Inhibition von Kalzium-Flux führte. Die Expression von *Tob2* war in den FLT3-ITD Tumoren mit einer *Tob2* Integrationsstelle stark hochreguliert. Der Vergleich mit einem FLT3-ITD Tumor, der keine Integration aufwies, brachte dies deutlich zum Vorschein. Die retrovirale Integration bewirkte so eine Überexpression von *Tob2* in den Tumorzellen. Die Transkription

des Gens könnte auch vom endogenen Genpromotor durch die Nutzung von viralen Verstärkerelementen ‚*Enhancer*‘ stimuliert werden. Dieser Mechanismus ist der häufigste Mechanismus der Genaktivierung durch integrierte Proviren, da ‚*Enhancer*‘ über extrem große Entfernungen und sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts vom betroffenen Gen wirken können. Bei ‚*Enhancer*‘-Insertionen wird jedoch die Transkription der zellulären Gene durch Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an die ‚*Enhancer*‘ in der U3-Region des LTRs vermittelt.

Inwiefern die Integrationen der Proviren einen deutlichen Effekt auf die Expression der entsprechenden Gene haben, müsste im Folgenden eine quantitative PCR zeigen.

4.5.2 Entwicklung eines Modells für die Entstehung der B-Zell ALL in dem hier analysierten Mausmodell

Wie sind diese Integrationen mit der Entstehung der B-Zell ALL in dem FLT3-ITD Mausmodell verknüpft? Was diese Integrationen letzten Endes alle gemeinsam haben ist, dass sie in den Kalziumstoffwechsel der Zellen eingebunden sind. Ein wichtiges Kalziumsignal wird auch von dem Prä-BZR und dem BZR erzeugt. Die FLT3-ITD Zellen sind in ihrer Differenzierung zwischen dem Pro-B und Prä-B Zellstadium blockiert. Es ist nicht klar, inwiefern diese Zellen einen funktionstüchtigen Prä-BZR besitzen. Normalerweise wird FLT3 nicht mit dem Prä-BZR zusammen auf der Oberfläche der Prä-B Zellen exprimiert, da die FLT3-Expression bereits vorher durch den Transkriptionsfaktor Pax5 herunterreguliert wird (Holmes et al., 2007, Feldhahn et al., 2007). Werden beide Rezeptoren zusammen auf der Oberfläche von Prä-B Zellen exprimiert, so gehen diese Zellen in Apoptose. Erst 2008 haben Nahar et al. ein Modell entwickelt, wie leukämische Zellen diesen Mechanismus der Selektion der funktionstüchtigen Prä-BZR umgehen können. Dazu wurden die frühen B-Zell Leukämien in zwei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe werden ALL-Zellen eingeteilt, die sich durch einen funktionalen Prä-BZR auszeichnen, wie es in ALL Proben mit einer E2A-PBX1 Translokation beobachtet wurde. Auf der anderen Seite stehen ALLs, die keinen funktionalen Rezeptor aufwiesen wie in BCR-ABL positiven oder hyperdiploiden ALLs. Wurde in dieser zweiten Gruppe ein funktionstüchtiger Prä-BZR eingebracht, gingen die Zellen in Apoptose oder aber in einen Wachstumsarrest über. Trageser et al., haben 2009 gezeigt, dass in der B-Zell ALL Subgruppe (20% bis 30% der ALLs), die die BCR-ABL Tyrosinkinase exprimierten, oft die Deletion des Transkriptionsfaktors IKAROS beobachtet wurde. Beobachtungen zeigten, dass der Prä-B Zellrezeptor als ein Tumorsuppressor durch die Induktion des Zellzyklusarrests via IKAROS und dessen dominant negative

Splicevarianten, agiert. IKAROS unterstützt zudem die Tumorsuppression durch die Kooperation mit stromabwärts des Prä-BZRs liegenden Signalmolekülen. IKAROS ist in der Lage, die BCR-ABL Signaltransduktion von der Src-Kinase-Aktivierung auf SLP65 umzuleiten. Dabei ist SLP65 ein kritischer Tumorsuppressor, der stromabwärts des Prä-BZR Signalweges liegt.

Durch die retroviralen Integrationen kann eine gestörte Prä-BZR Signaltransduktion entstanden sein, die die Zellen vor der Apoptose schützt, sie aber auf der anderen Seite auch nicht weiter differenzieren lässt, da ein positives Signal des Prä-BZR ausbleibt und keine klonale Expansion der Prä-B Zellen im Sinne der Differenzierung stattfinden kann. Der Übergang von der frühen Prä-B Zelle zur späten Prä-B Zelle stellt einen wichtigen Kontrollpunkt in der B-Zell Differenzierung dar (Herzog et al., 2009). Wird kein Prä-BZR Signal in den Zellen vermittelt, so gehen die Zellen in Apoptose oder verharren vorerst in einem Prozess der Teilungsunfähigkeit (Melchers et al., 2003). Sollte der Prä-BZR erfolgreich ein Signal vermitteln, so gilt dies als Überlebenssignal und die Zellen können in eine Expansionsphase eintreten. Es gibt Hinweise darauf, dass es einen Mechanismus gibt, der zwischen dem FLT3-Rezeptor und dem Prä-B Zellrezeptor auf beiden Seiten negativ regulierend wirkt. Diese Regulation könnte in unseren FLT3-ITD Zellen durch die retroviralen Integrationsseiten blockiert oder gestört sein, sodass beide Rezeptoren zusammen auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Dabei gibt FLT3-ITD durch die stromabwärtsgelegene Signalwirkung das für die Transformation notwendige Proliferationssignal, während die Differenzierung der FLT3-ITD Tumorzellen durch das Stören des Kalzium-Flux mittels der identifizierten Integrationsstellen blockiert wird (siehe Abb. 4.1).

Die hier identifizierten CIS sollten in diesem Zusammenhang mit FLT3 weiter untersucht werden.

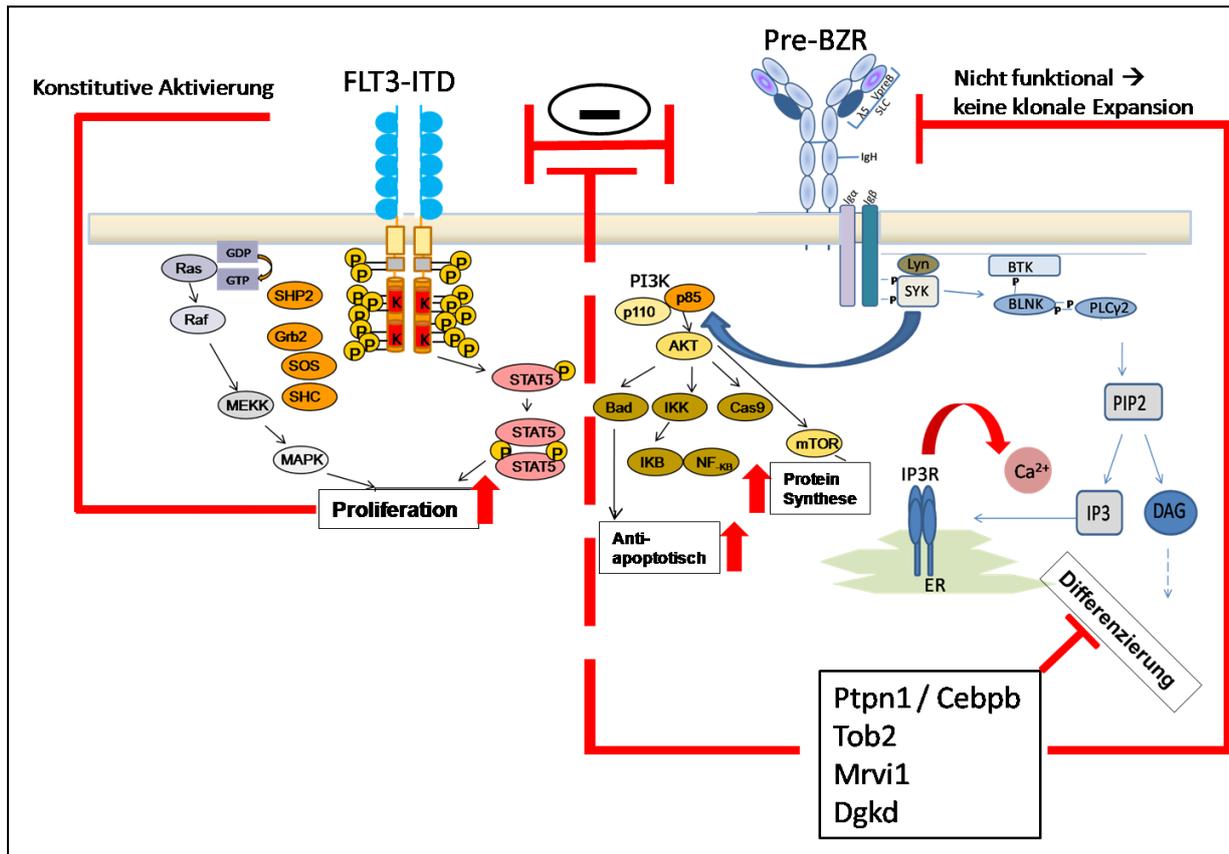


Abbildung 4.1: Modellentwicklung von Mechanismen und Signalkaskaden, die bei der Entstehung der B-Zell ALL eine Rolle gespielt haben könnten. Gezeigt sind die beiden Rezeptoren FLT3-ITD und der Prä-BZR. Die Signaltransduktion des FLT3-ITD Rezeptors vermittelt Proliferation, Proteinsynthese und die Hochregulation von anti-apoptotisch wirkenden Faktoren. Die B-ALL Zellen sind in ihrer Differenzierung blockiert. Durch die mit FLT3-ITD kooperierenden Mutationen, die durch die retrovirale Integration zustande gekommen sind, ist die Funktion des Prä-BZR gestört, es kann keine klonale Expansion erfolgen; auch dies wirkt sich auf die Differenzierung der Tumorzellen aus. Die roten Pfeile zeigen eine Hochregulation an, während die T-Enden eine Blockade der entsprechenden Mechanismen anzeigen.

4.6 Kann diese Arbeit zur weiteren Therapie von B-Zell ALL-Patienten, die eine FLT3-ITD Mutation aufweisen, beitragen?

Durch die Charakterisierung der FLT3-ITD Tumorzellen und deren Signaltransduktion führte die Behandlung der Tumorzellen mit dem FLT3-Inhibitor PKC412 aber auch mit anderen niedermolekularen Inhibitoren für die RAS/RAF/MEK/ERK- und PI3K/AKT- Signalwege zum stark reduzierten Wachstum der leukämischen Zellen *in vitro*. Das trifft auch auf die Behandlung der Tumorzellen mit den dominant negativ wirkenden STAT5-Mutanten zu. Es wurde gezeigt, dass die Signaltransduktion des FLT3-ITD mutierten Rezeptors in akuten

myeloiden Leukämien sich nicht von der in dieser Arbeit vorliegenden akuten lymphatischen Leukämie unterscheiden. Somit können möglicherweise die gleichen Inhibitoren in ALLs eingesetzt werden, wie es zurzeit in AMLs der Fall ist. Alle hier analysierten Signalwege waren für die Proliferation der Tumorzellen wichtig. Dies deutet darauf hin, dass wahrscheinlich die Behandlung der Patienten mit einem Inhibitor und einer klassischen Chemotherapie ausreichen könnte, um das leukämische Tumorwachstum zu stoppen (Levis et al., 2004). Durch die Identifikation verschiedener mit FLT3-ITD kooperierender Mutationen kann in Zukunft eine bessere Therapieform entwickelt werden, die auch auf die sogenannten „zweiten Hits“ im Sinne des Modells von Dash und Gilliland eingeht und so zu einer besseren Prognose für Leukämiepatienten führen könnte.

5 Anhang

5.1 LM-PCR Fragmente aus Experiment 15#6 und 18 #10

Diese LM-PCR wurde mit den DNAs der beiden FLT3-ITD Tumoren durchgeführt. Die in blau gekennzeichneten Daten betreffen Maus #6 aus Experiment 15 und die in rot gekennzeichneten Daten betreffen Maus #10 aus Experiment 18.

Fragment	Größe	Enzym	Chromosom	Gen Information	LTR gefunden
1	1100 b	PstI	Chr2;167,630,958	Ptpn1	Ja
2	650 b	PstI	Chr1:137,182,496	Timm61/Lmod1	Nein
3	500 b	PstI	Chr14:73,304,550	CysLTR2	Nein
4	300 b	PstI	Chr1:52,068,755	STAT4	Ja
5	200 b	PstI	Chr8:125,918,781	MELA	Nein
6	180 b	PstI	Chr5:118,486,822	Hrk	Ja
7	100 b	Csp61	Chr5:118,825,006	repetitive Sequenz	Nein
8	1100 b	PstI	Chr12:16,877,147	zwischen Rock2 und E2F6	Nein
9	480 b	PstI	Chr5:118,826,788	Thrap	Ja
10	300 b	PstI	Chr5:118,727,387	Thrap	Ja
11	900 b	Csp61	Chr12:16,876,565	E2F6 und Rock2	Ja
12	100 b	Csp61	Chr4:14,431,015	Tmem61	Nein

5.1.1 Sequenzdaten der in Experiment 15 und 18 identifizierten Integrationen

STAT4-Integration

Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

STAT4 – Chromosom 1: 52,068,755 

```
TGGCGTTACTTAAGCTAGCTTGCCAAACCTACAGGTGGGGTCTTTCAGGTACCG
TCAAATGCATTCCCTAGAAGATGATGGGCAGATGATTTGTGTCCTTTTTGTGTCC
TAGTCATATATTCTATGGCCTGTTTTTGA CTGAGTAGATGCATTCCTTTTGGTATA
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATTCAAG
GTTTTGGAAATGCATCTCAAAGGCAAAGGAACCATTTTTTTTTCTGGTTTTTATCT
ACTATAAAGGGGAACTTAATGGTTCTGTCTGTAAGTAGCGGCCAGTGTGGATC
TCCCCCTAACTGCNNNTGCCACTAG
```

Integration zwischen den beiden Genen *Ptpn1* und *Cebpb*

Die LTR-Sequenz konnte aufgrund der Sequenzierungsdaten nicht identifiziert werden. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Ptpn1/Cebpb – Chromosom 2: 167,630,958

```
TCCTCAAACCCACACCAGCTTAANTCTGNCCCNCCCNNGGCACCCCCTGNCTG
GGGCCTTTTTATNGGCTGTCCTTCCCGGACATAGNCACTGGGCTTCTCTGGTT
CTGAGCAGGCNTCTGCCTCCCTGCTCTAACATGCTCCCTGAAGCCTTGCCGTCT
CTGTTGAGCCTGTGTTTGCCACGGCTACTGCCCTGTTNGACGCTACAGTTTGA
AGGAGACTATCTCACACCATCCACTGTGGGTTTCGGAAGGGCAGAGACCAGAGT
TCAAGGCGGGCTTGCCAGGTTTGCTGCATGAATAGATGTGGAGTCCACGATAA
GGAAGGAGAGACATGGGTGTCACTGCAGCACAGGCAGGAAGCGCCTGGGCAT
TCCCCTGCCTCCTCGTCTTTGCCTAAGATGGAGCATGGTATGTTAAGTCACTTTG
ATAGGTGAAGCAGGCAAGGTGCCAAGGCTGCCAGCTCATGGTGGCTGAGTTTC
TAGTGTGCACCTATTGGAGTCTGGCCTCCAACATCAAGGTGATGACATGCAGG
GAGCCGGGACAGACTGTTTTGGGATCTGGTT
```

Integration in der Nähe von *Thrap*

Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Thrap Chromosom 5: 118,826,788 bp



```
CCGAACGACCGAGNGCAGNGAGTCANTNAGCGAGNAAGCGGAAGAGNGCCCA
ATACNCAAACCGCCTCTCCCCGNGCGNTGGCCGATTCATTAATGCAGCNGGCA
CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGTGCGCAACGCAATTAATGTGA
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTAT
GTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCA
TGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCAGAGGATCCCAATACTAG
TGGCACAGCAGTTAGGCACACTTATATACAATCACGTAGTCACATACACACTC
AAACACACACACACACACTTGTACAGGTTTTCTATGGCCTTGCCAAGCTGGT
GACATATATTGAAAGACCCACCTGTAGGTTNGGCAAGCTAGCTTAAGNNNACG
CCA
```

Integration zwischen Rock2 und E2F6

Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Rock2/E2F6: Chr.12: 16,877,147

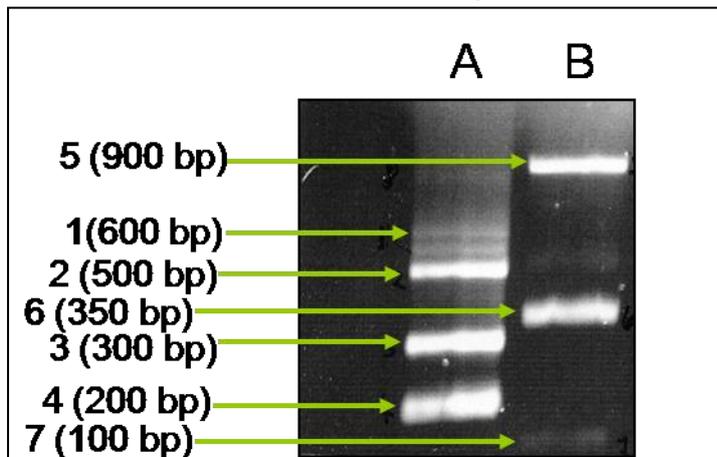
```

TGGTCCAGTTTNTAAANGGGAGAGAGAGGGGGAGTGGGTGGGGCNGGTTTT
GANTTANGGGAATANGGGCTGGGGAAAATGTCTCACNNGNTANGGTGCTTTCC
ATAAAAGCATGAAGACCCGGGTTCAATTAATAAACTANCAATNTAGGCACGGTAT
TTCATGCTGTAATCCCAGTGCTGAAGAGGCAGAGACAGAGAGACTCCTGGAGT
CTGCCTGCTGCCTGGTCAAGTCTAACCTGCTTGGCAAGCTCCAGGCCAATGAGA
GTCTATCTCAAAAAACCAAGGTGGACAGTGCTTGACAAACAACCTGAGGGTGTCC
CTTGGCCTCTACCCGAGAACAAATGGCATGCACAGGAACGTGAAGGCAATGGA
GTCGGGGCACAGACATCCACATTCCTCTAGAAAGGTCTGCTTTCACATAGCAGA
GTTGCTGCTATGCTTTATCGTTCCCATGGTAACACCTACCCCTCTGTTTTAAGAG
AGACNNGCTGTNGGTCCANNGCACTNGGATTCTCTTGGGATCTTGGTTGAAAG
ACCCACNNTNTNGGNNANNNNN

```

➔

5.2 LM-PCR Gelbild aus Experiment 35 #4, #5 und #6



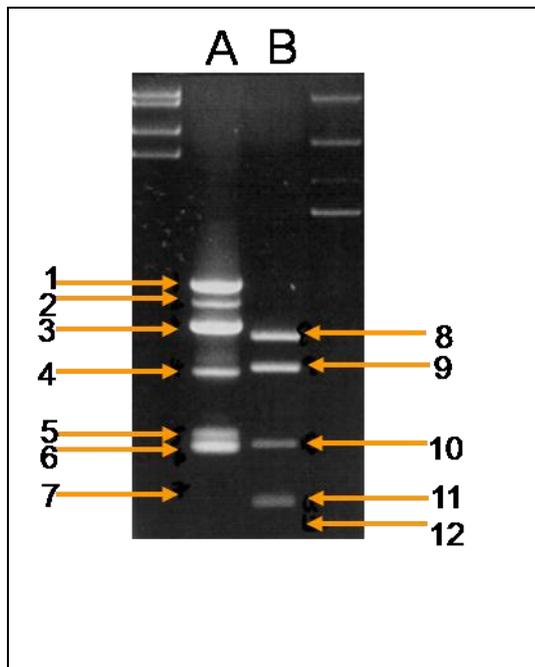
Die Fragmente 1-4 wurden mit dem Enzym PstI geschnitten, die Fragmente 5-7 wurden mit dem Enzym Csp61 geschnitten.

5.2.1 LM-PCR Fragmente aus Experiment 35 #4, #5 und #6

Fragment	Größe	Enzym	Chromosom	Gen Information	LTR gefunden
1	600 b	PstI	Chr4; 148,401,953	Pex14	Nein
2	500 b	PstI	repetitive Sequenzen		Nein
3	500 b	PstI	repetitive Sequenzen		Nein
4	200 b	PstI	Chr7:89, 980,497	Mus musculus adult male testis cDNA	Nein
5	900 b	Csp61	Chr1:52,068,755	STAT4	Ja
6	350 b	Csp61	Chr12:16,586,680	zwischen Rock2 und E2F6	Ja
7	100 b	Csp61	Chr5:118,825,006	repetitive Sequenz	Nein

Die STAT4 Integration ist unter 5.1.1 zu finden.

5.3 Gelbild der LM-PCR von Experiment 20 Maus #11



Fragmentgrößen:

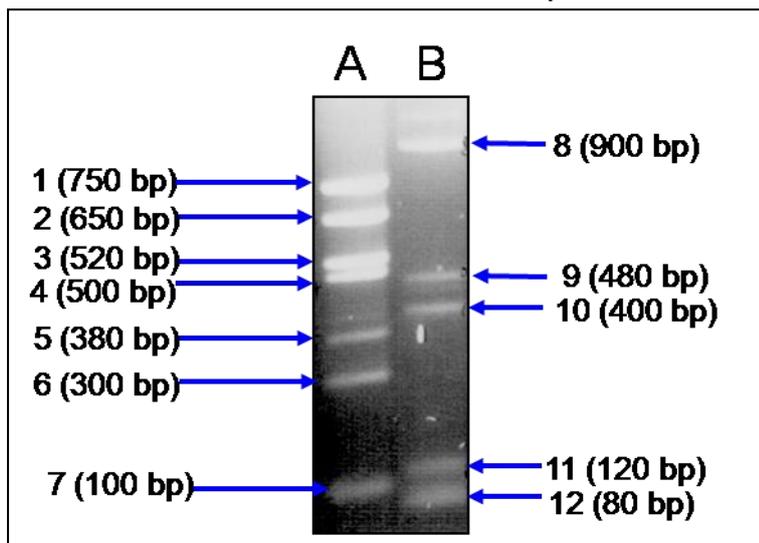
- | | |
|-----------|------------|
| 1: 700 bp | 8: 500 bp |
| 2: 600 bp | 9: 400 bp |
| 3: 500 bp | 10: 300 bp |
| 4: 400 bp | 11: 200 bp |
| 5: 300 bp | 12: 150 bp |
| 6: 200 bp | |
| 7: 100 bp | |

Die Fragmente 1-6 wurden mit dem Enzym PstI geschnitten, die Fragmente 8-12 wurden mit dem Enzym Csp61 geschnitten.

5.3.1 LM-PCR Fragmente aus Experiment 20 #11

Fragment	Größe	Enzym	Chromosom	Gen Information	LTR gefunden
1	700 b	PstI	Chr7: 118,097,851	Mrvi1	Ja
2	650 b	PstI	Chr3:9,832,936	Pag1	Ja
3	550 b	PstI	Chr9;72,314,590	Tex9	Ja
4	500 b	PstI	Chr10:20,803,336	Ahi1	Ja
5	300 b	PstI	Chr7:31,475,745	GAPDH	Nein
6	200 b	PstI	Chr7:31,481834	GAPDH	Nein
7	100 b	Csp61	Chr10:20,803,566	Ahi1	Ja
8	500 b	Csp61	Chr7:123,573,194	Pic3c2a	Nein
9	400 b	Csp61	Chr7:118,097,522	Mrvi1	Ja
10	300 b	Csp61	Chr3:9,832,987	Pag1	Ja
11	200 b	Csp61	Chr2:152,870,000	Xkr7	Nein
12	150 b	Csp61	Chr9:41,279,138	repetitive Sequenz	Nein

5.4 Gelbild der LM-PCR von Experiment 20 Maus #13



Die Fragmente 1-6 wurden mit dem Enzym PstI geschnitten, die Fragmente 8-12 wurden mit dem Enzym Csp61 geschnitten.

5.4.1 Sequenzdaten der in Experiment 20 #11 und #13 identifizierten Integrationen

Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Mrv1 – Chromosom 7: 117,997,350 

```
NAGTCANTNANCGAGGAANCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC
CGCGCGTNGGCCGATTCNTNAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA
AAGCGGNCAGTGAGCGCAAGCGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCA
CCCCAGGATTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
GGATAACAATTTACACACCGGAAACAGCTAGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTG
CAGGTGCGACTCTAGAGGATCCCAATACTGGCACAGCAGTTAGGAGAACGGTCA
TGACAGGCCACTGTCCATCTCTGCTGTCATTAGTGACATCCACTTAGCAGTAATA
GGCGCTTCTGCAAACAGAGCTGAGTGCCACCTTCTTCCCAGAGTGCCAGGTG
TAGTTTGCTGCATGCTCTGAAGCTAGGCTAGCCTGGCTTTTATCCCTATCTGGT
GCACACAGAAGACTATCACCTGGCTGTGAGCCTTCCAGTTGCCTTTAGACTGA
AAGACCCACCTGTAGGTTNGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA
```

Ahi1 – Chromosom 10: 208,033,36 bp 

```
CTACCTTCCCTTGGCATGCTTGTGGGGCCAGCGACCACTGTACAGTTTTAACAG
TCTGTTGCAAGCACAGTGAATGTTTCAGTTTGCCAGACCTGTCATGATAAATTAA
TTACAGGATGTTGAAATGGCCAGGCTCCAGCAGCATCTTGCATGGTTTAATATA
GACCCATTTCCCATTTTTCAATGTATTTTGTGGTTATAAATCCTCAGAAATTATAC
GAGCTGCTATAGACTAGTTTATTACGTAGTCTGCCTGCACACAGGAGAAGTATA
ATAAGAATTTGATGTTCTTAAAGTACGTAAATTTGACTGACATTCCTTTACCACAT
GAGATACTTCACTGCATCAACACAGAGCTCTCAGCACCGTGTGTAGCAGTCAGG
GTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA
```

Pag 1- Chromosom 3: 98,329,36 bp



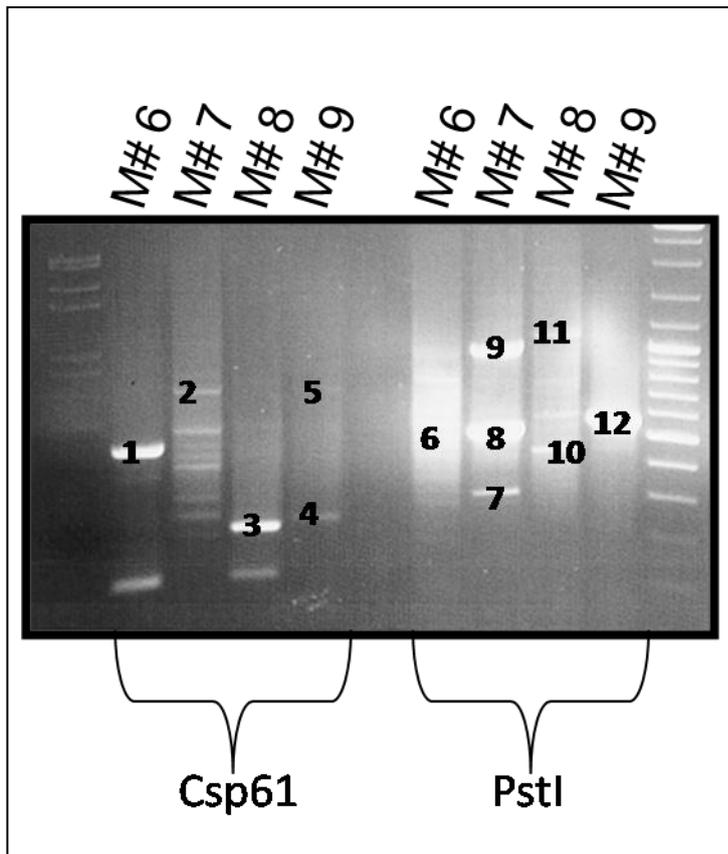
```
GCCNNNAGNNNNNNNTCTAGANGNNNCCCAATACTAGTGGCACAGCAGTTAGG
TACTGGACTGTAAAGGATGGGGCATGGCATTCTGAAGACTCAAGGCTGGAGTCT
AGGGCTGGCTCCTGCCTCTCCCGAATGTGCCAGCTGGAAATGTGCTAGGGGAG
ACAGGTGCTCCGAGGGCATTGGCCCGCCGCTAAATTGCACATTCTGAGTGAAG
GACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA
```

Tex9- Chromosom 9: 723,145,590 bp



```
TAGTGGNNCAGCAGTTAGGGGTGGTTGTGAGCCACATATGAATTCTGCGTACT
GAACCCAGATCCTGTGCAAGAGATCTCAACCTTTGAGCCATCTCTCCAGCTCCA
TTTTCTGTAGTTATTTAAAGTATATAAGCGATACCCAATCTGCCTTTTTTTCCTT
ATTCTCTATGTTGGGTTCAATTTCTTTTTTCTTTTTGAGACAGGGTTTCTCTGTGT
AGCCCTGCTGTCCAGGAACACTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCGAACTCAGA
AATCTGCCTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCTGGGACTAAAGACGTGTGCCACCATT
GCCTGGCCAACCTTCTTTTTTCAATTTTTTCTTTTGTTAATTTTTCCACATGGACAT
GGAAACTGCACTGAAGCTTTTCTTCTGTCTACTGNAAGAACTTACCTGGAAACT
TTATTGCGTGTATTCTGTTGGCTACTTCTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGC
AAGCTAGCTTAAGTAACGCC
```

5.5 Gelbild der LM-PCR aus Experiment 42



Fragmentgrößen:

1: 500 bp	8: 500 bp
2: 800 bp	9: 1000 bp
3: 200 bp	10: 400 bp
4: 250 bp	11: 1100 bp
5: 700 bp	12: 600 bp
6: 550 bp	
7: 300 bp	

Die Fragmente 1-5 wurden mit dem Enzym PstI geschnitten, die Fragmente 6-12 wurden mit dem Enzym Csp61 geschnitten.

5.5.1 LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #6

Fragment	Größe	Enzym	Chromosom	Gen	LTR gefunden
1	450bp	Csp61	chr12:71,450,090	Trim19	Ja
2	750bp	PstI	chr14:119,551,65	Hs6st3	Nein

5.5.1.1 Sequenzdaten der *Trim19* Integration aus Experiment 42 Maus #6

Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Trim19-Chromosom12:71,450,090bp 

```

GTGTGGGAGGAAAATTCACATTGTTATTTAAACTATGTTAGTCACAGATCCTAC
AGGGTTTATTCTAACCCACATTTAATTAGTTGAGACCGGAGCTGCTAATGTTA
TATGCAGTCCGTTTATAGGCAAAGTGTTTCTTAAGATTTGATTGGGGCATCATCT
ATATTAGTGCAGGATATATGACTATTAGTCCAAAGACACTTTGCTCATGTTAA
GTAGTTAATTCTTAAGAAGAAAGGGGCATCCATGCCCTGTGTATGTTACAATCCT
TTCGTGTATTTTGTATTCACCTGCGCAAGTCAGAGAAACCTTGGCTAGCAAAGTA
AAGAGTCATTCTTCCAAGTCTGGGTTTTGCCTGAAAGACCCACCTGTAGGTT
NGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA

```

5.5.2 LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #7

Fragment	Größe	Enzym	Chromosom	Gen	LTR gefunden
1	750bp	Csp61	chr5:124,501,431	Abcd9/Vsp37b	ja
2	300bp	PstI	chr10:86,255,040	repetitiv	nein
3	950bp	PstI	chr15:81,688,769	Tob2	ja

5.5.2.1 Sequenzdaten der Integrationen aus Experiment 42 Maus #7

Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Tob2- Chromosom 15: 81,689,340 bp 

```
GCCACGTCCTCAGCGGGGCTGCTCACCCCTCGGAATCCTTNTGAGCGCCTTAGC
GCCGGATTTCTTCCCTTAAGACTCCAAAGCAGTCTGAGCTCGCCATGTACGTTT
TTTCTTTTTTTAAACCGGTGTAGAGCCTCCCGGGGAGGGTAGGGACAGACCTGG
AACACAACAGGCCATTAGGAAGTAGCCTGGGACACAGTGGCTGTTGCTGGCAT
CACCGGGGCCCTGAGAACTCCAAACCCTAGCCCCAGCTCTCAAAGTTCCCTAA
GACCTAGACGGCATGACTCTTCAGTTTTGACGGTCCCGTGACTTGAACCCCGG
GTCCCGATTTGTTCAATTCTGAATTTGGGGAGACAGTGGCACGATGCCACCACCA
GGAAGTCTGATCTGAGTGTAGGCTAACCTGTGAAGACCCACCTGTAGG
TTNGGCAAGCTAGCTTAAGNAACGCCA
```

Abcd9/Vsp37b:Chromosom 5: 71,450,090

```
GCCTGCAGGNNACTCTAGAGGNNNCCCAATACTAGTGGCACAGCAGTTAGGT
ACGCATTCTACATCTGCCGGAAGAGCTACAAGGTGGGCGCTCGCAGACTCTT
CTGTGTATGCAGTGGAAAAGAGTTCACGCCAGAGCATGGACTGCTTCTAAACTA
CGCAAGGGAGAGAGGCAGACACTAAGGCACTAGGCACAGAAAGTCACATATCC
TAGGACTGCCTCCGCCACCACCTCCCCGACCTCCACCCACCCCAACCCTCA
TCAACGCATCCTTCATACCTCCAGGGCAGAGGACAGAACCCAGGGCCTTGAA
CATACTAGGCAAGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTGGAGACAGTTTTTCTGTG
TTGCTAGCCCTGGTGGTCTTTGAACTCCATAAAACAGGTTGGTCTCAAATTCACA
GAGATCCTCCTGCCTCTGCTCCTGANTACTGGGATTAAAGATGTGTGCTACCAC
CAGTTTGGGCCNATTTGTTTTGNNTGGAGATAGTGAAGANCCACCTGTAGG
TTTGGCAAGCTAGCNTNNNTAACGCCA 
```

5.5.3 LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #8

Fragment	Größe	Enzym	Chromosom	Gen	LTRgefunden
1	250bp	Csp61	chr2:18,877,153	Pip4k2a	Ja
2	450bp	PstI	chr15:4,501,915	Plcx3	Ja
3	1100bp	PstI	chr16:37,971,232	Gpr156	Nein

5.5.3.1 Sequenzdaten der Integrationen aus Experiment 42 Maus #8

Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Pip4K2A – Chromosom 2: 18,877,153 bp

NNNNNNNNTCGGNCNCCGGGGNTCCNATACTAGTGGCACAGCAGTTAGGGCA
 CAGAGACCTAGACAGGTAGACAGGGAGATCAGGACCAACAGACTGGAAGTGTG
 GGGTGCTTTTTCAAGTTTAAGGAACTCAAACCTGAGTCAAGCGGACTTTGGGAT
 GTCTTTCTCTAAAACGCTGTCAAACCTGGAGAGAGAGAATGTCAACCCAAT**TGAAA**
GACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA 

Plcx3–Chromosom15:4,501,915bp

CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCT
 ATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCC
 AAGACTAGTGGCACAGCAGTTAGGAGCCGCCAGCACAGTGGTCGATCGAGGG
 GGGGCCCGCGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGCCCAGGCT
 CTAGTTTTAACTCAACAATCTCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGA
 TAGAATAAAAGATTTTTATTTAGTCTCCAGAAAAGGGGGGAA**TGAAGACCCAC**
CTGTAGGTTNGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCA

5.5.4 LM-PCR Fragmente aus Experiment 42 Maus #9

Fragment	Größe	Enzyme	Chromosom	Gene	LTR gefunden
1	260bp	Csp61	chr5:110,330,262	repetitiv	Nein
2	750bp	Csp61	chr2:169,623,131	Tshz2	Nein
3	550bp	PstI	chr1:89,752,631	Dgkd	Ja

5.5.4.1 Sequenzdaten der *Dgkd* Integration aus Experiment 42 Maus #9

Dgkd – Chromosom 1: 89,752,631 bp

```
CNTNNNNNCTCGNNNNCCGGGGNTCCNATACTAGTGGCACAGCAGTTAGGGTA
GCCTCAACTGACCTGGAACCTATTTTATAAACCAGGCCGGCCTCAAACCTCAGAG
ATCTGCCTGCCTCTACCTCCCAAGTGTTGGAATAAAAGTCATGAGCCACCACAC
CCTGAAGAAATGTTTATATTTTTGATGTCAAATGTAAAGTGTTTTTTTTTTTCCTT
TGCGAAATGAAAAGTAACAGAAAGTAAGTAAAGGGATCAGGTTTTATTTTTATTT
TAGTGTTTGGAGGGAAATGGTTTCATGTAGTCCAGGCTGGCCTTGAACCTAGCAG
TGCAGCTGAGCGTGACCTTGACCTTTTGATCTTTTGTGCTACCTCCTGAGTATAT
GCTATATGCCCTACCTCCTGAGTATATGCTATATGCCCTACCTCCTGAGTATGTG
CTATATGCCCTACCTCCTGAGTATATGCTATATGCCCTACCTCCTGAGTATATGC
TATATGCCCTGCCACGCCTAGTTTTTGCAATCCTGAAAATTGAATTCNNNTGAAA
NACCCACCTGTAGGTTTGGCNAGCTAGCTNNNNNACGCCA
```



Die LTR-Sequenz ist in rot gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die Orientierung des Provirus. Die genaue Position der Integration ist in der ersten Zeile angegeben.

Literaturverzeichnis

Abu-Duhier, F.M., Goodeve, A.C., Wilso, G.A. et al. (2001) Identification of novel FLT3 Asp835 Mutations in adult acute myeloid leukemia. *Br J Hematol.* 113, 983-8.

Adolfsson J., Mannson R., Buza-Vidas N., Hultquist A., Liuba K., Jensen C., Bryder D., Yang L., Borge O., Thoren L., Anderson K., Sitnicka E., Sasaki Y., Sigvardsson M. und Jacobsen S.(2005) Identification of FLT3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential. A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121:295-306.

Agnes F., Shamon B., Dinac A. et al. (1994) Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: Exon/Intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*. 145,283-288.

Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T., Willems, G.M. (1990) Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 265 (9), 4923-8.

Antl, M., von Brühl, M.L., Eiglsperger, C., Werner, M., Konrad, I., Kocher, T., Wilm, M., Hofmann, F., Massberg, S., Schlossmann, J. (2007). IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*. 109(2), 552-9.

Armstrong, S.A., and Look, A.T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23, 6306-6315.

Armstrong, S.A., Kung, A., Mabon, M. et al. (2003). Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 3, 173-183.

Bacher, U., Kern, W., Schoch, C., Schnittger, S., Hiddemann, W., Haferlach, T. (2006). Evaluation of complete disease remission in acute myeloid leukemia: a prospective study based on cytomorphology, interphase fluorescence in situ hybridization, and immunophenotyping during follow-up in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 4, 839-47.

Bankovich, A.J., Raunser, S., Juo, Z.S., Walz, T., Davis, M.M., and Garcia, K.C. (2007). Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science* 316, 291-294.

Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, Shochat C, Cazzaniga G, Biondi A, Basso G, Cario G, Schrappe M, Stanulla M, Strehl S, Haas OA, Mann G, Binder V, Borkhardt A, Kempinski H, Trka J, Bielorei B, Avigad S, Stark B, Smith O, Dastugue N, Bourquin JP, Tal NB, Green AR, Izraeli S. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* 372 (9648):1448-50.

Beyer, W.R., Westphal, M., Ostertag, W., and Von Lear, D. (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* 76, 1488-1495.

Bos, J.L., Verlaan-de Vries, M., van der Eb, A.J., Janssen, J.W., Delwel, R., Löwenberg, B., Colly, L.P. (1987). Mutations in N-ras predominate in acute myeloid leukemia. *Blood*. 69(4):1237-41.

Bowen, D.T., Frew, M.E., Hills, R., Gale, R.E., Wheatley, K., Groves, M.J., Langabeer, S.E., Kottaridis, P.D., Moorman, A.V., Burnett, A.K., Linch, D.C. (2005), RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*. 106(6), 2113-9.

- Brandts, C.H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwäble, J., Buerger, H., Müller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M., Berdel, W.E., Serve, H. (2005). Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Research* 65 (21), 9643-50.
- Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi, L., Naldini, L. (2006). Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12 (5), 585-91.
- Brown, P., Meshinchi S., Levis S. et al. (2004). Pediatric AML primary samples with FLT3/ITD mutations are preferentially killed by FLT3-inhibition. *Blood* 104, 1841-1849.
- Brown, P., Small, D. (2004). FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer. *Eur J Cancer* 40 (5), 707-21.
- Cao X., Shores, E.W., Hu-Li, J., Anver, M.R., Kelsall, B.L., Russel, S.M., Drago, J., Noghuchi, M., Grinberg A., Bloom, E.T., et al. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 3: 223-38.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.W., Zeckner, D.J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.H., Blanchard, K.L., Thomas, J.E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 448 (7152), 439-44.
- Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Böhmer, F.D., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., Serve, H. (2007). Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 110 (1), 370-4.
- Choudhary, C., Müller-Tidow, C., Berdel, W.E., Serve, H. (2005). Signal transduction of oncogenic Flt3. *Int J Hematol* 82 (2), 93-99.
- Christiansen, D.H., Andersen, M.K., Desta, F., Pedersen-Bjergaard, J. (2005). Mutations of genes in the receptor tyrosine kinase (RTK)/RAS-BRAF signal transduction pathway in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 12, 2232-40.
- Darnell J.E. Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* . 277, 1630-1635.
- Davies, M.A., Kim, S.J., Parikh, N.U., Dong, Z., Bucana, C.D., Gallick, G.E. (2002). Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 8(6), 1904-14.
- Den Boer, M.L., van Slegtenhorst, M., De Menezes, R.X., Cheok, M.H., Buijs-Gladdines, J.G., Peters, S.T., Van Zutven, L.J., Beverloo, H.B., Van der Spek, P.J., Escherich, G., Horstmann, M.A., Janka-Schaub, G.E., Kamps, W.A., Evans, W.E., Pieters, R. (2009) A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* 2: 125-134.
- Dias, S., Silva, H. Jr., Cumano A., Vieira, P. (2005). Interleukin 7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* 201 (6):971-979.
- DiSanto, J.P., Certain S., Wilson A., MacDonald H.R., Avner P., Fischer A., de Saint Basile G. (1994) The murine interleukin-2 receptor gamma chain gene: organization, chromosomal localization and expression in the adult thymus. *Eur J Immunol* 12, 3014-8.

- Elefanty, A.G., Cory, S. (1992). Hematologic disease induced in BALB/c mice by a bcr-abl retrovirus is influenced by the infection conditions. *Mol Cell Biol.* 4, 1755-63.
- Elefanty, A.G., Hariharan, I.K., Cory, S. (1990). Bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukemia in man, induces multiple haematopoietic neoplasms in mice. *EMBO J.* 4, 1069-78.
- Fehse, B., Kustikova, O. S., Bubenheim, M., Baum, C. (2004). Pois(s)on--it's a question of dose... *Gene Ther* 11(11), 879-881.
- Feldhahn, N., Henke, N., Melchior, K., Duy, C., Soh, B.N., Klein, F., von Levetzow, G., Giebel, B., Li, A., Hofmann, W.K., Jumaa, H., Müschen, M. (2007). Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med.* 204(5), 1157-66.
- Fiedler, W., Serve, H., Dohner, H., et al. (2005). 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* 105, 986-993.
- Fleming, H.E., Paige, C.J. (2001). Pre-B cell receptor signaling mediates selective response to IL7 at the pro-B to pre-B cell transition via an ERK/MAP kinase dependent pathway. *Immunity* 4, 521-31.
- French D., Yang W., Cheng C., Raimondi S.C., Mullighan C.G., Downing J.R., Evans W.E., Pui C.H., Relling M.V. (2009). Acquired variation outweighs inherited variation in whole genome analysis of methotrexate polyglutamate accumulation in leukemia. *Blood* 113 (19), 4512-20.
- Fritsch, R. M., Saur, D., Kurjak, M., Oesterle, D., Schlossmann, J., Geiselhöringer, A., Hofmann, F., Allescher, H. D. (2004). InsP3R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle. *J Biol Chem.* 279 (13), 12551-12559.
- Fuxa , M., Skok, J.A (2007) Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol* 19, 129-136.
- Gilliland, D.G., and Tallman, M.S. (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 1, 417-420.
- Gilliland, D.G., Jordan, C.T., and Felix, C.A. (2004). The molecular basis of leukemia. *Hematology* 2004, 80-97.
- Goetz,C.A., Harmon, I.R., O'Neil, J.J., Burchill, M.A., Farrar, M.A. (2004) STAT5 activation underlies IL7 receptor-dependent B cell development. *J Immunol* 172 (8), 4770-8.
- Grassot, J., Mouchiroud, G., Pierrère, G. (2003). RTKdb: database of Receptor Tyrosine Kinase. *Nucleic Acids Res.* 31 (1), 352-8.
- Gregorj, C., Ricciardi, M.R., Petrucci, M.T., Scerpa, M.C., De Cave, F., Fazi, P., Vignetti, M., Vitale, A., Mancini, M., Cimino, G., Palmieri, S., Di Raimondo, F., Specchia, G., Fabbiano, F., Cantore, N., Mosna, F., Camera, A., Luppi, M., Annino, L., Miraglia, E., Fioritoni, G., Ronco, F., Meloni, G., Mandelli, F., Andreeff, M., Milella, M., Foà, R., Tafuri, A.; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. (2007). ERK1/2 phosphorylation is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 109 (12), 5473-6.
- Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C., and Duyster, J. (2005). Flt3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 105, 4792-4299.

- Grundler, R., Thiede, C., Miething, C., Steudel, C., Peschel, C., and Duyster J. (2003). Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activation mutations off the FLT3 receptor. *Blood* 102, 646-651.
- Guo B., Kato, R.M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M.I., Rawlings, D.J. (2000) Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex, *Immunity*, 13:243-253.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K.(2007) The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage *Immunity*. 26: 703-714.
- Hata, K., Nishijima, K., Mizuguchi, J. (2007). Role of BTG1 and BTG2 in growth arrest of WEHI-231 cells through arginine methylation following membrane immunoglobulin engagement. *Exp Cell Res* 313 (11), 2356-66.
- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., and Naoe, T. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 19, 624-631.
- Hendriks, R:W., and Kersseboom, R. (2006). Involvement of SLP-65 and BTK in tumor suppression and malignant transformation of Pre-B cells. *Semin Immunol* 18, 67-76.
- Herzog S., Reth M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 9;195-205.
- Holmes, M. L., Carotta, S., Corcoran, L. M., and Nutt S. L. (2006). Repression of FLT3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev*. 20,933-938.
- Holmes, M.L., Pridans, C., Nutt, S.L. (2007). The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol*. 86(1), 47-53.
- Horn, S., Bergholz, U., Jücker, M., McCubrey, J.A., Trümper, L., Stocking, C., Bäsecke, J. (2008). Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells. *Oncogene*. 27(29), 4096-106.
- Hsu, S., Schmid, A., Sternfeld, L., Anderie, I., Solis, G., Hofer, H.W., Schulz, I. (2003). Tyrosine phosphatase PTP1b modulates store-operated calcium influx. *Cell Signal*. 15(12), 1149-56.
- Huse, M., Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*. 109 (3), 275-82.
- Iacobucci, I., Lonetti, A., Cilloni, D., Messa, F., Ferrari, A., Zuntini, R., Ferrari, S., Ottaviani, E., Arruga, F., Paolini, S., Papayannidis, C., Piccaluga, .P.P., Soverini, S., Saglio, G., Pane, F., Baruzzi, A., Vignetti, M., Berton, G., Vitale, A., Chiaretti, S., Müschen, M., Foà, R., Baccarani, M., Martinelli, G. (2008) Identification of different Ikaros cDNA transcripts in Philadelphia-positive adult acute lymphoblastic leukemia by a high-throughput capillary electrophoresis sizing method. *Hematologica* 12, 1814-21.
- Ilaria, R.L. Jr. (2004), Tyrosine Kinases in AML: where do they fit in? *Leuk Res*. 28 (3), 217-8
- Joung, Y. H., Lim, E.J., Lee, M. Y., Park, J. H., Ye, S. K. , Park, E. U., Kim, S. Y., Zhang, Z., Lee, K. J., Park, D. K., Park, T., Moon, W. K., Yang, Y. M. (2005). Hypoxia activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/STAT5b pathway in breast cancer cells. *Exp Mol Med* 37(4), 353-364.
- Julien, S. G., Dubé, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y., Kennedy, B. P., Muller, W. J., Tremblay, M. L. (2007). Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet* 39(3), 338-346.

- Katsura Y. (2002) Redefinition of lymphoid progenitors., *Nat Rev Immunol*, 2:127-132.
- Kawamoto H., Katsura Y. (2009) A new paradigm for hematopoietic cell lineages revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol* 5, 193-200.
- Kelly, L., Yu, J., Boulton, C., et al. (2002). CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell*. 1, 421-432.
- Kikuchi., Lai A.Y., Hsu, C.L., Kondo, M. (2005) IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in human B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med*. 210 (8): 1197-203.
- Kim ,H.G., Kojima, K., Swindle, C.S., Cotta, C.V., Huo, Y., Reddy, V., Klug, C.A. (2009). FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia. *Blood* 111(3), 157-74.
- Kim, H.-G., Kojima, K., Swindle, C.S., Cotta, C.V., Huo, Y., Reddy, V., and Klug, C.A. (2008). FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 1567-1574.
- Kiyoi, H., Ohno, R., Ueda, R., Saito, H., and Naoe, T. (2002). Mechanism of konstitutiv activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrandomain. *Oncogene* 21, 2555-2563.
- Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H., Naoe, T. (1998) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 9, 1333-7.
- Ko, R.M., Kim, H.G., Wolff, L., Klug, C.A. (2008) Roles of p15Ink4b and p16Ink4a in myeloid differentiation and RUNX1-ETO-associated acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 32 (7), 1101-11.
- Lancet JE, Karp JE. Farnesyltransferase inhibitor in hematologic malignancies: new horizons in therapy. *Blood* 2003; 102, 3880-3889.
- Lassoued, K., Nunez, C.A., Billips L., et al.(1993) Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage of human Pro-B cells. *Cell* 73, 73-86.
- Lavagna-Sévenier, C., Marchetto, S., Birnbaum, D., Rosnet, O. (1998) The CBL-related protein CBLB participates in FLT3 and interleukin-7 receptor signal transduction in pro-B cells. *J Biol Chem* 273 (24), 14962-7.
- Le Bien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B Lymphocytes: how they develop and function, *Blood* 112,1570-1580.
- LeBien, T. W. (1998) B-cell lymphopoiesis in mouse and man. *Curr Opin Immunol*.10, 188-195.
- Lee, B.H., Tothover, Z., Levine, R.L., Anderson, K., Buza-Vidas, N., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Adelsperger, J., Frohling, S., Huntly, B.J.P., et al. (2007). Flt3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Cell* 12, 367-380.
- Levis, M., Allebach, J., Tse, K., et al. (2002). A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*. 99, 3885-3891.
- Levis, M., Tse, K., Smith, B., Garret, E., Small, D. (2001).A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selective cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations. *Blood* 98, 885-887.
- Li, W., Kessler, P., Yeger, H., Alami, J., Reeve, A. E., Heathcott, R., Skeen, J., Williams, B. R. (2005). A gene expression signature for relapse of primary wilms tumors. *Cancer Res*. 65(7), 2592-2601.

- Lin, H., and Grosschedel, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376, 263-267.
- Lyman S.D., James L., Vanden Boss T. et al.(1993). Molecular Cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells *Cell* 75, 1157-1167.
- Makris, A., Patriotis, C., Bear, S. E., Tsiachlis, P. N. (1993). Genomic organization and expression of Tpl-2 in normal cells and Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: activation by provirus insertion. *J Virol* 67(7), 4283-4289.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 6, 459-65
- Martelli, A.M., Nyåkern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P.L., Evangelisti, C., Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 20(6), 911-28.
- Matsumura, I., Mizuki, M., Kanakura, Y. (2008) Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies. *Cancer Sci*. 3, 479-85.
- Medina, K.L., and Singh, H. (2005), Genetic networks that regulate B-lymphopoiesis. *Curr Opin Hematol* 12, 202-209.
- Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jamson, B., and Rolink, A., (2003). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* 14, 60-68.
- Meshinchi, S., Stirewalt, D.L., Alonzo, T.A., Boggon, T.J., Gerbing, R.B., Rocnik, J.L., Lange, B.J., Gilliland, D.G., and Radich, J.P. (2008). Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood* 111, 4930-4933.
- Milella, M., Konopleva, M., Precupanu, C.M., Tabe, Y., Ricciardi, M.R., Gregorj, C., Collins, S.J., Carter, B.Z., D'Angelo, C., Petrucci, M.T., Foà, R., Cognetti, F., Tafuri, A., Andreeff, M. (2007). MEK blockade converts AML differentiating response to retinoids into extensive apoptosis. *Blood* 109 (5), 2121-9.
- Milne, C.D., and Paige, C.J. (2006). IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol* 18, 20-30.
- Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B, Ye M, Graf T, Weissman IL, Akashi K.(2002) Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell* 3: 137-47.
- Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Muller, C., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., et al. (2000). Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96, 3907-3914.
- Mizuki, M., Ueda, S., Matsumura, I., et al. (2003) Oncogenic receptor tyrosine kinase in leukemia. *Cell Mol Biol* 49, 907-922.
- Morgan, M.A., Granser, A., Reuter, C.W. (2003). Therapeutic efficacy of prenylation inhibitors in the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*. 17(8), 1482-98.
- Mullighan, C.G., (2009) Genomic analysis of acute leukemia. *Int J Lab Hematol*. 4, 384-97.
- Mullighan, C.G., Downing, J. (2008) Ikaros and acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 5, 847-9.

- Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.W., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., et al. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 446, 758-764.
- Murata, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Tamitsu, K., Irie, M., Nakajima, H., Suzu, S., Shibuya, M., Kamihira, S., Nosaka, T., Asano, S., Kitamura, T. (2003). 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* 278, 32892-8.
- Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., et al. (1997) The Ig α /Ig β heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity*;7:559-570.
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T., Misawa, S. (1996). Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 12, 1911-8.
- Nebral K., Denk D., Attarbaschi A., König M., Mann G., Haas O.A., Strehl S. (2009) Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1, 134-43.
- Niuro, H. and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2, 945-956.
- Nutt, S.L., and Kee, W.L. (2007). The transcriptional regulation of B-cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715-725.
- Olsen, R.J., Dunphy, C.H., O'Malley, D.P., Rice, L., Ewton, A.A., Chang, C.C. (2008) The implication of identifying JAK2 (V617F) in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis. *J Hematop* 1(2), 111-7.
- Ono, RR., Nakayima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2005). Dimerization of MLL-fusionproteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis. *J Clin Invest* 115, 919-929.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273: 242-5.
- Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 100 Suppl 1: 11842-9.
- Paulsson, K., Horvat, A., Strömbeck, B., Nilsson, F., Heldrup, J., Behrendtz, M., Forestier, E., Andersson, A., Fioretos, T., Johansson, B. (2008). Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 47 (1), 26-33.
- Pear, W.S.; Nolan, G.P., Scott, M.L., and Baltimore, D.(1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-8396.
- Platanias, L.C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 101(12), 4667-79.
- Poincloux, R., Cougoule, C., Daubon, T., Maridonneau-Parini, I., Le Cabec, V. (2007). Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells. *J Cell Physiol* 213 (1), 212-220.

- Pracells, B.W., Ikeda, A.K., Simms-Waldreip, T., Moore, T.W., and Sakamoto, K.N. (2006). FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem cells* 24, 10174-1184.
- Prassolov, V., Meyer, J., Brandenburg, G., Hannemann, J., Bergemann, J., Ostertag, W., Stocking, C. (2001) Functional identification of secondary mutations inducing autonomous growth in synergy with a truncated interleukin-3 receptor: implications of multistep oncogenesis. *Exp Hematol.* 29(6),756-65.
- Rane S.G., Reddy E.P.(2002). JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*; 21, 3334-58.
- Renneville, A., Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaudx, P., and Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: A review of the literature. *Leukemia* 22, 915-931.
- Rocnik, J. L., Okabe, R., Yu, J.-C., Lee, B. H., Giese, N., Schenkein, D. P., and Gilliland, D. G. (2006). Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 108, 1339-1345.
- Rosnet O., Schiff C., Pebusque M.J. et al. (1993). Human FLT3/FLK2 gene: CDNA cloning and expression in hematopoietic cells *Blood* 82:1110-1119.
- Santoro, A., Bica, M.G., Dagnino, L., Agueli, C., Salemi, D., Cannella, S., Veltroni, M., Cetica, V., Giarin, E., Fabbiano, F., Basso, G., Arico, M. (2009). Altered mRNA expression of PAX5 is a common event in acute lymphoblastic leukemia. *Br J Hematol.* 2009 Jul 13 E pub.
- Sanz, E., de la heras A. (1996) A Novel anti-Vpre-B-antibody identifies immunoglobulin-surrogate receptors on the surface of human pro-B cells. *J Exp. Med* 183:2693-2698.
- Scheeren, F. A., Diehl, S. A., Smit, L. A., Beaumont, T., Naspetti, M., Bende, R. J., Blom, B., Karube, K., Ohshima, K., van Noesel, C. J., Spits, H. (2008). IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* 11(9), 4706-4715.
- Schessl, C., Rawat, V.P., Cusan, M., Deshpande, A., Kohl, T.M., Rosten, P.M., Spiekermann, K., Humphries, R.K., Schnittger, S., Kern, W., et al. (2005). The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* 115, 2159-2168.
- Schmidt M, Hoffmann G, Wissler M, Lemke N, Müssig A, Glimm H, Williams DA, Ragg S, Hesemann CU, von Kalle C.(2001). Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther* 12 (7), 743-9.
- Schmidt-Arras, D., Böhmer, S.A., Koch, S., Müller, J.P., Blei, L., Cornils, H., Bauer, R., Korasikha, S., Thiede, C., Böhmer, F.D. (2009). Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood* 113 (15), 3568-76.
- Schwieger M., Lohler, J., Friel, J., Scheller, M., Horak, I., and Stocking, C. (2002). AML1-ETO inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency. *J Exp Med* 196, 1227-1240.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Berns, A. (1985). Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. *EMBO J* 4(7), 1793-1798.
- Selten, G., Cuypers, H. T., Boelens, W., Robanus-Maandag, E., Verbeek, J., Domen, J., van Beveren, C., Berns, A. (1986). The primary structure of the putative oncogene pim-1 shows extensive homology with protein kinases. *Cell* 46(4), 603-611.

- Shaughnessy, J. D. Jr, Largaespada, D. A., Tian, E., Fletcher, C. F., Cho, B. C., Vyas, P., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (1999). Mrvi1, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1. *Oncogene* 18, 2069-2084.
- Shimada, A., Taki, T., Tabuchi, K., Tawa, A., Horibe, K., Tsuchida, M., Hanada, R., Tsukimoto, I., Hayashi, Y. (2006). KIT mutations, and not FLT3 internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 5, 1806-09.
- Shiokawa, S., Mortari, F., Lima, J.O., et al. (1999) IgM heavy chain complementarity-determining region 3 diversity is constrained by genetic and somatic mechanisms until two month after birth. *J Immunol* 162, 6060-6070.
- Siemiątkowska, A., Bieniaszewska, M., Hellmann, A., Limon, J. (2009). JAK2 and MMPL gene mutations in V617F-negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res. Epub*
- Sitnicka, E., Buza-Vidas, N., Larsson, S., Nygren, J.M., Liuba, K., and Jacobsen, S.E. (2003). Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express Flt3: Distinct Flt3 and c/Kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* 102, 881-886.
- Small, D.(2006). FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 178-184.
- Smith, B., Levis, M., Beran M., et al. (2004). Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 103, 3669-3676.
- Sternberg D.W., Thomasson M.H., Carrol M. et al. (2001) The TEL/PDGFBetaR fusion in chronic myelomonocytic leukemia signals through STAT5-dependent and STAT5-independent pathways. *Blood* 98, 3990-3997.
- Stirewalt, D.L., Kopecky, K.J., Meshinchi, S., Engel, J.H., Pogossova-Agadjanyan, E.L., Linsley, J., Slovak, M.L., Willman, C.L., and Radich, J.P. (2006). Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 107, 3724-3726.
- Stone, R., DeAngelo, D., Klimek, V. et al. (2005). Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation of FLT3 respond to a small molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412, *Blood* 105, 54-60.
- Stubbs, M.C., Kim, Y.M., Krivtsov, A.V., Wright, R.D., Feng, Z., Agarwal, J., Kung, A.L., and Armstrong, S.A. (2008). MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia* 22 (1), 66-77.
- Szymanska, H., Sitarz, M., Krysiak, E., Piskorska, J., Czarnomska, A., Skurzak, H., Hart, A.A., De Jong, D., and Demant, P. (1999), Genetics of susceptibility to radiation-induced lymphomas, leukemias and lung tumor studied in recombined congenic strains. *Int J Cancer* 83, 674-678.
- Takahashi, S. (2006) Inhibition of MEK/MAPK signal transduction pathway strongly impairs the growth of FLT3-ITD cells. *Am J Hmatol* 81, 154-155.
- Taketani, T., Taki, T., Sugita, K., Furuichi, Y., Ishii, E., Hanada, R., Tsuchida, M., Ida, K., and Hayashi, Y. (2004). FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* 103, 1085-1088.

- Tefferi A., Dewald G.W., Litzow M.L., Cortes J., Mauro M.J., Talpaz M. Kantarjian H.M. (2005) Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 3, 290-402.
- Tenen, D.G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2, 89-101.
- Terriou, L., Ben Abdelali, R., Roumier, C., Lhermitte, L., de Vos, J., Cornillet, P., Nibourel, O., Beldjord, K., Dombret, H., Leverger, G., Asnafi, V., Preudhomme, C., Macintyre, E. (2009). C/EBPA methylation is common in T-ALL but not in M0 AML. *Blood* 113(8), 1864-1866.
- Tonks, N. K., Muthuswamy, S. K. (2007). A brake becomes an accelerator: PTP1B-a new therapeutic target for breast cancer. *Cancer Cell*. 11(3), 214-216.
- Trageser, D., Iacobucci, I., Nahar, R., Duy, C., von Levezow, G., Klemm, L., Park, E., Schuh, W., Gruber, T., Herzog, S., Kim, Y.M., Hofmann, W.K., Li, A., Storlazzi, C.T., Jäck, H.M., Groffen, J., Martinelli, G., Heisterkamp, N., Jumaa, H., Müschen, M. (2009). Pre-B cell receptor-mediated cell cycle arrest in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia requires IKAROS function. *J Exp Med*. 206(8), 1739-53.
- Van Etten, W.J., Steen, R.G., Nguyen, HH., Castle, A.B., Slonim, D.K., Ge, B., Nusbaum, C., Schuler, G.D., Lander, E.S., Hudson, T.J. (1999). Radiation hybrid map of the mouse genome. *Nat Genet*. 22(4), 384-7.
- Van Meter, M.E., Diaz-Flores, E., Archad, J.A., Passegue, E., Irish, J.M., Kotecha, N., Nolan, G.P., Shannon, K., Braun, B.S. (2007). K-RasG12D expression induces hyperproliferation and aberrant signaling in primary hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 109(9), 3945-53.
- Venkitaraman A.R., Cowling R.J. (1994) Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol kinase-3 with the alpha chain of the Interleukin-7 receptor. *Eur J Immunol* 9, 2168-74.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W.(2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799
- Vosshenrich, C.A., Cumano, A., Muller, W., Di Santo, J.P., and Vieira P., (2003). Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B-cell development. *Nat Immunol* 4, 773-779.
- Wahlstrom, A.M., Cutts, B.A., Liu, M., Lindskog, A., Karlsson, C., Sjogren, A.K., Andersson, K.M., Young, S.G., Bergo, M.O. (2008). Inactivating Icm1 ameliorates K-RAS-induced myeloproliferative disease. *Blood* 112(4), 1357-65.
- Wang, C.L., Wang, B.B., Bartha, G., Li, L., Channa, N., Klinger, M., Killeen, N., Wabl, M. (2006), Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (49), 18680-4.
- Warner, J.K., Wang, J.C., Hope, K.J., Jin, L., and Dick, J.E. (2004). Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 23, 7164-7177.
- Weissman IL. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100: 157-68.
- Westaway, D., Payne, G., Varmus, H. E. (1984). Proviral deletions and oncogene base-substitutions in insertionally mutagenized c-myc alleles may contribute to the progression of avian bursal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(3), 843-847.

Wilbanks A.M., Mahajan S., Frank D.A. et al. (2001) The TEL/PDGFBetaR fusion protein activates STAT1 and STAT5: a common mechanism for transformation by tyrosine kinase fusion proteins. *Exp Hematol.* 28:584-593.

Wiseberg, E., Boulton C., Kelly L., et al. (2002). Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 1, 433-443.

Xu, F., Taki, T., Eguchi, M., Kamada, N., Ishii, E., Endo, M., Hayashi, Y. (2000). Tandem duplication of the FLT3 gene is infrequent in infant acute leukemia. Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia* 5, 945-7.

Xu, F., Taki, T., Yang, H.W., Hanada, R., Hongo, T., Ohnishi, H., Kobayashi, M., Bessho, F., Yanagisawa, M., Hayashi, Y. (1999). Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol* 105 (1), 155-62.

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y. et al. (2001) Activating mutations of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 97,2434-9.

Yokota, S., Kiyoi, H., Nakao, M., Iwai, T., Misawa, S., Okuda, T., Sonoda, Y., Abe, T., Kahsima, K., Matsuo, Y., Naoe, T. (1997). 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* 10, 1605-9.

Zhang, S., Qian, X., Redman, C., Bliskovski, V., Ramsay, E.S., Lowey, D.R., and Mock, B.A. (2003). P16 INK4a gene promoter variation and differential binding of a repressor, the rus-responsive zinc-finger transcription factor, RREB. *Oncogene* 22, 2285-2295.

Zhang, S., Ramsay, E.S., and Mock, B.A. (1998). Cdkn2a, the cyclin dependent kinase inhibitor encoding p16 INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2429-2434.

%	Prozent
(w/v)	Masse pro Volumen
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B Zellrezeptor
C/EBPα	CCAAT-Enhancer Binding Protein alpha
CD	Cluster of Differentiation
Cpm	englisch: Counts per Minute
D	Dalton
DMEM	Dulbecco's MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	englisch: Desoxyribonucleic Acid
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithioerythritol
E.coli	Escherichia coli
ECL	englisch: Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Äthanol
FACS	englisch: Fluorescent Activated Cell Sorter
FCS	englisch: Fetal Calf Serum
FLT3	englisch: FMS-like Tyrosine Kinase 3
FLT3	englisch FMS like tyrosine kinase 3
g	Gramm
gag	gruppenspezifische Antigene
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salts w/o Calcium + Magnesium
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonat
HRP	englisch: Horse Raddish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	englisch: Long Terminal Repeat
min	Minute(n)
mM	Millimolar
NOD/scid	englisch: Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	englisch: Phosphate Buffered Saline
PCR	englisch: Polymerase Chain Reaction
PE R-	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PIPES	Piperazin-1,4-bis[2-Ethansulfonsäure]
Pol	Polymerase

Prä-BZR	Pre-B Zellrezeptor
PRE	englisch: Posttranscriptional Regulatory Element
SCF	englisch: Stem Cell Factor
SDS	englisch: Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
SFEM	englisch: Serum Free Expansion Medium
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloracetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPO	Thrombopoetin
U	englisch: Unit
xg	x-fache Erdbeschleunigung

Mein größtes Dankeschön gilt Frau Dr. Carol Stocking. Vielen Dank für das schöne und zugleich spannende Projekt, die Freiheit beim Durchführen der Experimente sowie dem wissenschaftlichen Rat und der außerordentlich guten Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner möchte ich mich auch herzlich für die Betreuung bedanken und dass er sich sogleich als Gutachter zur Verfügung gestellt hat.

Prof. Dr. Boris Fehse danke ich für die Annahme des Postens des zweiten Dissertationsgutachters.

Bei der ganzen Arbeitsgruppe der Molekularen Pathologie möchte ich mich herzlich für die nette aber auch erfolgreiche Zusammenarbeit während meiner Zeit am Instiut bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt Dr. Stefan Horn, der mich in allen Situationen meiner Doktorarbeit immer unterstützt hat und mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei meinem Mann Olaf bedanke ich mich für die seelische Unerstützung während der ganzen Zeit der Arbeit. Auch meiner Familie, besonders meiner Mutter Helga und meiner Schwester Melanie, danke ich herzlich für die Unterstützung und den Glauben an mich und meine Fähigkeiten.

Meiner besten Freundin Nadine Ruderisch danke ich für die guten und aufmunternden Gespräche über Fachliches und weniger Fachliches.

Folake Akinduro danke ich für ihre Freundschaft in allen Lebenslagen. Es ist schön zu wissen, dass sie immer für mich da ist.

Natürlich möchte ich mich auch allgemein und ganz herzlich bei meinen Freunden für die Unterstützung während der ganzen Doktorandenzeit bedanken.