

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -

**Genomweite Analyse der Expression von Rezeptortyrosinkinasen bei
der akuten myeloischen Leukämie**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Becker, Kerstin

aus Münster

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Carsten Müller-Tidow

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Thorsten Pohle

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Carsten Müller-Tidow
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Thorsten Pohle

ZUSAMMENFASSUNG

Genomweite Analyse der Expression von Rezeptortyrosinkinasen bei der akuten myeloischen Leukämie

Becker, Kerstin

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Real-time-RT-PCR systematisch die Expression aller bekannter Rezeptortyrosinkinasen bei der akuten myeloischen Leukämie zu analysieren. Dabei konnte in über 50% der 85 untersuchten AML Patientenproben eine Expression von 18 der 55 analysierten Rezeptortyrosinkinasen nachgewiesen werden, während CD34+ Stammzellen oder normale Knochenmarkzellen eine größere Anzahl verschiedener Rezeptoren exprimierten.

Der Vergleich der relativen Expression der Rezeptortyrosinkinasen zwischen AML, CD34+ Stammzellen und normalem Knochenmark ergab in den AML Blasten eine signifikante Überexpression der PDGFR-Familienmitglieder c-KIT, CSF1R und FLT3 sowie von EPHB6 und LTK. Weitere Analysen zum Zusammenhang zwischen Expression von Rezeptortyrosinkinasen und FAB Klassifikation sowie Zyklinexpression zeigten in den myeloblastär differenzierten AML Subtypen FAB M1 und M2 eine signifikant höhere Expression der Rezeptoren TRK A, IGF1R, c-KIT, EPHB6 und PTK7 als in den monozytär differenzierten Subtypen FAB M4 und M5, wohingegen CSF1R und EPHB3 in den Subtypen FAB M4 und M5 stärker exprimiert wurden. Darüber hinaus ließ sich bei AML Patienten eine Assoziation zwischen überdurchschnittlich hoher Expression einiger Rezeptortyrosinkinasen (vor allem INSR und PTK7) und höherer Zyklinexpression beobachten. Desweiteren wurde durch Kaplan-Meier-Überlebensanalysen eine Korrelation zwischen hoher Expression der Rezeptortyrosinkinasen CSF1R, DDR1, INSR, AXL und RET und einer schlechten Prognose bei AML Patienten festgestellt. Im Gegensatz dazu wiesen AML Patienten mit einer hohen c-KIT Expression eine signifikant längere rückfallsfreie Überlebenszeit sowie ein längeres Gesamtüberleben auf.

Schließlich untersucht die vorliegende Arbeit die Häufigkeit der leukämogenen Deletionsmutante Δ TRK A, die sich jedoch in keiner der 57 mittels konventioneller PCR untersuchten AML Proben nachweisen ließ.

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Akute myeloische Leukämie	1
1.2 Hämatopoese	6
1.2.1 Erythropoese	7
1.2.2 Granulopoese	7
1.2.3 Monozytopoese	7
1.2.4 Thrombozytopoese	8
1.2.5 Lymphozytopoese	8
1.3 Rezeptortyrosinkinasen	15
1.3.1 Klassifikation und Struktur von Rezeptortyrosinkinasen	17
1.3.2 Signaltransduktion	20
1.3.3 Deregulation von Rezeptortyrosinkinasen	23
1.3.4 TRK Familie (Tropomyosin Rezeptor Kinase)	24
1.4 Ziel der Arbeit	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Zellkultur	29
2.2 Behandlung der Zellen mit ATRA	29
2.3 RNA Isolation	29
2.4 Reverse Transkription	30
2.5 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	31
2.6 Gelelektrophorese	33
2.7 Real-time-RT-PCR	33
3. Ergebnisse	48
3.1 RT-PCR-Analyse 55 verschiedener Rezeptortyrosinkinasen	48
3.1.1 Vergleich der Expression von Rezeptortyrosinkinasen zwischen AML, normalem Knochenmark und CD34+ Zellen	49
3.1.2 Analyse der FAB Stadien	60
3.1.3 Zusammenhang zwischen RTK und Zyklin Expression	61

Inhaltsverzeichnis

3.1.4 Überlebensanalysen	68
3.2 RT-PCR-Analyse der wichtigsten Rezeptortyrosinkinasen im Detail	76
3.2.1 c-KIT	77
3.2.2 CSF1R	79
3.2.3 FLT3	81
3.2.4 TRK A	84
3.3 Analyse der Deletionsmutante Δ TRK A mittels konventioneller PCR	88
4. Diskussion	91
4.1 c-KIT	93
4.2 CSF1R	103
4.3. FLT3	109
4.4 TRK A	118
5. Literaturverzeichnis	126
6. Lebenslauf	143
7. Danksagung	145
Anhang: Abkürzungsverzeichnis	

1. Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Leukämien stehen in der Sterblichkeitsstatistik an fünfter Stelle aller Krebsarten. Die akute myeloische Leukämie (AML) macht dabei etwa 80% aller akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus und trägt zur gesamten Krebssterblichkeit 1-2% bei. Die Wahrscheinlichkeit, an einer Leukämie zu erkranken, nimmt mit dem Alter exponentiell zu. Während die Inzidenz bei unter 30-Jährigen bei weniger als eins pro 100000 pro Jahr liegt, steigt sie bei 80-Jährigen auf über 10/100000 pro Jahr an.

Für die Ätiologie spielen sowohl ein genetisches Risiko, wie z.B. die Trisomie 21, als auch Umweltfaktoren wie ionisierende Strahlen, Benzol, Rauchen und antineoplastische Substanzen, die zur Chemotherapie eingesetzt werden, eine Rolle.

Pathogenetisch handelt es sich bei der AML um die klonale Expansion einer leukämisch transformierten hämatopoetischen Zelle mit autonomer Proliferation und Ausschwemmung der leukämischen Blasten ins Blut. Abhängig vom jeweiligen Stadium der Hämatopoese, in dem die maligne Transformation stattfindet, können unterschiedliche Subtypen der AML entstehen, die nach Morphologie, Zytogenetik und Immunphänotypisierung entsprechend den Vorschlägen der FAB (French-American-British-Cooperative-Group) in die Subtypen M0-M7 unterteilt werden (Tab. 1).

Dabei konnte für einige Subtypen die pathophysiologische Bedeutung der vorliegenden zytogenetischen Veränderungen bereits aufgeklärt werden. So liegt der akuten Promyelozytenleukämie (APL, FAB-M3) in vielen Fällen die Translokation t(15;17) zugrunde, welche das Fusionsgen PML-RAR α hervorruft. Dadurch kommt es zur Hemmung der Expression Retinoidsäure-abhängiger, RAR α (retinoic acid receptor) regulierter Gene, deren Produkte für die weitere myeloische Entwicklung nötig sind. Dies führt zur Reifungsblockierung der Promyelozyten und somit zur akuten Promyelozytenleukämie. Therapeutisch hohe Dosen des RAR α Liganden ATRA (all-trans retinoic acid) können diese Blockierung überwinden und eine Ausdifferenzierung der promyelozytären Blasten bewirken. Bei dem FAB Subtyp M2 (myeloblastär differenziert) liegt hingegen

häufig die Translokation t(8;21) vor, wodurch das Fusionsgen AML1/ETO entsteht. Über Rekrutierung des N-CoR/Sin3/HDAC1 Komplexes verhindert die ETO Komponente durch Histondeacetylierung die Transkription AML1 regulierter Gene, die ebenfalls eine Rolle in der Reifung myeloischer Zellen spielen (*Redner et al. 1999*). Charakteristisch für den Subtyp M4Eo mit abnormen Eosinophilen ist schließlich die Inversion inv16 mit dem daraus resultierenden Fusionsgen CBF β /MYHA11.

<u>FAB Subtyp</u>	<u>Kennzeichen der akuten Leukämie</u>
M0	Myeloblastär <u>undifferenziert</u> (Peroxidase nur elektronenmikroskopisch positiv, myeloische Immunmarker positiv)
M1	Myeloblastär undifferenziert (Peroxidase positiv)
M2	Myeloblastär <u>differenziert</u> (mit Auerstäbchen; Translokation t(8;21) in 40%)
M3	Promyelozytär (hypergranulär, mit Haufen und Bündeln von Auerstäbchen; Translokation t(15;17))
M4	Kombiniert myeloblastär und monozytär
M4Eo	Kombiniert myeloblastär und monozytär mit abnormen Eosinophilen ; Inversion inv(16)
M5a	Monoblastär
M5b	Monozytär
M6	Kombiniert myeloblastär und erythroblastär
M7	Megakaryoblastär (Immunmarker CD41 und CD61 positiv)

Tabelle 1. FAB Klassifikation der AML.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete FAB Klassifikation der AML wurde kürzlich von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) durch eine neue Klassifikation der myeloiden Neoplasien ersetzt. Diese WHO Klassifikation greift zwar viele Kriterien der bisherigen FAB Klassifikation der AML und des myelodysplastischen Syndroms

(MDS) auf, beinhaltet aber auch einige entscheidende Veränderungen. Die beiden wichtigsten Unterschiede betreffen dabei den Schwellwert des Blastenanteils für die Diagnosestellung einer AML und die Bildung einer neuen klinisch und biologisch definierten Subgruppe der AML. Der Blastengrenzwert für die Diagnose der AML wurde von 30% auf 20% Blasten im Blut oder Knochenmark gesenkt. Außerdem sollte künftig bei Patienten mit den inzwischen gut charakterisierten zytogenetischen Anomalien t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22) und t(15;17)(q22;q12) unabhängig vom Blastenanteil eine AML diagnostiziert werden. Die neue WHO Klassifikation der AML sieht folgende Einteilung vor (*Vardiman et al. 2002*):

1. Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten genetischen Anomalien
 - AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)
 - AML mit abnormen Knochenmarks Eosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBF β /MYH11)
 - Akute promyelozytäre Leukämie mit t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR α) und Varianten
 - AML mit 11q23 (MLL) Anomalien

2. Akute myeloische Leukämie mit multilineärer Dysplasie
 - AML mit vorangegangenem MDS oder MDS/MPD
 - AML ohne vorausgegangenem MDS oder MDS/MPD, aber mit Dysplasie in mindestens 50% der Zellen in zwei oder mehr verschiedenen myeloischen Zellreihen

3. Akute myeloische Leukämie und myelodysplastische Syndrome, therapieassoziiert
 - Mit alkylierenden Substanzen/Bestrahlung assoziierter Typ
 - Mit Topoisomerase II Inhibitoren assoziierter Typ
 - Andere

4. Akute myeloische Leukämie, nicht näher kategorisiert

- AML, minimal differenziert
- AML ohne Ausreifung
- AML mit Ausreifung
- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute monoblastisch/monozytäre Leukämie
- Akute erythroide Leukämie:
 - a) erythroid/myeloid
 - b) reine Erythroleukämie
- Akute megakaryoblastäre Leukämie
- Akute basophilische Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose
- Myeloides Sarkom.

Mit dieser Klassifikation wird der wichtigen Unterscheidung zwischen den beiden AML Subgruppen de novo AML vs. AML auf dem Boden einer Myelodysplasie Rechnung getragen, da sie auf unterschiedlichen Mechanismen der Leukämogenese basieren. Die MDS-assoziierte Leukämie geht mit einer Dysplasie mehrerer, verschiedener Zellreihen sowie prognostisch ungünstigen zytogenetischen Veränderungen einher, beispielsweise einem Verlust genetischen Materials und einem schlechteren Therapieansprechen. Die Inzidenz dieses AML Typs steigt mit zunehmendem Alter im Einklang mit der Hypothese, dass das MDS bzw. die MDS-assoziierte Leukämie auf einer im Laufe der Zeit erworbenen Akkumulation verschiedener genetischer Veränderung der hämatopoetischen Stammzelle beruht. Im Gegensatz dazu weist die de novo AML eine über das Alter relativ konstant verteilte Inzidenz auf und stellt somit die Form der AML dar, die vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen beobachtet wird. Bei der de novo AML finden sich zumeist prognostisch günstige zytogenetische Anomalien, insbesondere rekurrente chromosomale Translokationen und Inversionen (Gruppe 1 der WHO Klassifikation). Außerdem zeichnet sich diese Gruppe der AML durch ein meist gutes Ansprechen auf geeignete Therapie mit günstigeren Gesamtüberlebenszeiten aus.

Ein Problem bei der korrekten Diagnosestellung gemäß der neuen WHO Klassifikation stellen die oftmals fehlenden Informationen bezüglich der Zytogenetik dar. Obwohl die genaue Kenntnis der zugrundeliegenden zytogenetischen Veränderungen entscheidende Hinweise für die individuelle Bewertung der Therapieansprechchancen sowie der Prognose des einzelnen Patienten liefert und damit Entscheidungshilfen für die Wahl der jeweils geeigneten Therapie geben kann, ist es aus Kosten- und Zeitgründen nicht immer möglich, bei jedem AML Patienten die erforderlichen genetischen Daten zu gewinnen. Die Untergruppe 4 der WHO Klassifikation ist daher für solche AML Fälle gedacht, die entweder nicht die Kriterien der anderen Subgruppen erfüllen, oder bei denen keine genetischen Daten verfügbar sind.

Klinisch wird das Krankheitsbild der AML durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark infolge ungehemmter Proliferation des leukämischen Zellklons geprägt. Dies führt zu Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie mit den Symptomen Müdigkeit, Blässe, Leistungsschwäche, rezidivierenden Infektionen wie Pneumonie, Soor, Meningitis, pyogene Hautinfektionen und Hämorrhagien. Die Ausschwemmung der Blasten ins periphere Blut bewirkt oftmals eine erhebliche Leukozytose, aber auch normale oder erniedrigte Leukozytenzahlen können auftreten. In der Regel findet sich eine Hyperzellularität des Knochenmarks mit Überwiegen der leukämischen Blasten. Hinzu kommen Zellinfiltrationen in Organen und Geweben wie beispielsweise Lymphome, Hepatosplenomegalie, Gingivahyperplasie und Hautinfiltrationen. Selten kann es auch zu einer ZNS Beteiligung kommen.

Die Therapie der AML setzt sich zusammen aus der eigentlichen antileukämischen Therapie und der supportiven Behandlung opportunistischer Infektionen, Blutungskomplikationen etc. sowie dem Einsatz hämatopoetischer Wachstumsfaktoren. In der ersten Phase, der Remissionsinduktion, wird zunächst mit einem bis zwei hochdosierten Chemotherapiezyklen eine Knochenmarksaplasie mit Beseitigung sowohl der leukämischen Blasten als auch der restlichen normalen Markzellen herbeigeführt. Anschließend kommt es zur vollen Regeneration der normalen Hämatopoese und somit zur Remission. Um diese Remission zu erhalten, folgen weitere Chemotherapiekurse, zunächst als Konsolidierungstherapie vom Typ der Induktionsbehandlung, später als

Erhaltungstherapie mit Kursen geringerer Intensität. Für die Knochenmarktransplantation in der Remissionsphase werden desweiteren myeloablative Therapieformen, wie hochintensive Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung, eingesetzt. In Frage kommen sowohl allogene Knochenmarktransplantationen von HLA identischen Spendern als auch die autologe Knochenmarktransplantation sowie zunehmend häufiger Blutstammzelltransplantationen. Dabei bietet sich bei allogener Transplantation neben der myeloablativen Vorbehandlung noch der Vorteil des Graft-versus-Leukemia Effektes durch das Spenderimmunsystem. Insgesamt erreichen 70-80% der Patienten nach intensiver Therapie eine komplette Remission des Knochenmarks, wobei unter Respondern auf die primäre Therapie in ca. 25% der Fälle eine Heilung erzielt werden kann (*H.-J. Senn et al.: Checkliste Onkologie, 2002 Georg Thieme Verlag*).

Während die spezifischen Chromosomenaberrationen t(8;21) (FAB M2), t(15;17) (FAB M3) und inv16 (FAB M4Eo) mit einer günstigen Prognose assoziiert sind, erwiesen sich unspezifische Aberrationen der Chromosomen 5,7,11 und komplexe Chromosomenanomalien als prognostisch eher ungünstig. Weitere Prognosekriterien stellen Alter, LDH Spiegel und die Leukozytenzahl dar, wobei ein hohes Alter, hohe LDH im Serum und Leukozytose auf eine schlechtere Prognose hindeuten (*Thiemes Innere Medizin: TIM.-Stuttgart; New York; Thieme, 1999; Seiten 865-869; Böcker/Denk/Heitz: Pathologie; Urban & Fischer, 2001; Seiten 502-503*).

1.2 Hämatopoese

Die Pathogenese der AML lässt sich nur auf Grundlage des Normalzustandes der Hämatopoese detailliert betrachten. Erst die genaue Kenntnis der normalen Differenzierungsvorgänge ermöglicht das Verständnis der Leukämieentstehung auf molekularbiologischer Ebene und eröffnet insofern neue Ansatzpunkte für eine gezielte Therapie. Beim Erwachsenen findet die Hämatopoese unter normalen Bedingungen im roten, blutbildenden Knochenmark der kurzen und platten Knochen statt. Ihren Ursprung stellen undeterminierte, pluripotente Stammzellen dar, die entweder die lymphatische oder

die myeloische Richtung einschlagen können. Aus der myeloischen Stammzelle (CFU-GEMM; colony-forming unit) entwickeln sich Vorläuferzellen mit eingeschränkter Pluripotenz, aus denen letztendlich die verschiedenen Zellreihen, Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten, hervorgehen. Physiologischerweise verlassen nur reife Blutzellen durch die Sinusendothelien das Knochenmark und gelangen so in die Blutbahn (Böcker/Denk/Heitz: *Pathologie; Urban & Fischer, 2001, Seite 484-485; Abb. 1*).

1.2.1 Erythropoese

Unter dem Einfluss von Erythropoetin entstehen aus myeloischen Stammzellen über erythropoetisch determinierte Vorläuferzellen (erst BFU-E, dann CFU-E) Proerythroblasten, die sich zunächst zu basophilen, dann zu polychromatischen Makroblasten und schließlich zu orthochromatischen Normoblasten weiterentwickeln. Nach Ausstoßung des Zellkerns bilden sich Retikulozyten, die nach Verlust der restlichen Ribosomen zu reifen Erythrozyten werden.

1.2.2 Granulopoese

Aus der myeloischen Stammzelle gehen über eine gemeinsame granulopoetisch-monozytopoetische Zwischenstufe (CFU-GM) allein granulopoetisch determinierte Vorläuferzellen, CFU-G, bzw. CFU-Eo und CFU-Bas hervor, aus denen wiederum die entsprechenden Myeloblasten entstehen. Diese entwickeln sich weiter zu Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten, welche zu stabkernigen und schließlich segmentkernigen neutrophilen, eosinophilen oder basophilen Granulozyten ausdifferenzieren.

1.2.3 Monozytopoese

Aus der bereits erwähnten gemeinsamen Vorläuferzelle CFU-GM entwickeln sich unter dem Einfluss von GM-CSF, M-CSF und IL-3 monozytopoetisch determinierte Vorläuferzellen (CFU-M) und daraus dann Monoblasten, die über das Sta-

dium der Promonozyten letztendlich zu Monozyten reifen. Monozyten gelangen über das Blut in das Gewebe, wo sie u.a. zu Makrophagen, Epitheloidzellen oder antigenpräsentierenden Zellen ausdifferenzieren können.

1.2.4 Thrombozytopoese

Der aus der thrombozytopoetisch determinierten Vorläuferzelle CFU-Mega hervorgehende Megakaryoblast wird durch Endomitose zum mehrkernigen Megakaryozyten, aus dem durch Zytoplasmaabschnürung Thrombozyten entstehen.

1.2.5 Lymphozytopoese

Die von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks abstammende multipotente lymphatische Stammzelle generiert sowohl B-Vorläuferzellen als auch NK-Vorläuferzellen und T-Vorläuferzellen. Im Knochenmark findet auch die weitere B-Zelldifferenzierung über Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen und unreife B-Zellen bis hin zu reifen naiven B-Zellen statt, die über das Blut sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten, Tonsillen, Milz und MALT (mucosa-associated lymphatic tissue) besiedeln. Dort erfolgen Antigenkontakt und weitere Differenzierung zu Gedächtniszellen oder antikörperproduzierenden Plasmazellen. Die T-Zelldifferenzierung hingegen spielt sich im wesentlichen im Thymus ab. Aus den T-Vorläuferzellen entstehen dort zunächst CD4 und CD8 doppelpositive T-Lymphoblasten, die sich dann zu CD4 oder CD8 einfach positiven T-Lymphozyten und letztendlich zu reifen naiven T-Zellen entwickeln, welche über das Blut in die T-Zonen sekundärer lymphatischer Organe gelangen.

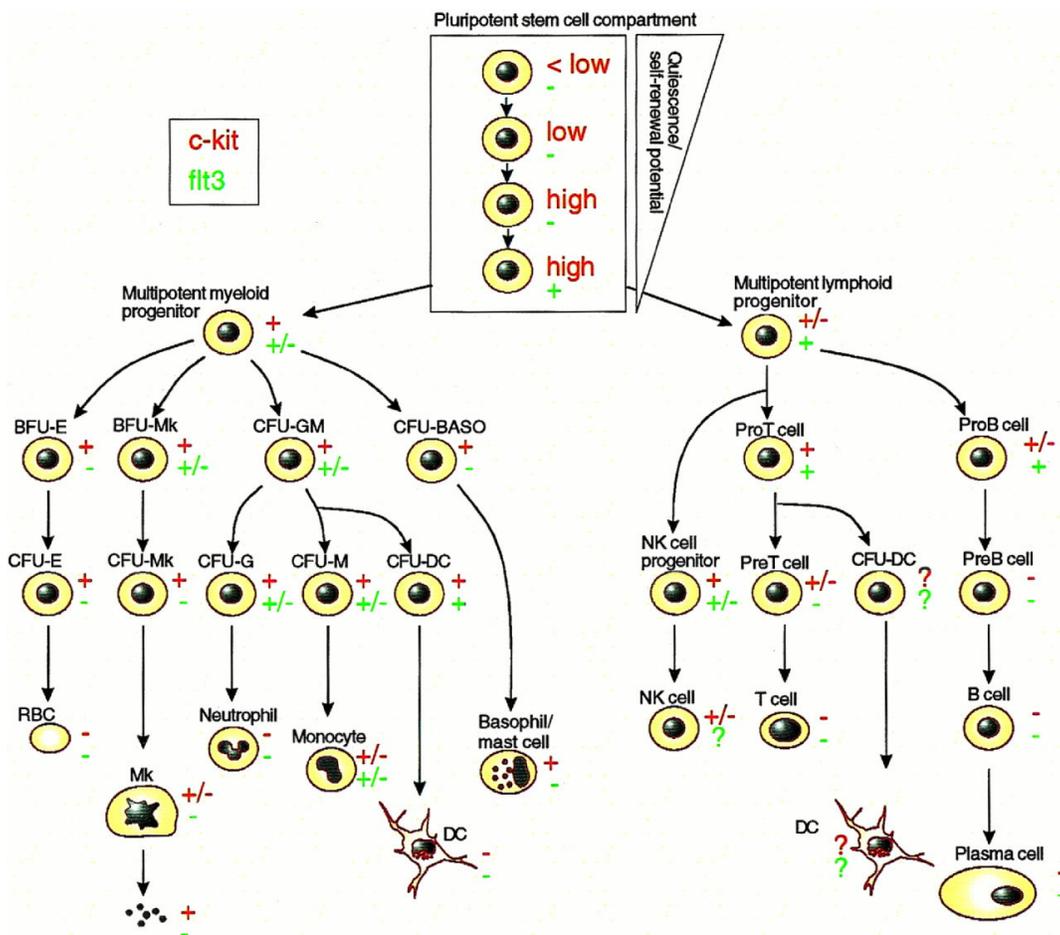


Abbildung 1: C-KIT und FLT3 Expression in der hämatopoetischen Hierarchie. Darstellung der Expression des c-KIT Rezeptors (dunkel) und des FLT3 Rezeptors (hell) in der Mehrheit der Zellen einer bestimmten Zellpopulation. **Symbole:** (-): fehlende bzw. nicht detektierbare Expression in den meisten Zellen der untersuchten Population; (+): Expression in der Mehrheit der Zellen vorhanden; (+/-): Zelltyp mit einer signifikanten Anzahl sowohl rezeptorpositiver als auch rezeptornegativer Subpopulationen; (?): keine ausreichenden Daten verfügbar. **Abk.:** BFU: burst-forming units; CFU: colony-forming units; E: erythroid; Mk: megakaryocyte; G: neutrophilic progenitor; M: monocyte/macrophage; DC: dendritic cell; Baso: basophil; RBC: red blood cell; NK: natural killer cell (aus Lyman et Jacobson 1998).

Die komplexen Differenzierungsvorgänge innerhalb der Hämatopoese werden durch das Zusammenspiel einer Vielzahl hämatopoetischer Wachstumsfaktoren gesteuert. Das besondere Mikromilieu des Knochenmarkes bildet hierzu eine ideale Voraussetzung. Es besteht aus einem Netzwerk feinsten Blutgefäße und Stromazellen, wie Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Fettzellen und Retikulumzellen. Die Stromazellen sind die

wichtigsten zellulären Bildungsstätten der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, welche den hämatopoetischen Zellen sowohl lokal über Zell-Zell-Kontakte als auch gebunden an die extrazelluläre Matrix des Knochenmarkes präsentiert werden können. Bestimmte hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie IL-1 (Interleukin-1) und TNF (Tumornekrosefaktor) können zusätzlich die Bildung anderer hämatopoetischer Wachstumsfaktoren durch die Stromazellen stimulieren. Zu diesen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren zählen beispielweise der Stammzellfaktor (SCF, stem cell factor, KIT-Ligand, Steel-Faktor) bzw. die Interleukine IL-3 und IL-6 sowie GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen „colony-stimulating factor“), welche vor allem auf pluripotente bzw. frühe multipotente hämatopoetische Zellen wirken. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren mit überwiegendem Einfluss auf Zellen späterer Stadien mit Determinierung auf eine bestimmte Zellreihe stellen z.B. G-CSF, M-CSF (CSF1), IL-5 (Eo-CSF), Erythropoetin und Thrombopoetin dar (*Hoffbrand/Pettit/Hoelzer: Roche Grundkurs Hämatologie; Blackwell Wissenschaft 1997; Seite: 1-11*).

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine allgemein vermitteln ihre Signale über spezifische Rezeptoren, die sowohl zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen als auch zur Familie der Zytokinrezeptoren gehören können. Dabei charakterisieren funktionelle Pleiotropie und Redundanz die Wirkung dieser Zytokin-Stimulation. Je nach Gewebe und Zelltyp kann ein bestimmtes Zytokin unterschiedliche biologische Funktionen beeinflussen, wobei mehrere verschiedene Zytokine in ein und demselben Zelltyp ähnliche oder überlappende Effekte erzielen können. Letztendlich ergibt sich die zelluläre Antwort auf die Vielzahl der einwirkenden externen und internen Stimuli aus der Kumulation und Integration der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden.

Eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferation, Überleben und Differenzierung hämatopoetischer Zellen infolge dieser Zytokin-Stimulation spielen die Kinasen JAK (Janus Kinase) und Src (humanes Homolog des v-src Onkogens des „Rous“ Sarkom Virus) sowie die STAT-Familie von Transkriptionsfaktoren (signal transducers and activators of transcription) (*Rane et Reddy 2002*). Denn im Gegensatz zu Rezeptortyrosinkinasen besitzen Zytokinrezeptoren keine eigene zytoplasmatische Kinasedomäne,

sondern vermitteln ihre Wirkung u.a. über intrazelluläre Tyrosinkinase der JAK Familie. Rezeptor-Dimerisierung/Oligomerisierung infolge Ligandenbindung führt zur Assoziation von JAK Kinasen und deren anschließender Phosphorylierung durch Autophosphorylierung und/oder gegenseitiger Phosphorylierung durch andere JAK Kinasen. Die hierdurch aktivierten JAK Kinasen phosphorylieren dann bestimmte Tyrosinreste des Rezeptors, welche im Anschluss als Andockstellen für Moleküle mit SH2-Domänen, wie STATs, Src Kinasen, Proteinphosphatasen und Adaptermolekülen (Shc, Grb2 und Cbl), dienen (Abb. 2).

Die auf diese Weise rekrutierten STATs werden daraufhin abhängig von der Art des STAT Moleküls, von Zelltyp und Zytokinrezeptor entweder durch die JAK Kinasen selbst, oder aber durch die rezeptorassoziierten Src Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert. So zeigte sich beispielsweise bei STAT5 eine direkte Phosphorylierung durch JAK2, wohingegen die Aktivierung von STAT3 vermutlich auf einer Phosphorylierung durch Src Kinasen beruht. Danach folgen die Dissoziation der aktivierten STATs vom Rezeptor, ihre Dimerisierung und Translokation in den Nukleus, wo sie die Transkription bestimmter Gene aktivieren.

Nicht nur Zytokinrezeptoren regulieren die Aktivität der STAT Moleküle, sondern auch Rezeptortyrosinkinasen, z.B. die Familie der PDGF Rezeptoren. So beinhaltet die Signaltransduktion des PDGF Rezeptors u.a. eine Src vermittelte STAT3 Aktivierung, die zur Induktion von c-myc beiträgt, welches für die durch v-Src verursachte Transformation von Zellen verantwortlich gemacht wird. Überdies lässt sich die transkriptionsstimulierende Aktivität der STAT Proteine zusätzlich noch durch Phosphorylierung durch MAP Kinasen bzw. nach EGF- und PDGF Stimulierung durch MEKK1 verstärken.

Neben dem JAK/STAT System aktivieren Zytokinrezeptoren, ebenso wie Rezeptortyrosinkinasen, zusätzlich die Shc-Ras-MAP Kinase-Kaskade sowie den PIP3K/Akt Signalweg. Alle drei Signalwege scheinen dabei eine Rolle für das IL-3 abhängige Überleben hämatopoetischer Zellen zu spielen. Den Mitgliedern der Bcl-2 Familie kommt wahrscheinlich eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Apoptose zu. So induziert IL-3 vermutlich über die Aktivierung von JAK2 die Expression der antiapoptotisch wir-

kenden Proteine Bcl-2 und Bcl-X. Aber auch eine Überexpression von Raf oder Akt, welche zu einer Induktion von c-myc, Bcl-2 und Bad führt, sind in der Lage, die Apoptose infolge Il-3 Entzugs zu verhindern.

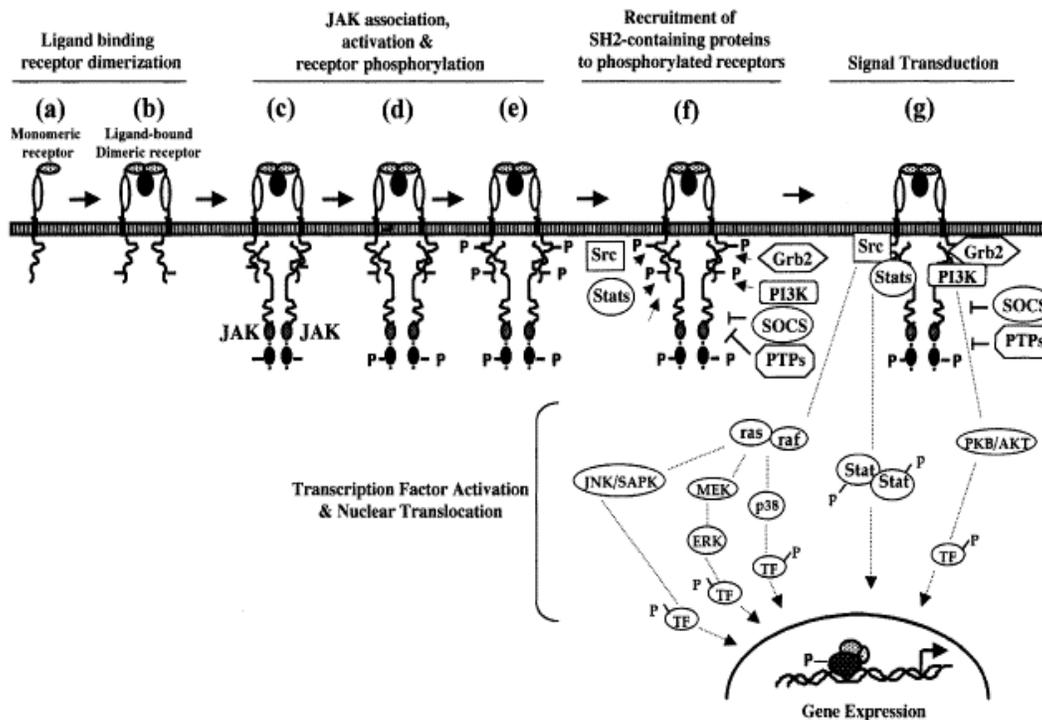


Abbildung 2: Hämatopoetische Signaltransduktion. Bindung eines extrazellulären Liganden (Zytokin oder Wachstumsfaktor) führt zur Dimerisierung des monomeren (a) oder dimeren (b) Rezeptors und nachfolgender Assoziation (c), Phosphorylierung und Aktivierung von JAKs (d). Diese Kinasen katalysieren ihrerseits die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste des Rezeptors (e) und schaffen dadurch Andockstellen für Adaptermoleküle (Grb2), Serin/Threonin Kinasen (Akt, PI3K etc.), Kinase Inhibitoren [SOCS (suppressors of cytokine signaling)/CIS (cytokine-induced SH2 containing proteins)/JAB (JAK-binding protein) Proteine, Protein Tyrosin Phosphatasen/PTPs] und Transkriptionsfaktoren (STATs) (f). Im weiteren Verlauf aktivierte Signal-Mediatoren wie MAP/JNK/ERK Kinasen tragen zur zusätzlichen Signalspezifität bei. Die konzertierte Aktion all dieser Signaltransduktionswege bewirkt die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren (TF) und die durch diese vermittelte Induktion der Expression bestimmter Gene (g) (aus Rane et Reddy 2002).

Das Überleben ebenso wie die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen unterliegt also einer komplexen Regulation durch unterschiedliche, zum Teil syner-

gistisch wirkende Wachstumsfaktoren und Zytokine, die ihre Wirkungen über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden vermitteln. Eine Störung dieses feinabgestimmten Gleichgewichts in der Aktivität der einzelnen Komponenten der Signaltransduktion kann die normale hämatopoetische Differenzierung beeinträchtigen und zur Entstehung einer Leukämie beitragen.

Außer den STATs existieren noch eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren, die Differenzierung, Proliferation, Überleben und Funktion hämatopoetischer Zellen beeinflussen. Hierzu zählen beispielweise die Transkriptionsfaktoren GATA-1 (GATA-binding protein; ERYF1, erythroid transcription factor 1), PU.1 (auch bekannt als SPI1: spleen focus forming virus proviral integration oncogene), C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein), AML1, der Retinoidsäure Rezeptor RAR α , PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), WT-1 (Wilms' Tumor), c-myb, c-myc, c-Jun (*Tenen et al. 1997*). Einige dieser myeloiden Transkriptionsfaktoren sind bei der AML von Translokationen betroffen (s.u.).

Promotoren von Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. der Promoter des M-CSF Rezeptors (CSF1R), weisen oftmals benachbarte Bindungsstellen für mehrere dieser Transkriptionsfaktoren auf. Erst aus der Kombination der gleichzeitigen Aktivität dieser unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren ergibt sich dann der spezifisch myeloische Effekt auf die Genexpression. Im M-CSF Rezeptor Promotor finden sich nebeneinander Bindungsstellen für PU.1, AML1 und C/EBP α . Während PU.1 sowohl in myeloischen Zellen als auch in B-Zellen und AML1 in allen weißen Blutzellen exprimiert wird, kommt eine Expression von C/EBP α nur in myeloischen, nicht jedoch in lymphatischen Zellen vor. Dabei können sowohl AML1 und C/EBP α als auch C/EBP α und PU.1 miteinander interagieren und sich gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken.

Nach einem Modell von Tenen et al. vollzieht sich das Differenzierungsmuster der einzelnen myeloischen Zellreihen vermutlich folgendermaßen (Abb. 3):

In hämatopoetischen Stammzellen bzw. frühen multipotenten Progenitoren kommt es durch noch nicht genau geklärte Mechanismen zu der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren steigern einerseits über einen positiven Autoregulationsmechanismus ihre eigene Expression, andererseits induzieren sie

die Transkription spezifischer Wachstumsfaktorrezeptoren, über die zellreihenspezifische Wachstumsfaktoren dann ihre Wirkung auf die weitere Differenzierung entfalten können. Derselbe Transkriptionsfaktor unterstützt diesen Prozess zusätzlich durch die Steigerung oder Verringerung der Expression weiterer Differenzierungsgene. Im Falle der erythroiden Entwicklung führt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-1 bei gleichzeitiger Repression des Transkriptionsfaktors PU.1 sowohl zur Induktion von GATA-1 selbst als auch zur Induktion des Erythropoetinrezeptors, wodurch unter Erythropoetinstimulation die erythroide Differenzierung und das Überleben dieser spezifischen Zellreihe gefördert werden.

Während der Monozytopoese hingegen kommt es umgekehrt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors PU.1 und Repression des Transkriptionsfaktors GATA-1 und somit zu einer Verstärkung der Expression von PU.1 selbst sowie zu einer Induktion des M-CSF Rezeptors, der für die monozytäre Differenzierung bedeutsam ist.

Wie wichtig die Verminderung der Expression des jeweils nicht zellreihenspezifischen Transkriptionsfaktors ist, zeigen die Beobachtungen, dass eine Überexpression von GATA-1 in einem myeloiden Differenzierungsblock resultiert, wohingegen eine Überexpression von PU.1 infolge einer Friend Virus Infektion früher Erythroblasten in Mäusen zu einem erythroiden Differenzierungsstop und zu einer Erythroleukämie führt. Darüber hinaus scheint für die Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP α mit nachfolgender Induktion des G-CSF Rezeptors bedeutsam zu sein.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die normale Differenzierung hämatopoetischer Zellen durch die aufeinander abgestimmte Funktion spezifischer Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Eine Störung dieses Gleichgewichts bzw. eine veränderte Funktion bestimmter für die normale Differenzierung erforderlicher Transkriptionsfaktoren kann zu einem Differenzierungsblock und damit zu der Entstehung einer akuten Leukämie beitragen. Auch eine Deregulation der Expression bestimmter Rezeptortyrosinkinasen oder eine konstitutiv gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität dieser Rezeptoren kann die Krebsentstehung begünstigen.

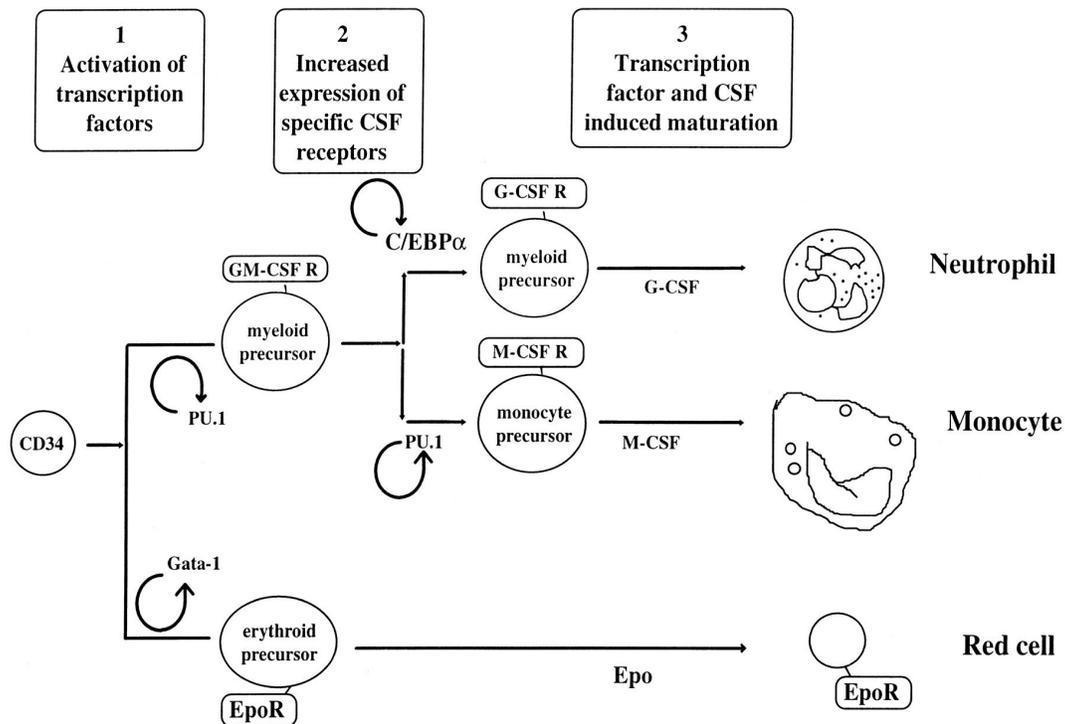


Abbildung 3: Modell für die Induktion der hämatopoetischen Differenzierung durch spezifische Transkriptionsfaktoren. Nach diesem Modell zeigen in CD34+ Stammzellen bestimmte Transkriptionsfaktoren und spezifische Wachstumsfaktorrezeptoren nur eine geringe Expression. Durch noch nicht näher definierte Signale kommt es zu einer Hochregulation bzw. Runterregulation spezifischer Transkriptionsfaktoren wie GATA-1 oder PU.1. Dies steigert über einen positiven Autoregulationsmechanismus die Expression des Transkriptionsfaktors selbst und induziert die Expression spezifischer Wachstumsfaktorrezeptoren, was zur gesteigerten Proliferation, Differenzierung und Apoptosehemmung bestimmter Zellreihen führt (für nähere Erläuterungen siehe Text). **Abk.:** Epo: Erythropoetin; EpoR: Erythropoetinrezeptor; G-CSF R: granulocyte colony-stimulating factor receptor; M-CSF R: macrophage colony-stimulating factor receptor (aus Tenen et al. 1997).

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) spielen eine bedeutende Rolle für zahlreiche Zellfunktionen. So regulieren sie beispielsweise die Proliferation, den Zellzyklus, die Apoptose, Differenzierung und Migration von Zellen (Zwick et al. 2001). Deregulation oder Mutation dieser Rezeptortyrosinkinasen kann hyperproliferative Erkrankungen wie Psoriasis, aber auch verschiedene kongenitale Syndrome – beispielsweise Zwergwuchs und Kraniosynostose – hervorrufen (Zwick et al. 2002; Robertson et al. 2000). Von besonderem

Interesse ist darüber hinaus das Mitwirken einer gesteigerten Expression bestimmter Rezeptortyrosinkinasen bei der Entstehung von maligner Transformation und Tumorpheriferation.

Zu den Krebserkrankungen, bei denen eine Überexpression oder aktivierende Mutationen einzelner Rezeptortyrosinkinasen nachgewiesen wurden, zählen auch die akuten myeloischen Leukämien. So lässt sich durch die Forschung beispielweise eine Verbindung zwischen AML und der Expression der Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, CSF1R, FLT3 sowie TRK A belegen. Zudem wurden bei der AML zahlreiche Mutationen dieser Rezeptoren beschrieben wie Mutationen des Codons Asp⁸¹⁶ oder Asp⁴¹⁹ des c-KIT Rezeptors, Mutationen des Codons Y969 und L301 des CSF1R Rezeptors, FLT3-ITD und FLT3 D835Y Mutationen sowie die kürzlich von Reuther entdeckte Mutation Δ TRK A (*Scheijen, Griffin 2002; Reuther et al. 2000*).

Da die AML 80% aller akuten Leukämien ausmacht, aber nicht alle Patienten auf die konventionellen Behandlungsmethoden ansprechen, ist es notwendig, neue Möglichkeiten der Therapie zu entwickeln. Diese könnten in der spezifischen Hemmung derjenigen Rezeptortyrosinkinasen bestehen, die eindeutig zur Pathogenese der AML beitragen. Auf diesem Prinzip beruht beispielsweise die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors „Glivec“ (STI 571), der bereits mit Erfolg bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt wird. Dabei hemmt STI 571 nicht nur selektiv die für die CML charakteristische Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Bcr-Abl, die durch das Philadelphia-Chromosom entsteht, sondern auch die Rezeptortyrosinkinasen PDGFR und c-KIT. Somit eignet sich „Glivec“ neben der Therapie der CML auch zur Behandlung der Philadelphia-ALL und der extrem seltenen Philadelphia-AML. Außerdem konnte auch in einem Fall von c-KIT positiver, therapierefraktärer, sekundärer AML eine komplette Remission durch STI571 erzielt werden (*Kindler et al. 2002*).

Die Entwicklung neuer Therapieansätze, die die Hemmung spezifischer Rezeptortyrosinkinasen auch für die AML bieten könnte, erfordert detaillierte Kenntnisse über die Funktion einzelner Rezeptortyrosinkinasen sowie ihre Rolle bei der Pathogenese der AML. Einen ersten Beitrag zu dieser Forschung liefert die umfangreiche Analyse der

Expression aller bekannten Rezeptortyrosinkinasen in der AML, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wird.

1.3.1 Klassifikation und Struktur von Rezeptortyrosinkinasen

Aufgrund ihrer Bedeutung für zahlreiche Zellprozesse sind Rezeptortyrosinkinasen schon seit längerer Zeit Gegenstand der medizinischen Forschung. Ihre genaue Anzahl wurde erstmals im Rahmen des Human Genome Projektes festgestellt. Von den 90 im menschlichen Genom entdeckten Tyrosinkinase-Genen stellen 32 Gene Nicht-Rezeptortyrosinkinasen dar, während die restlichen 58 Gene membrangebundene Rezeptoren kodieren (*Robinson et al. 2000*). Diese lassen sich anhand der Struktur in 20 Familien unterteilen (Tab. 2a und 2b). Das Anliegen dieser Arbeit soll es sein, durch Real-time-RT-PCR die Expression aller bekannten Rezeptortyrosinkinasen auf mRNA-Ebene in der akuten myeloischen Leukämie (AML) zu untersuchen.

Gemeinsam ist allen Rezeptortyrosinkinasen ein ähnlicher Aufbau aus einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer alpha-helikalen Transmembrandomäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (*Robertson 2000*). Die extrazelluläre Domäne beinhaltet je nach Familie unterschiedliche konservierte Elemente, beispielsweise Immunglobulin-ähnliche Elemente (Ig), Cystein-reiche Regionen (Cys) und Fibronektin Wiederholungselemente (Fn) (Abb. 4).

Wie Robertson am Beispiel des Insulinrezeptors ausführt, kann die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne sowohl in einer inaktiven als auch in einer aktiven Konformation vorliegen (*Robertson et al. 2000*). In der inaktiven Form wird das aktive Zentrum des Enzyms durch eine Aktivierungsschleife („activation loop“) verlegt, so dass die Bindung des Substrates bzw. die Bindung von ATP an das Enzym blockiert wird. Durch Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der Aktivierungsschleife treten strukturelle Veränderungen auf, durch die die Aktivierungsschleife vom aktiven Zentrum entfernt und somit der Zugang für das jeweilige Substrat bzw. für ATP freigegeben wird.

Familie	Mitglieder	Name (engl.)
<u>1. ALK</u>	ALK	anaplastic lymphoma kinase
	LTK	leukocyte tyrosine kinase
<u>2. AXL</u>	AXL	anexelekto (gr. für unkontrolliert)
	MER/MERTK	Bezeichnung des Erstbeschreibers (Graham et al. 1994)/MER tyrosine kinase protooncogene
	TYRO3	Tyro3 protein tyrosine kinase
<u>3. DDR</u>	DDR1	discoidin domain receptor
	DDR2	
<u>4. EGFR</u>	EGFR	epidermal growth factor receptor
	ERBB2/HER2	(avian) erythroblastic leukemia viral oncogene homolog/homology to human epidermal growth factor
	ERBB3/HER3	
	ERBB4/HER4	
<u>5. EPH</u>	EPHA1	erythropoietin-producing (human) hepatocellular carcinoma line (Zelllinie, aus der dieser Rezeptor erstmalig isoliert wurde) A
	EPHA2	
	EPHA3	
	EPHA4	
	EPHA5	
	EPHA6	
	EPHA7	
	EPHA8	
	EPHB1	erythropoietin-producing (human) hepatocellular carcinoma line B
	EPHB2	
	EPHB3	
	EPHB4*	
	EPHB6	
	EPHX*	
<u>6. FGFR</u>	FGFR1	fibroblast growth factor receptor
	FGFR2	
	FGFR3	
	FGFR4	
<u>7. INSR</u>	IGF1R	insuline-like growth factor 1 receptor
	INSR/IR	insuline receptor
	INSRR/IRR	insuline receptor-related receptor

Tabelle 2a. Klassifikation der Rezeptortyrosinkinasen nach Robinson et al. 2000.

Familie	Mitglieder	Name (engl.)
<u>8. MET</u>	MET/HGFR	Bezeichnung vorgeschlagen von Entdeckern (Cooper et al. 1984)/hepatocyte growth factor receptor
	RON/MST1R	RON (Name)/macrophage stimulating 1 receptor
<u>9. MUSK</u>	MUSK	muscle-specific receptor tyrosine kinase
<u>10. PDGFR</u>	c-KIT	zelluläres Homolog zu v-KIT, i.e. Teil des Provirus des Hardy-Zuckerman 4 "feline sarcoma virus"
	CSF1R	colony-stimulating factor 1 receptor
	FLT3	FMS-like tyrosine kinase
	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor A
	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor B
<u>11. PTK7</u>	PTK7	protein tyrosine kinase
<u>12. RET</u>	RET	rearranged during transformation
<u>13. ROR</u>	ROR1	rar (retinoic acid receptor) -related orphan receptor
	ROR2	
<u>14. ROS</u>	ROS1	humanes Homolog 1 des v-ROS Onkogen des "avian UR2 sarcoma virus"
<u>15. RYK</u>	RYK	related to tyrosine kinase
<u>16. TIE</u>	TIE1	tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains
	TIE2/TEK	tyrosine kinase, endothelial-specific
<u>17. TRK</u>	TRK A/NTRK1	tropomyosin receptor kinase A/neurotrophic tyrosine kinase receptor
	TRK B/NTRK2	
	TRK C/NTRK3	
<u>18. VEGFR</u>	VEGFR1	vascular endothelium growth factor receptor
	VEGFR2	
	VEGFR3	
<u>19. AATYK</u>	AATYK	apoptosis-associated tyrosine kinase
	AATYK2	
	AATYK3*	
<u>20. DKFZ</u>	DKFZ	

Tabelle 2b. Klassifikation der Rezeptortyrosinkinasen nach Robinson et al. 2000. Alle Rezeptortyrosinkinasen bis auf EPHB4*, EPHX* und AATYK3*, von denen keine cDNA Sequenz verfügbar war, wurden mittels Real-time-RT-PCR untersucht.

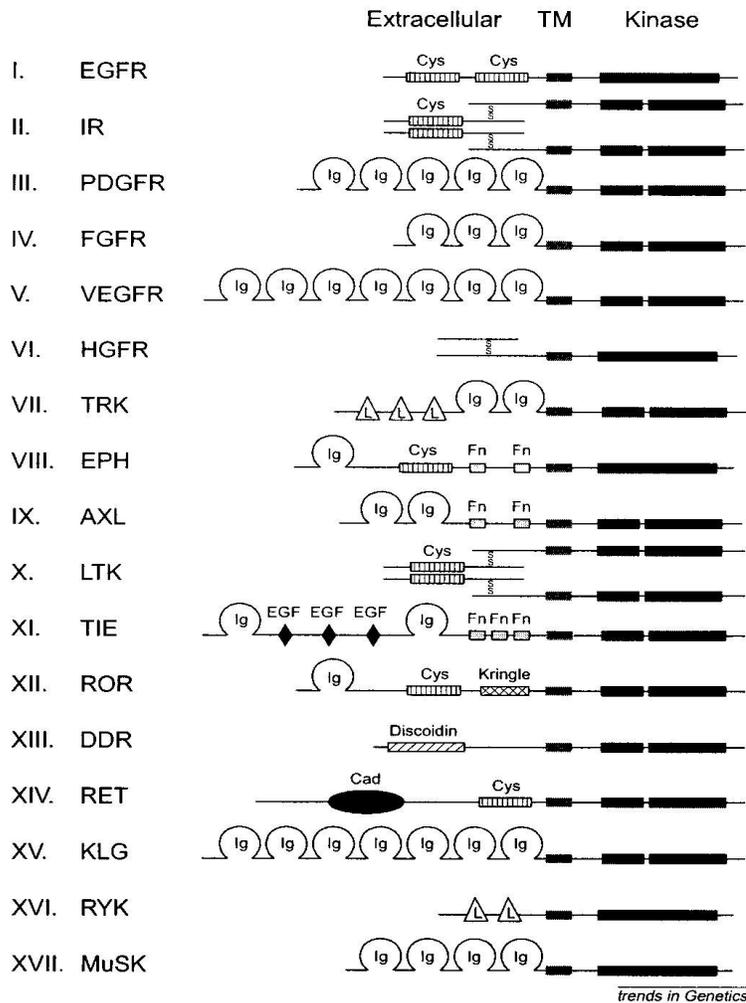


Abbildung 4: Struktur der Rezeptortyrosinkinasen. Abkürzungen: Namen der Rezeptortyrosinkinasen siehe Tabelle 1a/1b. TM: transmembranäre Domäne; Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne; Cys: Cystein-reiche Domäne; L: Leucin-reiche Domäne; Fn: Fibronectin III Wiederholung; EGF: EGF-ähnliche Domäne; Kringle: Kringle Domäne; Discoidin: Discoidin- oder Faktor VIII-Domäne; Cad: Cadherin Wiederholung (aus Robertson et al. 2000).

1.3.2 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion beschreibt die Übertragung von äußeren Reizen, beispielsweise von Wachstums- oder Überlebensstimuli, über Rezeptoren und nachfolgende Signalwege zum Zellkern, wo die Änderung der Genexpression letztendlich eine bestimmte Re-

aktion der Zelle hervorruft. Das Verständnis dieses Vorganges ist insofern von Bedeutung, als die Signaltransduktion auf allen Stufen gestört sein kann und dadurch potentiell zur Krebsentstehung beiträgt.

Signaltransduktion wird eingeleitet durch das Andocken eines spezifischen Liganden, z.B. eines Wachstumsfaktors, an die extrazelluläre Domäne der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase. Diese Ligandenbindung induziert bzw. stabilisiert die Rezeptordimerisierung. Hierbei können sich sowohl Homodimere als auch – wie im Fall der EGFR (epidermal growth factor receptor) Familie – Heterodimere aus unterschiedlichen Familienmitgliedern bilden (*Zwick et al. 2001*). Durch die Dimerisierung werden die beiden katalytischen Domänen der beteiligten Rezeptoren so gegenübergestellt, dass die gegenseitige Transphosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der Aktivierungsschleife ermöglicht wird. Dies führt durch Konformationsänderung zur Freigabe des aktiven Zentrums für die Bindung von Substrat und ATP und somit zur Aktivierung der Tyrosinkinase und der nachfolgenden Autophosphorylierung von Tyrosinresten außerhalb der katalytischen Domäne (*Hunter 2000*). Proteine mit SH2 (Src homology 2)-Domänen oder PTB (Phosphotyrosin bindenden)-Domänen erkennen nun diese phosphorylierten Tyrosinreste des aktivierten Rezeptors und leiten dadurch die weiteren Signaltransduktionswege ein.

Dabei können Proteine mit SH2-Domänen selbst intrinsische enzymatische Aktivität besitzen, die durch Phosphorylierung reguliert wird. In diesem Fall bewirkt ihre Rekrutierung, vermittelt über die SH2-Bindung an die Phosphotyrosine des aktivierten Rezeptors, zum einen ihre Phosphorylierung und damit Aktivierung durch die Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors. Zum anderen gelangen diese Effektorproteine dadurch in die Nähe der Plasmamembran, wo ihre Substrate lokalisiert sind, wie beispielsweise bei Phospholipase C γ oder Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinase). Phosphatidylinositol-3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von Hydroxylgruppen an Position 3 des Phosphatidylinositol (PI) in der Plasmamembran, so dass für die Signaltransduktion wichtige Lipide wie PI-3,4-P₂, PI-3,5-P₂, PI-4,5-P₂ und PI-3,4,5-P₃ (Phosphatidylinositoldi- und triphosphat) entstehen. Die genannten Lipide können u.a. durch Bindung an die „pleckstrin-homology“-Domäne der Serin-Threoninkinase Akt diese Kinase aktivie-

ren, was zur Phosphorylierung weiterer wichtiger Substrate führt. Phospholipase C γ wiederum spaltet PIP $_2$, wodurch die Botenstoffe DAG (Diacylglycerin) und IP $_3$ (Inositoltriphosphat) freigesetzt werden.

Proteine mit SH2-Domäne müssen aber nicht unbedingt selbst katalytische Aktivität besitzen, sondern können auch lediglich als Adaptermoleküle fungieren, die weitere Effektoren rekrutieren. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Grb2-SH2-SH3 Adapter, der einerseits über seine SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste eines aktivierten Rezeptors bindet, andererseits über seine SH3-Domäne mit SOS (son of sevenless) assoziiert ist. SOS, ein GTP-Austauschfaktor (GEF: guanosine nucleotide exchange factor), gelangt dadurch in die Nähe des an der Plasmamembran lokalisierten kleinen G-Proteins Ras (Ratten-Sarkom), katalysiert dort den Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat) und aktiviert somit Ras. Aktiviertes Ras kann dann über Raf die MAPK-Kaskade einleiten, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielt (*Hanahan et al. 2000*). Dabei handelt es sich um ein Kettensystem von intrazellulären Proteinkinasen, die, sobald sie selbst aktiviert wurden, jeweils die nächste Kinase durch Phosphorylierung aktivieren. Extrazelluläre Stimuli führen so zur Aktivierung einer Klasse von Serin/Threonin Kinasen, den sogenannten MAPKKK („mitogen-activated protein kinase“ Kinase Kinase = MEKK). Zu diesen zählt neben MEKK1 auch Raf, welches von Ras aktiviert wird. Diese MAPKKK aktivieren wiederum eine Klasse von Kinasen namens MAPKK (MAPK Kinase = MEK = MKK), die sowohl Serin/Threonin als auch Tyrosinreste phosphorylieren können. Diese MAPKK aktivieren schließlich Serin/Threonin Kinasen genannt MAPK („mitogen-activated protein kinase“), zu denen beispielsweise ERK1, ERK2 („extracellular signal regulated protein kinase“), JNK (jun amino-terminal kinase) und p38 gehören. Durch diese werden schlussendlich am Ende der Kette Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Expression spezifischer Gene steuern.

Neben Raf vermag aktiviertes Ras auch noch andere Effektoren, die für die Organisation des Zytoskeletts wichtig sind, sowie Phosphatidylinositol-3-Kinasen zu aktivieren. Darüber hinaus können Rezeptortyrosinkinasen auch STATs und weitere bei den Zytokinrezeptoren bereits beschriebene Signalwege aktivieren. Letztendlich führt Aktivie-

rung von Rezeptortyrosinkinasen über ein komplexes Netzwerk intrazellulärer Signalkaskaden zur Aktivierung oder Repression der Transkription spezifischer Gene. Dadurch werden bestimmte biologische Antworten der Zelle auf externe Stimuli hervorgerufen, wie Überleben, Zellzyklusprogression, Proliferation und Migration.

Diese komplexen physiologischen Auswirkungen einer Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen machen verständlich, warum eine Deregulation dieser präzise abgestimmten Vorgänge innerhalb der Zelle zur malignen Transformation bzw. zum Tumorwachstum beitragen kann. Die Änderung der Aktivität bestimmter Rezeptortyrosinkinasen stellt somit einen potentiellen Kofaktor bei der Krebsentstehung und Progression dar.

1.3.3 Deregulation von Rezeptortyrosinkinasen

Während in normalen Zellen die Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen und der durch sie vermittelten intrazellulären Signale streng kontrolliert wird, findet man in maligne entarteten Zellen häufig eine Deregulation, meist im Sinne einer konstitutiven oder pathologisch gesteigerten Tyrosinkinaseaktivität (*Zwick et al. 2002*). Zu den Mechanismen, die zu solch einer Überaktivität führen und Rezeptortyrosinkinasen hierdurch onkogenes Potential verleihen können, gehören neben Genamplifikation, Überexpression und Mutationen dieser Rezeptortyrosinkinasen auch autokrine bzw. parakrine Stimulation. Dabei steigern Genamplifikation und Überexpression eines Rezeptors zum einen die Reaktion von Krebszellen auf physiologische Stimuli durch Wachstumsfaktoren, zum anderen erhöht sich durch die Überzahl dieser Rezeptoren auf der Zelloberfläche die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Rezeptordimerisierung, selbst in der Abwesenheit des normalerweise hierzu benötigten Liganden. So kommt es zu einer ligandenunabhängigen, unphysiologischen Rezeptoraktivierung. Unkontrolliertes Zellwachstum und maligne Transformation sind die Folge. Bekannte Beispiele hierfür sind der ERBB2 (HER2) Rezeptor, der v.a. in Brust- und Ovarialkrebs überexprimiert wird und dabei mit einer schlechten Prognose einhergeht, sowie der EGFR Rezeptor, von dem infolge

Genamplifikation in manchen Tumoren zum Teil über 60 Kopien pro Zelle vorliegen können (*Berchuck et al. 1990; Libermann et al. 1985*).

Genmutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen, können sowohl die extrazelluläre Domäne als auch die juxtamembranäre oder die intrazelluläre katalytische Domäne – v.a. die ATP bindende Domäne – betreffen.

Desweiteren wird beim EGFR Rezeptor ebenfalls das Prinzip der autokrinen bzw. parakrinen Stimulation beschrieben. Diese kann auftreten, wenn eine Rezeptortyrosinkinase in Anwesenheit ihres spezifischen Liganden aberrant oder übermäßig exprimiert wird, oder wenn in der Anwesenheit des zugehörigen Rezeptors der entsprechende Ligand überexprimiert wird. So lässt sich z.B. in Lungenadenokarzinomen (*Hsieh et al. 2000*), in Glioblastomen und in Plattenepithelzellkarzinomen des Hals-Nasen-Rachen Bereiches eine Koexpression des EGFR Rezeptors und seines Liganden TGF-alpha (transforming growth factor) beobachten, was zu einer autokrinen Stimulation des EGFR führt und mit einer schlechten Prognose korreliert (*Grandis et al. 1998*). Überexpression der GPCR (G-protein-coupled receptor) stellt einen weiteren Faktor dar, der zur autokrinen Stimulation beiträgt, indem durch eine GPCR induzierte Metalloproteinasen Vorläuferproteine prozessiert und daher vermehrt Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, die dann an EGFR binden können (*Dong et al. 1999*).

Insgesamt gibt es also eine Vielzahl von Möglichkeiten, die zu einer Überaktivität von Rezeptortyrosinkinasen führen und somit unkontrolliertem Zellwachstum und Tumorentstehung Vorschub leisten können.

1.3.4 TRK Familie (Tropomyosin Rezeptor Kinase)

Im Gegensatz zu der PDGFR Familie von Rezeptortyrosinkinasen, deren Verbindung zur AML schon lange Gegenstand der Forschung ist, wurde die Funktion der Neurotrophinrezeptoren außerhalb des Nervensystems, insbesondere in der Hämatopoese und Leukämie, bisher weniger eingehend untersucht. Da die vorliegende Arbeit sich

aber unter anderem intensiv mit dem TRK A Rezeptor und dessen Mutation Δ TRK A auseinandersetzt, ist es notwendig, zunächst die TRK Familie näher zu charakterisieren.

Die Familie der hochaffinen Neurotrophinrezeptoren, beinhaltet drei Mitglieder, TRK A (NTRK1), TRK B (NTRK2) und TRK C (NTRK3), die bevorzugt unterschiedliche Neurotrophin-Wachstumsfaktoren binden. Zur Familie der Neurotrophine zählen NGF (nerve growth factor), der TRK A aktiviert, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und NT-4/5 (Neurotrophin 4/5), die bevorzugt an TRK B binden, sowie NT-3 (Neurotrophin 3), der hauptsächlich über TRK C wirkt, aber auch TRK A und B binden kann (Nakagawara 2001). Neben den hochaffinen Neurotrophinrezeptoren der TRK Familie existiert darüber hinaus der niedrigaffine Neurotrophinrezeptor p75, der zur Familie der TNF (tumor necrosis factor) Rezeptoren/Fas Familie gehört, und dessen Anwesenheit sowohl die Bindungsspezifität der TRK Rezeptoren beeinflusst, als auch ihre Bindungsaffinität und Tyrosinkinaseaktivität verstärkt (Greene et al. 1995).

Die Wirkung der Neurotrophine über TRK Rezeptoren ist wichtig für die Regulation von Differenzierung und Apoptose während der Entwicklung des Nervensystems und für die Aufrechterhaltung des neuronalen Netzwerkes. Dabei fördert NGF über TRK A v.a. Überleben, Neuritenbildung und Differenzierung von sympathischen und sensorischen Neuronen des nozizeptiven und thermoregulatorischen Systems, wohingegen BDNF/TRK B, NT-4/TRK B und NT-3/TRK C überwiegend für sensorische Neurone der Oberflächen- und Tiefensensibilität sowie für Motoneurone bedeutsam sind. Da Neurotrophine nahe des Axonendes an ihre Rezeptoren binden, die entstehenden Signale aber Strecken von bis zu 1m bis zum Zellkörper zurücklegen müssen, nimmt man an, dass die NGF/TRK A Rezeptorkomplexe nach Internalisierung aktiv bleiben, und über retrograden Transport in endozytotischen Vesikeln entlang des neuronalen Mikrotubulussystems bis zum Zellkörper gelangen, wo die Signale letztendlich umgesetzt werden (Wiley et al. 2001). Dabei bestehen Unterschiede in der TRK A vermittelten Signaltransduktion je nach Glycosylierungsgrad und zellulärer Lokalisation des Rezeptors. Die Glycosylierung des Rezeptors verhindert zum einen eine ligandenunabhängige Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität, zum anderen ist sie für die Translokation der TRK

A Rezeptortyrosinkinase an die Zelloberfläche zuständig, wo die Ras/Raf/MAPK Kaskade stimuliert werden kann. Der unglycosylierte Rezeptor hingegen verbleibt intrazellulär und weist eine konstitutive, ligandenunabhängige Tyrosinkinaseaktivität mit konstitutiver Aktivierung der Signalmoleküle Shc und PLC γ auf (Watson *et al.* 1999). Das NGF-induzierte Überleben beruht überwiegend auf der Stimulierung des PI3 Kinase/Akt Weges durch den aktivierten membrangebundenen TRK A Rezeptor an der Zelloberfläche. Der aktivierte Rezeptor wird durch Dynamin-vermittelte Endozytose internalisiert, bleibt innerhalb der Vesikel katalytisch aktiv und bewirkt von dort die NGF-induzierte neuronale Differenzierung (Zhang, Y.-Z. *et al.* 2000). Außerdem verändert sich das zeitliche Muster der Ras/MAPK Aktivierung. Der internalisierte TRK A Rezeptor erreicht zwar eine höhere Maximalaktivierung von Erk, doch hält diese Aktivierung kürzer an, als bei dem oberflächengebundenen Rezeptor.

Mutationen, die den TRK A Rezeptor inaktivieren, führen zum CIPA (congenital insensitivity to pain with anhidrosis) Syndrom, einer autosomal rezessiven Erbkrankheit, bei der es zu unerklärlichen Fieberschüben, Anhidrose, fehlender Reaktion auf Schmerzreize, selbstverstümmelndem Verhalten und mentaler Retardierung kommt (Mardy *et al.* 1999, Miura *et al.* 2000). Dieses Krankheitsbild spiegelt die Bedeutung des NGF/TRK A Systems für Entwicklung und Funktion von Nozizeption und Thermoregulation wieder.

Ursprünglich wurde TRK A als Onkogen in einem Kolonkarzinom entdeckt, wo die Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors mit Teilen des Gens für nichtmuskuläres Tropomyosin fusioniert war und hierdurch die Tyrosinkinase konstitutionell aktiviert wurde (Martin-Zanca *et al.* 1986). Es konnte gezeigt werden, dass diese onkogene Form des TRK A Rezeptors in der Lage ist, auch hämatopoetische Zellen zu transformieren und die Abhängigkeit dieser Zellen von Wachstumsfaktoren aufzuheben (Katzav *et al.* 1989). Ähnliche Mutationen, bei denen Teile von TRK A mit anderen Genen rearrangiert und dadurch aktiviert sind, fanden sich bei Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (Musholt *et al.* 2000, Marta *et al.* 1995, Bongarzone *et al.* 1989).

Wie bereits erwähnt, beschrieb Reuther darüber hinaus kürzlich eine neue Mutation des TRK A Rezeptors bei einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) (Reut-

her et al. 2000). Dabei handelt es sich um die Deletion von 225 Nukleotiden, die in einen Verlust von 75 Aminosäuren, inklusive vier Glycosylierungsstellen, in der extrazellulären Domäne des Rezeptors resultiert. Es wurde gezeigt, dass dieser mutierte TRK A Rezeptor, Δ TRK A genannt, im Gegensatz zum überexprimierten Wildtyp TRK A Rezeptor, in der Lage ist, als Onkogen neben Fibroblasten und epithelialen Zellen auch 32D Zellen, eine myeloische Zelllinie, zu transformieren. Außerdem konnte Δ TRK A in diesen Zellen Apoptose, als Reaktion auf Interleukin 3 Entzug, verzögern und die Abhängigkeit der Proliferation von Wachstumsfaktoren vermindern. Die Ursache hierfür liegt in einer, vermutlich durch mutationsbedingte Veränderung der Tertiärstruktur verursachten, konstitutionell gesteigerten, ligandenunabhängigen Tyrosinkinaseaktivität des TRK A Rezeptors. Dies führt zu Hyperphosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors und zu konsekutiv erhöhter Aktivität der Ras-Raf-ERK Kaskade. Diese Kaskade beeinflusst bei PC12 Phäochromozytomzellen wahrscheinlich v.a. die Differenzierung, kaum hingegen das Überleben, wohingegen bei primären Neuronen und myeloischen Zellen Ras auch für das Zellüberleben erforderlich ist. Darüber hinaus lassen sich Ras-Mutationen häufig bei der AML beobachten.

Neben der Aktivierung des Ras-Signalweges führt eine Aktivierung des TRK A Rezeptors durch seinen Liganden NGF zusätzlich zur Aktivierung von Phospholipase C γ und der Phosphatidylinositol-3-Kinase, die über die antiapoptotisch wirkende Kinase Akt für das Überleben von PC12 Zellen verantwortlich zu sein scheint. In NIH3T3 Mäusefibroblasten und 32D Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation Δ TRK A eine erhöhte Aktivität von Ras/ERK und Akt, nicht jedoch von Stat5 bewirkt, das über Bcl-X antiapoptotisch wirkt (*Reuther et al. 2000*). Dies könnte erklären, warum Δ TRK A transformierte 32D Zellen durch die gesteigerte Ras-Aktivität zwar niedrigere Interleukin 3 Spiegel zum Wachstum benötigen als normale myeloische Zellen, nicht jedoch komplett wachstumsfaktorunabhängig überleben können, da ihnen die hierzu nötige zusätzliche Stat5-Aktivierung fehlt. Trotzdem deutet alles darauf hin, dass die Mutation Δ TRK A durch die konstitutionelle Überaktivität von Ras zur Entstehung und/oder Unterhaltung der Leukämie beitragen kann.

Die Hypothese einer potentiellen Beteiligung von Δ TRK A an der Leukämogenese lenkt daher das Interesse auf die tatsächlichen Häufigkeit dieser Mutation bei der AML. Deshalb bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Untersuchung, ob die von Reuther et al. beschriebene Mutation des TRK A Rezeptors eine einmalige Beobachtung darstellt, oder ob sie sich auch bei anderen AML Patienten nachweisen lässt. Anhand der unterschiedlichen Größe des PCR Produktes von Wildtyp TRK A im Vergleich zu Δ TRK A wurden mittels konventioneller PCR 57 AML Proben auf diese Mutation hin untersucht.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, systematisch zu analysieren, welche Rezeptortyrosinkinasen bei der akuten myeloischen Leukämie exprimiert werden und daher mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapieformen zur selektiven RTK-Inhibition bieten. Durch die Quantifizierung auf mRNA Ebene konnte die Expression in AML Blasten mit der Expression in normalem Knochenmark und in hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34+ Zellen) verglichen werden. Weitere Analysen wurden zum Zusammenhang von Rezeptortyrosinkinasen Expression und Prognose und Differenzierung durchgeführt. Schließlich untersuchte die vorliegende Arbeit die Häufigkeit der Deletionsmutante der Rezeptortyrosinkinase TRK A (Δ TRK A), die leukämogene Eigenschaften besitzt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die K562 Zelllinie wurde ursprünglich von einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie in der Blastenkrise isoliert, während KG1 Zellen von einem Patienten mit einer Erythroleukämie, die sich zu einer akuten myeloischen Leukämie entwickelte, stammen. K562 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS (fetales Kälber Serum) und 1% Penizillin/Streptomycin kultiviert, KG1 Zellen in IMDM (Iscove's modified Dulbecco's Medium) mit 20% FKS und 1% L-Glutamin.

2.2 Behandlung der Zellen mit ATRA

Da sich die Expression von TRK A in K562 und KG1 Zellen durch ATRA (all-trans-Retinoinsäure) induzieren lässt (*Xie et al. 1997, 2000*), wurden jeweils ca. 5×10^6 Zellen pro 10 ml in Anwesenheit von je $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$ und $10^{-9}M$ ATRA für drei Tage inkubiert und anschließend die RNA isoliert.

2.3 RNA Isolation

Die Isolation der RNA mit TRIzol Reagens (Total RNA Isolation Reagent; GIBCO BRL) erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenem Protokoll:

1. **Homogenisation**

Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml TRIzol Reagens pro $5-10 \times 10^6$ Zellen aufgenommen und die Zellen lysiert.

2. **Separationsphase**

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform, Schütteln, erneuter zwei-dreiminütiger Inkubation und Zentrifuga-

tion (12000 x g für 15 Min bei 4°C) ließ sich die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, abnehmen.

3. RNA Präzipitation

Die RNA wurde durch Mischen mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach anschließender Inkubation (10 Min, Raumtemperatur) und Zentrifugation (12000 x g für 10 Min bei 4°C) war das RNA Präzipitat als Pellet sichtbar.

4. RNA Waschen

Nach Entfernung des Überstandes wurde die RNA in 1 ml 75% Ethanol gewaschen, gevortext und erneut zentrifugiert (7500 x g für 5 Min bei 4°C).

5. Wiederauflösen der RNA

Nach Lufttrocknung, Lösung des RNA Pellets in 20µl DEPC RNase freiem Wasser und anschließender Inkubation (10 Min bei 55-60°C) ließ sich der RNA Gehalt photometrisch bestimmen.

So wurde in einem Photometer der Absorptionswert der verdünnten Proben für Licht der Wellenlänge 260 nm und 280 nm gemessen und gemäß der Formel $A_{260} \times 40 \times$ Verdünnungsfaktor die RNA Konzentration der jeweiligen Proben in µg/ml berechnet. Die Ratio A_{260}/A_{280} gilt als Maß für die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,7 und 2 betragen. Dies traf auf alle Proben zu.

2.4 Reverse Transkription

Die Methode der reversen Transkription beruht auf der Umschreibung von RNA in die komplementäre DNA. Dabei dient die Bindung des Primers an seine spezifische RNA Sequenz als Ausgangspunkt für die Anlagerung der entsprechenden Desoxynukleotide an den RNA Strang, die dem Prinzip der komplementären Basenpaarung gehorcht. Diese Nukleotide werden durch eine RNA abhängige DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase, zu einem DNA Strang verknüpft.

Die reverse Transkription erfolgte nach dem Protokoll der Firma Promega mit M-MLV (Moloney murine leukemia virus) Reverser Transkriptase. Hierbei wurde jeweils 1 µg RNA mit 1µl „Random Hexamers“, 1µl RNase out und DEPC-H₂O zu einem Gesamtvolumen von 17,75µl versetzt und anschließend 5 Min bei 70°C, 5 Min auf Eis und 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 7,25 µl Master-Mix – bestehend aus 5µl Puffer (5x), 1 µl M-MLV Reverser Transkriptase, und 1,25 µl dNTP's (Desoxynukleotidtriphosphate) – hinzugefügt und eine Stunde im Wasserbad (42°C) sowie 15 Min bei 70°C inkubiert. Zuletzt wurde die entstandene cDNA mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 200µl verdünnt und bei –20°C gelagert.

Um zu überprüfen, ob die K562 bzw. KG1 Zellen tatsächlich TRK A exprimiert haben, wurde abschließend die in der cDNA enthaltene TRK A mRNA mit Hilfe TRK A spezifischer Primer im „ABI prism 7700 sequence detector“ (PE Biosystems, Foster City, CA) durch Real-time-RT-PCR (s.u.) amplifiziert. Die amplifizierte TRK A Sequenz wurde mittels SYBR Green detektiert, einem fluoreszierenden Farbstoff, der sich während der Polymerisationsphase in den neuentstehenden DNA Doppelstrang einlagert. Für die weiteren Experimente wurde die von den mit 10⁻⁶ M ATRA behandelten KG1 Zellen gewonnene cDNA ausgewählt, da diese die höchsten TRK A Spiegel aufwies.

2.5 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Ziel der PCR ist es, spezifisch eine gewünschte DNA Sequenz zu amplifizieren. Prinzipiell wird dabei zunächst in der Denaturierungsphase der DNA Doppelstrang durch Erhitzen vollständig in die beiden Einzelstränge zertrennt. Nach einer raschen Temperaturabkühlung binden dann Vorwärts- und Rückwärtsprimer jeweils an die komplementären Sequenzen der beiden einzelnen DNA Stränge. Anschließend lagern sich von den Primern ausgehend die komplementären Nukleotide jeweils an die beiden bereits vorhandenen DNA Stränge an und werden durch eine hitzestabilen DNA-Polymerase, nach Temperaturerhöhung auf das Enzymoptimum, zu einem neuen komplementären DNA Strang verknüpft. Klassischerweise verwendet man hierzu das Enzym Taq-Polymerase,

das ursprünglich aus dem in heißen Quellen lebendem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Danach löst sich durch erneute, diesmal kürzere, Temperaturerhöhung der neusynthetisierte, kürzere DNA-Strang von seiner Matrize wieder ab. Es schließen sich wiederum die Schritte Primerbindung und DNA-Synthese an. Dieser Zyklus wird so oft wiederholt, bis genügend Kopien der nachzuweisenden DNA Sequenz hergestellt wurden.

Im konkreten Experiment wurde für die PCR der bei *Reuther et al.* beschriebene Primer für TRK A benutzt. Dabei gilt die Sequenz 5'-TCC CGG CCA GTG TGC AGC TG-3' als Vorwärtsprimer, die Sequenz 5'-AGG GAT GGG GTC CTC GGG GTT GAA-3' als Rückwärtsprimer (GIBCO BRL Custom Primers, Primer Number: B7901 B01 (forward), B7901 B02 (reward); desalted). Dieses Primerpaar umfasst die Nukleotide 971-1296 des TRK A Gens (M23102). Da die Deletion bei der Δ TRK A Mutation die Basenpaare 1030-1254 betrifft, ergibt sich für das PCR-Produkt des normalen Wildtyp TRK A eine Länge von 326 bp, wohingegen die Δ TRK A Mutation ein um die deletierten 225 Basenpaare kürzeres PCR Produkt von nur 101 bp Länge liefert.

Da es wiederholt nicht möglich war, mittels Taq Polymerase die gesuchte TRK A Sequenz zu amplifizieren, wurde auf die Verwendung von Pfu Polymerase übergegangen, die schließlich eine Amplifikation von TRK A ermöglichte. Nach weiterer Optimierung ergab sich letztendlich folgendes PCR Protokoll, das zunächst mit der cDNA aus den mit 10^{-6} M ATRA behandelten KG1 Zellen überprüft wurde:

ddH ₂ O:	14,3 μ l
Pfu Puffer (10x ; Stratagene):	2 μ l
dNTP's (Desoxynukleotidtriphosphate, 10 mM) :	0,8 μ l
Primer (vorwärts) :	0,8 μ l
Primer (rückwärts) :	0,8 μ l
Pfu turbo (2,5 U/ μ l; Stratagene) :	0,3 μ l
cDNA:	1 μ l
	= 20 μ l

Thermocyclerprotokoll:

1. 95°C: 1 Min
2. 95°C: 1 Min 30 Sec
3. 58°C: 1 Min
4. 72°C: 1 Min
5. 72°C: 10 Min

Es wurden 35 Zyklen (Schritt 2-4) durchgeführt. Insgesamt wurde cDNA von 57 anonymisierten Proben von AML Patienten aus Münster untersucht.

2.6 Gelelektrophorese

In einem elektrischen Feld werden DNA Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA Fragmente wandern dabei in einem Gel von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode, und zwar um so schneller, je kürzer die DNA Stücke sind.

Im eigentlichen Experiment wurden 5 µl des PCR Produktes mit 2 µl Loading Buffer gemischt und zusammen mit einem 100 bp-Größenmarker durch ein 1% Agarosegel (250ml, 15 bzw. 20 „Wells“) bei 150 V laufen gelassen. Anschließend erfolgte die Färbung des Gels in Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert. Die so entstandenen Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe der „Multi Analyst Software“ als Bild abgespeichert.

2.7 Real-time-RT-PCR

Der Taqman Assay dient der Quantifizierung spezifischer mRNAs, z.B. aus Tumorproben, und damit der Bestimmung der relativen Expression des jeweiligen Zielgens in dem untersuchten Gewebe. Ausgangspunkt dieser Methode ist es, die isolierte mRNA

durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, in die komplementäre cDNA umzuschreiben (Abb. 5). Diese cDNA wird in der sich anschließenden PCR (s.o.) mittels einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, in diesem Fall der Taq Polymerase, amplifiziert. Die PCR erfolgt in einer verschlossenen „96-Well“ Mikroplatte mit Hilfe eines kombinierten Thermocyclers/Detektors, beispielsweise dem ABI Prism 7700. Spezifität wird zum einen durch zwei bestimmte Primer erreicht, welche die Endpunkte der zu amplifizierenden Zielsequenz definieren, zum anderen durch eine als Sonde („Probe“) dienende dritte Oligonukleotidsequenz, die komplementär zu einer kurzen Sequenz innerhalb des Amplikons ist. Um das Problem einer Kontamination durch genomische DNA zu umgehen, werden Primer und Sonde so gewählt, dass sie einen Exon-Exon Übergang überspannen. Die Sonde enthält an ihrem 5'Ende einen fluoreszierenden „Reporter“ Farbstoff und an ihrem 3'Ende einen „Quencher“, durch dessen Nähe zum „Reporter“ das Fluoreszenzsignal unterdrückt wird.

Nach der Denaturierungsphase kommt es zur Anlagerung der beiden Primer und der Sonde an die jeweiligen komplementären Sequenzen der cDNA. Danach erfolgt von den Primern ausgehend die Synthese des komplementären DNA Strangs durch die Taq Polymerase. Dieses Enzym besitzt zusätzlich eine 5'Exonukleaseaktivität, welche doppelstrangspezifisch ist. Folglich wird nur die an die Zielsequenz gebundene Sonde durch dieses Enzym umgesetzt, nicht jedoch die freie Sonde, so dass ein fälschlicherweise zu hohes Fluoreszenzsignal vermieden wird. Erreicht die Taq Polymerase die hybridisierte Sonde, löst sie zunächst das 5'Ende der Sonde ab und spaltet die Sonde schließlich, so dass „Reporter“ und „Quencher“ voneinander getrennt werden. Dadurch wird das nach Immission vom angeregten „Reporter“ emittierte Fluoreszenzsignal nicht mehr vom „Quencher“ unterdrückt und kann detektiert werden (*Bustin 2000*). Dieses Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge des generierten PCR Produktes. Innerhalb des ABI Prism 7700 wird jeweils ein Laser auf jedes der 96 „Wells“ gelenkt und die resultierende Fluoreszenzemission des „Reporters“ für jedes „Well“ in jedem Zyklus der fortschreitenden Amplifikation gemessen.

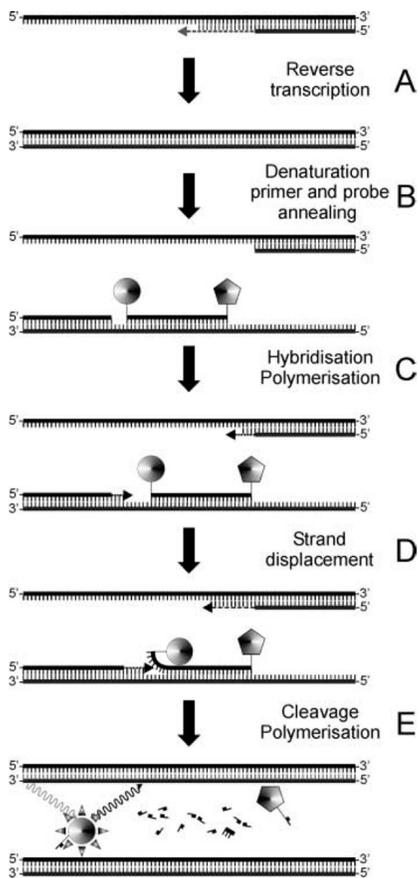


Abbildung 5: Taqman Assay. **A:** Bei der reversen Transkription wird eine cDNA Kopie der mRNA hergestellt. **B:** Primer und Sonde („Probe“) lagern sich an die komplementären Sequenzen der cDNA an. Durch die Nähe von „Quencher“ und „Reporter“ wird das vom Reporterfarbstoff ausgehende Fluoreszenzsignal unterdrückt. **C:** Die Polymerisation durch die Taq Polymerase erfolgt bei derselben Temperatur wie der vorangehende Anlagerungsschritt. **D:** Die Taq Polymerase entfernt und hydrolysiert die Sonde. **E:** Durch die Trennung vom „Quencher“ wird die Emission und anschließende Detektion des vom angeregten „Reporter“ ausgehenden Fluoreszenzsignals ermöglicht (nach Bustin 2000).

Je größer die ursprüngliche Zahl der Kopien der Zielsequenz zu Reaktionsbeginn ist, also je mehr spezifische cDNA in der untersuchten Probe vorlag, desto weniger PCR Zyklen werden benötigt um einen definierten Schwellwert zu erreichen, an dem das empfangene Fluoreszenzsignal als statistisch signifikant oberhalb des Hintergrunds angesehen wird (Gibson *et al.* 1996). Dieser Punkt, der sogenannte CT-Wert („threshold cycle“), liegt in der exponentiellen Phase der PCR Amplifikation. Daher verhält sich die Anzahl der zum Überschreiten des Schwellwertes benötigten PCR Zyklen, also der CT

Wert, umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen Kopienzahl der Ziel-cDNA, die wiederum von der Ausgangsmenge der spezifischen mRNA abhängt (*Higuchi et al. 1993*). Die für die einzelnen Patientenproben ermittelten CT Werte lassen somit anhand der für die verwendeten Primer und Sonden ermittelten, spezifischen Standardkurven Rückschlüsse auf die initiale Kopienzahl der Ziel-mRNA und damit auf die Höhe der Genexpression zu.

Konkret wurden insgesamt 85 AML Proben von Patienten untersucht, die an der AMLCG (AML Cooperative Group) Studie zur Therapieoptimierung teilgenommen hatten (*Buchner et al. 1999*) (Tab. 3). Die mittlere rückfallsfreie Überlebenszeit bzw. die Remissionsdauer (in 36 Fällen bekannt, in 49 fehlend) bei den AML Patienten betrug 272 Tage (Median: 211; Min.: 0, Max.: 869).

		N	%
<u>Geschlecht</u>	weiblich	33	47,8
	männlich	36	52,2
	gesamt	69	100,0
	unbekannt	16	
<u>FAB</u>	M0	3	4,4
	M1	13	19,1
	M2	20	29,4
	M3	4	5,9
	M4	18	26,5
	M5	9	13,2
	M6	1	1,5
	Gesamt	68	100,0
	unbekannt	17	
<u>komplexer Karyotyp</u>	ja	7	13,7
	nein	44	86,3
	gesamt	51	100,0
	unbekannt	34	

Tabelle 3.1. Patientencharakteristika: Verteilung von Geschlecht, FAB Subtypen und komplexem Karyotyp mit mehr als 3 chromosomalen Aberrationen.

	N	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
initiale Leukozytenzahl (x/ μ l)	69	88493	38000	172272	1100	1017000
initiale Thrombozytenzahl (x/ μ l)	69	67246	47000	57417	7000	248000
initialer Blastenteil im Blut (%)	69	55	65	33	0	96
Blastenteil im Knochenmark (%)	64	79	89,5	20	20	100
LDH (U/ml)	60	615	421	417	88	1665

Tabelle 3.2. Patientencharakteristika: Klinische Laborparameter.

Zusätzlich wurden zum Vergleich 7 normale Knochenmarksproben sowie 5 verschiedene Populationen CD34+ Stammzellen analysiert, die von Patienten mit nicht-hämatologischen Erkrankungen aus Münster stammen, denen aus diagnostischen Gründen Knochenmark entnommen wurde. Alle Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

Aus den heparinisierten Knochenmarksproben wurden mittels Dichtezentrifugation die AML Blasten zur Zeit der Diagnosestellung angereichert und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Durchführung der weiteren Experimente eingefroren.

Die RNA Isolation aus den gefrorenen Blasten erfolgte mittels TRIzol Reagenz (Life Technologies, Inc.). Dann wurde unter Verwendung von „Random Hexamers“ und Superscript II Reverser Transkriptase (Gibco Life Technology) jeweils $1\mu\text{g}$ der Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Danach schloss sich die Verdünnung dieser cDNA mit ddH₂O auf ein Volumen von $200\mu\text{l}$ sowie die anschließende PCR Reaktion mit jeweils $2,5\mu\text{l}$ dieser Lösung an. Die Amplifikation erfolgte im ABI Prism 7700 sequence detector (PE Biosystems, Foster City, CA) bei einem Gesamtvolumen von $22,5\mu\text{l}$ mit jeweils $2,5\mu\text{l}$ der cDNA und $20\mu\text{l}$ einer Mischung aus Taq Man Universal Master Mix ($10\mu\text{l}$), Vorwärts- und Rückwärtsprimer ($10\mu\text{M}$) (je $1\mu\text{l}$ Primer), Sonde ($1\mu\text{l}$) und ddH₂O ($7\mu\text{l}$). Bei den Sonden der untersuchten Rezeptortyrosinkinasen, Zykline und GAPDH (Glyce-

rinaldehydphosphatdehydrogenase) als internem Standard wurden FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) bzw. bei GAPDH VIC als „Reporter“ Farbstoff am 5'Ende der Sonde und TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) als „Quencher“ am 3'Ende verwendet (Tab. 4). Jede der 85 AML cDNA Proben wurde für jede Rezeptortyrosinkinase auf derselben Reaktionsplatte analysiert, bzw. bei den Rezeptoren EGFR und c-KIT zusätzlich auf einer zweiten, unabhängig von der ersten Platte präparierten und ausgewerteten Platte untersucht.

Außerdem wurde auf jeder Platte eine doppelte Verdünnungsreihe (100, 25, 6,25, 1,60, 0,39, 0,10) einer aus einem Tumorgemisch gewonnenen Standard-cDNA mitgemessen. Hieraus konnte für jede Platte eine Standardkurve für die einzelnen spezifischen Primer und Sonden erstellt werden, aus der sich die relative Menge der jeweiligen Zielsequenz in den untersuchten Patientenproben berechnen ließ. Zur Ermittlung der relativen Genexpression wurde die so bestimmte Menge der Zielsequenz jeweils dividiert durch die Menge an GAPDH in den entsprechenden Patientenproben, um so eventuelle Unterschiede in der Effektivität der reversen Transkription bzw. der mRNA Mengen zwischen den verschiedenen Patientenproben auszugleichen. Die relative Genexpression einer bestimmten Rezeptortyrosinkinase ergab sich somit aus der Höhe der Zielgenexpression im Vergleich zur Standard cDNA geteilt durch die Menge an GAPDH in dieser Probe im Vergleich zur Standard cDNA.

Die so gewonnenen Daten für die relative Expression der einzelnen Rezeptortyrosinkinasen bzw. der Zykline in den 85 untersuchten AML Proben ließen sich mit Hilfe der SPSS 10.0 Statistiksoftware auswerten. Hierbei wurden zum analytischen Vergleich von 2 Variablen der Mann-Whitney-U-Test bzw. beim Vergleich von mehr als 2 Variablen der Kruskal-Wallis-Test sowie für die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse der log-rank Test angewendet. Dabei galt ein P-Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>AATYK</u>	NM 004920	CCT GGC TCA CTG CAA GTA CAG A	CCG ACC AGC TGT GGG TGC CTC T
		ACA CAT TCC CGC TCT TGG TCT	
<u>AATYK2</u>	NM 014916	AAT GCC CCC GAC CCA CT	TGT TTG ACC AGG AGA CCC CAA CCA AA
		GCA CGC CTC TCC TCC ACA	
<u>ALK</u>	NM_00004304	TGG CTT TCT CCG GCA TCA	ATT GTG TAC CGC CGG AAG CAC CA
		TCT GCA TGG CTT GCA GCT C	
<u>AXL</u>	NM_001699	CAG CGC AGC CTG CAT GT	CAG GGC TGA ACA AGA CAT CCT CTT TCT CC
		GGC GTT ATG GGC TTC GC	
<u>c-KIT</u>	NM_000222	CGC CTG GGA TTT TCT CTG C	TTC TGC TCC TAC TGC TTC GCG TCC A
		TCA CAG ATG GTT GAG AAG AGC CT	
<u>CSF1R</u>	NM_005211	GCA GCG TTG ATG TTA ACT TTG ATG	CTT CCT CCA ACA CAA CAA CAC TAA GCT CGC
		GTT ATT ATG AAA GTC AGA TTG TTG AGG G	
<u>DDR1</u>	NM_0013993	TCA TCA TTG CCC TCA TGC TC	CAC TGG CGC AGG CTC CTC AGC
		AAC ACC CTC CGT TCA GCC T	

Tabelle 4. Sequenzen der für die Real-time-RT-PCR verwendeten Primer und Sonden („Probes“).

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>DDR2</u>	NM_006182	GGG CAG CAG TTT GTA CTC CCT	GCT GTT GGA TAC AGC ATG ACA GAA GGG
		GAC ACA CCA TCG GTC AAT TGG	
<u>DKFZ</u>	NM_018423	CAG AGA ACA AAG AAC TCA ACA GCA G	GTT CTG GAC CTC AAG GCA TTG CCC C
		GGT CCC TAG GTG GAG GAA CAG	
<u>EGFR</u>	NM_005228	GCA CCT ACG GAT GCA CTG G	TTG AAG GCT GTC CAA CGA ATG GGC
		GGC GAT GGA CGG GAT CTT A	
<u>EPHA1</u>	nm_005232	AGC CTG GCT ATG AGG AAG GTG	CAG TGG CGA AGC ATG TGT TGC TG
		CAT CCG GTA GGA GCC GCT A	
<u>EPHA2</u>	nm_004431	TGC CAG GCA CCC TAC GAG	GGA TGC CTG CCA GGC CTG CTC GC
		ATG GCA GCG TGG GCT CAG	
<u>EPHA3</u>	nm_005233	CCA AGT GGT CAT GAT CGC C	TTT CAG CGG CAG TAG CAA TTA TTC TCC TCA
		CCC AAT CAA AAC ATA GAT GAC AAC A	
<u>EPHA4</u>	nm_004438	TCA GTG AGC CCT TGG AGG TTA C	ACC ACC ACA GTG CCT TCC CGG ATC AT
		ACT GTG GAG TTA GCC CCA TCT C	

Tabelle 4. Fortsetzung.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>EPHA5</u>	L36644	TGG ATA CAG TTC AAT GGA CGC T	CAG GTG ACC TTG GAG GAT TTG AGA CGG C
		GAT CTT CTT CTG GTG ACC GAC AA	
<u>EPHA6</u>	AC011783	GGG CAG GGT TTT TAA ATA GCA TC	ATT CCT GCT GGC AGA CCA GTA ATG ATT GTG
		AAA AGG AGT CTA GGG ATC CAT TCT C	
<u>EPHA7</u>	NM_004440	GAT CCC AGA GGC TCT TTG CTG	TCA CCA CTG GTC AAG CAG CTC CCT C
		TCC TTC ATT ACT CCG CTC ACT TG	
<u>EPHA8</u>	AB040892	CGC AGT TTC ACT CGG GAG AT	AGA AAA TCA TCG GCT CTG GAG ACT CCG
		CAG CCT CCC GTA GCA GAC TTC	
<u>EPHB1</u>	NM_004441	GAA CCC GGC AAG TCT CAA GA	ATC ACC GCC GTG CCT TCC CA
		TGG TAA AGG CCG TGA AGT CTG	
<u>EPHB2</u>	AF025304	GGT CTT CCT CAT TGC TGT GGT T	TCA TCG CCA TCG TGT GTA ACA GAC GG
		GTA CTC CGA GTC AGC ACG CTC	
<u>EPHB3</u>	AF025304	CGG AAT TGT CAT GTG GGA GG	TAC TGG GAC ATG AGC AAC CAG GAT GTC A
		TGC AGT GCT GTG GGA CAG TC	

Tabelle 4. Fortsetzung.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>EPHB6</u>	NM_004445	TGG ACT ATC AGC TCC GCT ACT ATG	CCA GGC AGA AGA CGA ATC CCA CTC CTT
		GTG GCA GTG TTG GTC TCG C	
<u>ERBB2</u>	NM_004448	TGA GAA GTG CAG CAA GCC CT	TGC CCG AGT GTG CTA TGG TCT GGG
		ACC TCT CGC AAG TGC TCC AT	
<u>ERBB3</u>	nm_001982	ACG GTT ATG TCA TGC CAG ATA CAC	CCT CAA AGG TAC TCC CTC CTC CCG G
		CTG AGA CCC ACT GAA GAA AGG G	
<u>ERBB4</u>	nm_005235	CAG GCT TTC AAC ATC CCA CC	CCA TCT ATA CTT CCA GAG CAA GAA TTG ACT CGA ATA GG
		GAG GGC TGT GTC CAA TTT CAC	
<u>FGFR1</u>	M34641	GCA CGG GAC ATT CAC CAC A	ACT ATA AAA AGA CAA CCA ACG GCC GAC TGC
		GGG TGC CAT CCA CTT CAC A	
<u>FGFR2</u>	NM_000141	AAT GAA TAC GGG TCC ATC AAT CA	ACG TAC CAC CTG GAT GTT GTG GAG CG
		GAG GAT GGG CCG GTG AG	
<u>FGFR3</u>	NM_000142	CGG GCA ATT CTA TTG GGT TTT T	GGT GGT GCT GCC AGC CGA GGA GG
		CTG CAT ACA CAC TGC CCG C	

Tabelle 4. Fortsetzung.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>FGFR4</u>	NM_002011	CTG CAG AAG CTC TCC CGC T	CCC TCT GGC CCG ACA GTT CTC CC
		TGA GCT TGA CTT GCC GGA A	
<u>FLT3</u>	NM_004119	CAC CGG ATA CTA CAC TTG TTC CTC T	TTT GGT TAC CAT CGT AGG AAA GGG ATT TAT AA
		TTG GTC AAT TTC ATA ATC TTC ACT TGA	
<u>IGF1R</u>	NM_000875	GCC TCT GTG AAC CCG GAG TA	AGC GCT GCT GAT GTG TAC GTT CCT GA
		CCG AGC CAC CTC CCA CT	
<u>INSR</u>	NM_000208	TAC CTC CGT TCT CTG CGG C	CTG AGA ATA ATC CTG GCC GCC CTC C
		TCT GAA TCA TCT CTT GAA GGG TAG G	
<u>IRR</u>	J05046	TCA CCA TCC CCA TAT CCC CT	ACG TCC ATC AAC AAG AGC CCC CAA AG
		CGG TGC CGC CCT GAG	
<u>LTK</u>	NM_002344	CCA GAA GGC ATG GAG CTA GC	ACC TGC ATG GAC CTG CAC AAG CC
		CAT CAG AAC CAG AGG GCC TG	
<u>MER</u>	NM_006343	TCT TCC TCC CCG CGC T	TGG CGT AGA GCT ATC ACT GAG GCA AGG
		AGC GGG TAA GGC TTG GCT T	

Tabelle 4. Fortsetzung.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>MET</u>	NM_000245	TGA TTG TGG AGC ATA CAT TAA ACC A	ATC ACT GGG AAG AAG ATC ACG AAG ATC C
		GAC TGC AGG ACT GGA AAT GTC TG	
<u>MUSK</u>	NM_005592	GAA TAT GTG AGA GAC ATC GGA GAG G	AGC GTT TGG AAG GGT GTT TCA AGC AA
		AGG GAA GTA AGC CTG GTG CG	
<u>NTRK1/ TRK A</u>	M23102	GAT CTT CAC CTA CGG CAA GCA	TGG TAC CAG CTC TCC AAC ACG GAG G
		CCT GCG TGA TGC AGT CGA T	
<u>NTRK2/TRK B</u>	NM_006180	TCC CTT CCA CAG ACG TCA CTG	CGG TCG GGA ACA TCT CTC GGT CTA TG
		ACA GAC GCA ATC ACC ACC AC	
<u>NTRK3/TRK C</u>	NM_002530	CAA ATA TGG TCG ACG GTC CAA	TTT GGA ATG AAG GGT CCC GTG CT
		GCT GAG TCC TCC TCA CCA CTG	
<u>PDGFRA</u>	NM_006206	CCG TGT GAC TTT CGC CAA A	TGG AGG AGA CCA TCG CCG TGC
		CAA GGA GAT TCT TAG CCA GGC A	
<u>PDGFRB</u>	NM_002609	CCC TGT CCA CGC GCA	CGT GTC GGA GAC CCG GTA TGT GTC A
		TTC ACG CGA ACC AGT GTC AG	

Tabelle 4. Fortsetzung.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>PTK7</u>	NM_002821	CCC AGC CGG CAG CAT	AGG CGC AAG CCC GTG TCC AA
		GTG AAC TTG AGC TTT TCC AGC A	
<u>RET</u>	x12949	TGC TTC TGC GAG CCC G	CAT CCA GGA TCC ACT GTG CGA CGA
		GAT CAC CGT GCG GCA CA	
<u>RON</u>	NM_002447	ACA TGG GCA CAA TGG ATG G	CCT GCA GGT GGA GCT GGT CAG GTC AC
		GAC GAC TGA CAT CCC GCT G	
<u>ROR1</u>	NM_005012	AGT CTT GTT TGT CAA GTT TGG CC	CCT CCC ACT GCA AGT CCA GGA TAC TCA GA
		CAT GCA ATC CCT CTG TAT GGC	
<u>ROR2</u>	NM_004560	ACG GGA TGA AGA CCA TTA CCG	CCT GTT TGT GCG GCT GGG TCC A
		AGT TAT GAT TTG GGC TGT GCG	
<u>ROS1</u>	NM_002944	TGG CTG ATT CAT ACA ATG GGT ATG	CCT GAG AGA TGG CAT TTA TAG AGC AGA CCT TCC T
		TGC ACA CCG GCC AGT G	
<u>RYK</u>	S59184	GCA GTA GTT CCC AAG GGC TG	CTC AGC CAT CCA CCC AGA CGA CTC AGT A
		TTG TTG GGC GTG TCT GCT C	

Tabelle 4. Fortsetzung.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>TEK</u>	NM_000459	TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AA	TGA TAG TCC GGA GAT GTG AAG CCC AGA A
		TGG CAG ACA CCA TTG TTC ATA CA	
<u>TIE</u>	NM_005424	ACC ACA GCT GAG TTC GAG GTG	CCC GCT TGG TTC TTG CGG ACA
		ACA CGG CAC TCC CAG AAC C	
<u>TYRO3</u>	NM_006293	TGG CCG AGC TCT GCT ACA GT	CAG GTG ACA CAG GCC CCA GGA GG
		CAA CAG CCA GGA CTT CCC A	
<u>VEGFR1</u>	NM002019	CTG GCA CCC CTG TAA CCA TAA	CAT TCC GAA GCA AGG TGT GAC TTT TGT TC
		GTT GCT GTC AGC ATC CAG GA	
<u>VEGFR2</u>	NM002253	TGT GGC TCT GCG TGG AGA	CGC CTC TGT GGG TTT GCC TAG TGT TTC
		TGA GCC TGG GCA GAT CAA G	
<u>VEGFR3</u>	NM_002020	ACA TCA AGG CAC GCA TCG A	CGT GTT CGT GAG AGA CTT TGA GCA GCC
		TTG ACC AAG AGC GTG TCA GG	
<u>GAPDH</u>	NM_002046	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC
		GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	

Tabelle 4. Fortsetzung.

Gen	Genbank-nummer	Primersequenz: vorwärts (oben) / rückwärts (unten)	Sonde
<u>Zyklus A1</u>	NM_003914	GGG CTC CCA GAT TTC GTC T CTG CAG TGC ATT GCT TCA GA	CCA GCA GCA GCC CGT GGA
<u>Zyklus A2</u>	NM_001237	AGC TGC CTT TCA TTT AGC ACT CTA TTA AGA CTT TCC AGG GTA TAT CCA GTC	TCA CGG GAC AAA GCT GGC CTG
<u>Zyklus C</u>	NM_005190	AGC TGT GTT CCA TGG CAG G GCG CTC CTT CAA CAG ATC TTG	TTG GCA GAG CTC CCA CTA TTT GCA ATG
<u>Zyklus D1</u>	NM_053056	ACT ACC GCC TCA CAC GCT TC CTT CGA TCT GCT CCT GGC AG	CCA GAG TGA TCA AGT GTG ACC CGG ACT
<u>Zyklus D2</u>	NM_001759	CAT GCT CAG ACC TTC ATT GCT C CGA TCA TCG ACG GTG GGT	TGT GCC ACC GAC TTT AAG TTT GCC ATG
<u>Zyklus D3</u>	NM_001760	AAA ACT GTG CAT CTA CAC CGA CC CCC TAG GAC CAG CAC CTC C	CCC CGC CAG TTG CGG GAC T
<u>Zyklus E1</u>	NM_001238	CTC CAG GAA GAG GAA GGC AA TCG ATT TTG GCC ATT TCT TCA	CGT GAC CGT TTT TTT GCA GGA TCC A
<u>Zyklus E2</u>	NM_057749	TGT TGG CCA CCT GTA TTA TCT GG ATC TGG AGA AAT CAC TTG TTC CTA TTT C	CAG TCC TTG CAT TAT CAT TGA AAC ACC TCA CAA
<u>p21WAF/CIP</u>	NM_000389	CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA AAG ATC AGC CGG CGT TTG	CGG CAG ACC AGC ATG ACA GAT TTC TAC C

Tabelle 4. Fortsetzung.

3. Ergebnisse

3.1 RT-PCR-Analyse von 55 Rezeptortyrosinkinasen bei der AML

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels quantitativer RT-PCR die Expression von 55 verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zu bestimmen. Dabei wiesen die Messergebnisse der quantitativen Real-time-RT-PCR ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit auf, was für die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der angewendeten Methode spricht (Abb. 6). Die so gewonnenen Daten für die Expression der Rezeptortyrosinkinasen bei der AML wurden mit der Expression bei normalen hämatopoetischen Zellen verglichen, sowie zu FAB Klassifikation, Zyklinexpression und Patientenüberleben in Beziehung gesetzt.

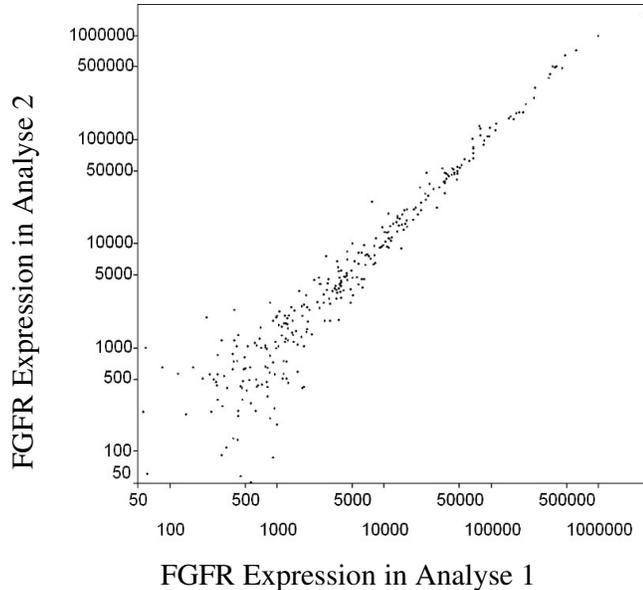


Abbildung 6. Korrelation der Messergebnisse für die Expression von Rezeptortyrosinkinasen am Beispiel des FGF-Rezeptors. Die Graphik zeigt das hohe Maß an Korrelation zwischen den Messergebnissen für die Expression von Rezeptortyrosinkinasen aus zwei unabhängigen Real-time-RT-PCR Analysen.

3.1.1 Vergleich der Expression von Rezeptortyrosinkinasen zwischen AML, normalem Knochenmark und CD34+ Zellen

In den untersuchten AML Patientenproben (n = 85) war eine Expression von folgenden 18 Rezeptoren bei über 50% der Fälle nachweisbar:

AATYK2 (Median: 0,1438), c-KIT (9,0552), CSF1R (2,4109), DDR1 (0,0682), EPHB3 (0,2009), EPHB6 (1,3066), ERBB2 (0,056), FGFR1 (0,3337), FLT3 (11,3196), IGF1R (0,3108), INSR (1,4174), LTK (4,3106), MER (1,3646), NTRK1/TRKA (1,3821), PTK7 (2,4474), RYK (1,2234), TIE (4,9964), TYRO3 (0,1696) (Tab. 5)

Da sich die leukämisch transformierten Blasten bei der AML von myeloischen Zellen der normalen Hämatopoese im Knochenmark ableiten, wurde zum Vergleich zudem die Expression der Rezeptortyrosinkinasen in normalem, gesunden Knochenmark (n = 7) untersucht, um so Unterschiede im Expressionsmuster zwischen normalen und maligne entarteten Zellen aufzudecken. Während sich bei der AML die Expression im Durchschnitt auf 18 Rezeptortyrosinkinasen beschränkte, wurde in den analysierten Knochenmarksproben eine Expression folgender 23 Rezeptortyrosinkinasen bei über 50% der Proben festgestellt:

AATYK (Median: 4,7077), AATYK2 (0,4852), AXL (3,795E-02), c-KIT (1,7791), CSF1R (2,1555), DDR1 (1,859E-02), DKFZ1 (0,3484), EPHA1 (0,3776), EPHB1 (5,150E-02), EPHB2 (0,1176), EPHB3 (0,5366), EPHB6 (0,3598), ERBB2 (0,1416), FGFR1 (0,7702), FLT3 (0,6295), IGF1R (0,9460), INSR (0,8358), NTRK1/TRKA (0,8825), PTK7 (0,3801), PDGFRB (9,374E-04), RYK (1,4375), TIE (1,6881), TYRO3 (0,9147) (Tab. 5).

Weil Knochenmarksproben ein sehr heterogenes Gemisch verschiedener Zellreihen und Reifungsstadien hämatopoetischer Zellen darstellen, wurde als nächstes speziell die Gruppe der CD34+ Zellen (n = 5) näher untersucht. Bei CD34+ Zellen handelt es sich um Stammzellen bzw. noch sehr frühe unreife Stadien in der Differenzierung der Hämatopoese. Diese Zellen sind für die Erforschung der AML insofern von besonderem Interesse, als die maligne Transformation, die zu akuten Leukämien führt, in der frühen Hämatopoese stattfindet. Bei den untersuchten CD34+ Zellen handelte es sich um

CD34+/CD33+ Zellen, CD34+/CD33- Zellen, CD34+ Zellen einer gesunden Testperson, mit dem Histondeazetylaseinhibitor TSA behandelte CD34+ Zellen und nur mit DMSO behandelte CD34+ Kontrollzellen. Im Vergleich zur AML und zum normalen Knochenmark fand sich bei den CD34+ Zellen hingegen eine Expression von 34 verschiedenen Rezeptoren in über 50% der Zellen.

Hierzu gehören: AATYK (Median: 1,9373), AATYK2 (0,1968), AXL (0,03251), c-KIT (9,2494), CSF1R (0,1046), DDR1 (0,07933), DDR2 (0,1559), DKFZ1 (0,6012), EGFR (0,00538), EPHA1 (0,09985), EPHA3 (2,7322), EPHA4 (0,08341), EPHB2 (0,003263), EPHB3 (0,4622), EPHB6 (0,2990), ERBB2 (0,09695), ERBB3 (0,007307), FGFR1 (0,3345), FGFR4 (0,0218), FLT3 (0,6941), IGF1R (1,1101), INSR (1,4200), LTK (2,0183), NTRK1/TRKA (1,7433), PDGFRA (0,3560), PDGFRB (0,01208), PTK7 (2,4448), RET (0,6312), RON (0,6127), RYK (1,2166), TEK (1,2324), TIE (7,8812), TYRO3 (0,7262), VEGFR1 (0,9412) (Tab. 5).

Diese Daten zeigen, dass AML Blasten eine geringere Anzahl an Rezeptortyrosinkinasen exprimieren als normales Knochenmark oder CD34+ Stammzellen. Um zu überprüfen, ob diese wenigen Rezeptortyrosinkinasen dafür umso stärker bei der AML exprimiert werden, verglichen wir daraufhin mittels Kruskal-Wallis-Test die relative Expression der Rezeptortyrosinkinasen zwischen den CD34+ Zellen, den gesunden Knochenmarksproben und den AML Proben, wobei sich statistisch signifikante Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen diesen Gruppen ergaben (Tab. 6).

In den AML Proben zeigte sich im Vergleich zu den CD34+ Zellen und zum normalen Knochenmark eine deutlich gesteigerte Expression der Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, CSF1R und in besonderem Maße von FLT3, die alle drei zur Familie des Platelet-Derived-Growth-Factor Rezeptors (PDGFR) gehören. Allerdings wies der ebenfalls zu dieser Familie zählende PDGFRA Rezeptor in den CD34+ Zellen die höchste Expression auf. Auf diese Rezeptorfamilie soll später näher eingegangen werden.

AML		Knochenmark		CD34+ Stammzellen	
<u>Rezeptor-tyrosinkinase</u>	Expression in %	<u>Rezeptor-tyrosinkinase</u>	Expression in %	<u>Rezeptor-tyrosinkinase</u>	Expression in %
NTRK1	99	AATYK2	100	AATYK2	100
EPHB6	98	EPHB6	100	DDR1	100
INSR	98	ERBB2	100	EPHB6	100
C-KIT	96	FGFR1	100	ERBB2	100
FLT3	94	IGF1R	100	FGFR1	100
CSF1R	93	INSR	100	IGF1R	100
RYK	91	NTRK1	100	INSR	100
FGFR1	87	RYK	100	NTRK1	100
PTK7	86	TYRO3	100	PTK7	100
AATYK2	85	AATYK	86	RYK	100
LTK	85	EPHA1	86	TIE	100
IGF1R	80	EPHB3	86	TYRO3	100
TIE	69	CSF1R	83	AXL	80
TYRO3	66	C-KIT	71	C-KIT	80
DDR1	65	EPHB2	71	DKFZ1	80
ERBB2	56	FLT3	71	EPHA1	80
EPHB3	55	TIE	71	EPHA3	80
MER	51	AXL	57	EPHB3	80
AATYK	44	DDR1	57	ERBB3	80
EPHA1	42	DKFZ1	57	FGFR4	80
PDGFRB	41	EPHB1	57	LTK	80
DKFZ1	38	PDGFRB	57	PDGFRA	80
EPHB2	29	PTK7	57	PDGFRB	80
FGFR3	29	EPHA4	50	RON	80
AXL	25	RON	43	TEK	80
RET	24	LTK	33	VEGFR1	80
PDGFRA	18	DDR2	29	AATYK	75
EPHA3	16	EPHA3	29	DDR2	75

Tabelle 5. Expressionshäufigkeiten der 55 untersuchten Rezeptortyrosinkinasen in AML (n = 85), normalem Knochenmark (n = 7), und CD34+ Stammzellen (n = 5).

AML		Knochenmark		CD34+ Stammzellen	
<u>Rezeptor-tyrosin-kinase</u>	Expression in %	<u>Rezeptor-tyrosin-kinase</u>	Expression in %	<u>Rezeptor-tyrosin-kinase</u>	Expression in %
EPHA4	14	ERBB3	29	CSF1R	60
RON	12	ROS1	29	EGFR	60
VEGFR1	11	VEGFR1	17	EPHA4	60
EPHB1	9	FGFR3	14	EPHB2	60
VEGFR3	8	MER	14	FLT3	60
DDR2	7	MET	14	RET	60
FGFR4	7	PDGFRA	14	EPHB1	40
ROR2	7	RET	14	FGFR2	40
VEGFR2	7	VEGFR3	14	FGFR3	40
MET	6	ALK	0	IRR	40
TEK	6	EGFR	0	ROR2	40
FGFR2	4	EPHA2	0	VEGFR3	40
IRR	4	EPHA5	0	EPHA7	20
NTRK2	4	EPHA6	0	MER	20
ERBB3	2	EPHA7	0	MET	20
ROS1	2	EPHA8	0	NTRK3	20
EGFR	1	ERBB4	0	ALK	0
MUSK	1	FGFR2	0	EPHA2	0
ROR1	1	FGFR4	0	EPHA5	0
ALK	0	IRR	0	EPHA6	0
EPHA2	0	MUSK	0	EPHA8	0
EPHA5	0	NTRK2	0	ERBB4	0
EPHA6	0	NTRK3	0	MUSK	0
EPHA7	0	ROR1	0	NTRK2	0
EPHA8	0	ROR2	0	ROR1	0
ERBB4	0	TEK	0	ROS1	0
NTRK3	0	VEGFR2	0	VEGFR2	0

Tabelle 5. Fortsetzung.

Rezeptor-tyrosinkinase		N	Mittelwert	Standardabweichung	Median	mittlerer Rang im Kruskal Wallis Test	asymptotische Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test
<u>c-KIT</u>	CD34+ Zellen	5	8,8	7,1	9,2	41,7	0,0
	Normales Knochenmark	7	1,8	1,7	1,8	18,4	
	AML	85	42,1	149,2	9,1	52,0	
	Gesamt	97	37,4	140,2			
<u>CSF1R</u>	CD34+ Zellen	5	0,5	0,6	0,1	17,0	0,0
	Normales Knochenmark	6	1,9	1,5	2,2	38,0	
	AML	85	6,9	16,1	2,4	51,1	
	Gesamt	96	6,3	15,2			
<u>EPHB6</u>	CD34+ Zellen	5	0,5	0,4	0,3	23,0	0,0
	Normales Knochenmark	7	0,4	0,3	0,4	18,7	
	AML	85	3,7	11,2	1,3	53,0	
	Gesamt	97	3,3	10,5			
<u>FLT3</u>	CD34+ Zellen	5	1,6	2,0	0,7	16,2	0,0
	Normales Knochenmark	7	1,4	1,9	0,6	15,1	
	AML	85	3043,8	27777,9	11,3	53,7	
	Gesamt	97	2667,4	26003,3			
<u>LTK</u>	CD34+ Zellen	5	1,4	1,1	2,0	29,5	0,005
	Normales Knochenmark	6	0,6	1,0	0,0	18,3	
	AML	85	20,4	39,9	4,3	51,8	
	Gesamt	96	18,2	38,0			

Tabelle 6.1. Vergleich der relativen Expression von Rezeptortyrosinkinasen zwischen CD34+ Zellen, normalem Knochenmark und AML. Die Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, CSF1R, EPHB6, FLT3 und LTK werden in der AML signifikant stärker exprimiert als in CD34+ Zellen und normalem Knochenmark. Die Zahlenwerte für die relative Expression ergaben sich aus dem Verhältnis der Expression der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase (bezogen auf die Standardkurve) zu der Expression von GAPDH (bezogen auf die GAPDH Standardkurve) in der jeweiligen Probe.

Rezeptor-tyrosinkinase		N	Mittelwert	Standardabweichung	Median	mittlerer Rang im Kruskal Wallis Test	asymptotische Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test
<u>AATYK</u>	CD34+ Zellen	4	1,7	1,3	1,9	59,6	0,018
	Normales Knochenmark	7	7,3	8,0	4,7	73,2	
	AML	85	2,6	7,8	0,0	45,9	
	Gesamt	96	2,9	7,8			
<u>EPHB1</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,0	0,0	59,2	0,002
	Normales Knochenmark	7	0,2	0,3	0,1	68,7	
	AML	85	0,2	1,1	0,0	46,8	
	Gesamt	97	0,2	1,0			
<u>ROS1</u>	CD34+ Zellen	4	0,0	0,0	0,0	46,5	0,005
	Normales Knochenmark	7	1,4	2,3	0,0	59,9	
	AML	85	0,4	2,8	0,0	47,7	
	Gesamt	96	0,4	2,7			

Tabelle 6.2. Vergleich der relativen Expression von Rezeptortyrosinkinasen zwischen CD34+ Zellen, normalem Knochenmark und AML. Die Rezeptortyrosinkinasen AATYK, EPHB1 und ROS1 zeigen in normalem Knochenmark eine höhere relative Expression als in AML und CD34+ Stammzellen.

Rezeptor-tyrosinkinase		N	Mittelwert	Standardabweichung	Median	mittlerer Rang im Kruskal-Wallis-Test	asymptotische Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test
<u>DDR2</u>	CD34+ Zellen	4	0,2	0,2	0,2	76,5	0,0001
	Normales Knochenmark	7	0,3	0,5	0,0	56,9	
	AML	85	1,1	9,4	0,0	46,5	
	Gesamt	96	1,0	8,9			
<u>EGFR</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,0	0,0	75,8	0,0001
	Normales Knochenmark	7	0,0	0,0	0,0	47,0	
	AML	85	0,0	0,0	0,0	47,6	
	Gesamt	97	0,0	0,0			
<u>EPHA3</u>	CD34+ Zellen	5	5,0	7,2	2,7	78,4	0,003
	Normales Knochenmark	7	0,5	0,8	0,0	51,4	
	AML	85	0,9	3,3	0,0	47,1	
	Gesamt	97	1,1	3,5			
<u>EPHA4</u>	CD34+ Zellen	5	0,1	0,1	0,1	64,6	0,02
	Normales Knochenmark	6	0,2	0,2	0,1	61,9	
	AML	85	0,1	0,5	0,0	46,6	
	Gesamt	96	0,1	0,4			
<u>ERBB3</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,0	0,0	83,8	0,0001
	Normales Knochenmark	7	0,0	0,0	0,0	58,1	
	AML	85	0,0	0,0	0,0	46,2	
	Gesamt	97	0,0	0,0			
<u>FGFR2</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,1	0,0	64,6	0,002
	Normales Knochenmark	6	0,0	0,0	0,0	46,0	
	AML	85	2,0	17,9	0,0	47,7	
	Gesamt	96	1,8	16,8			

Tabelle 6.3. Vergleich der relativen Expression von Rezeptortyrosinkinasen zwischen CD34+ Zellen, normalem Knochenmark und AML. Überblick über die Rezeptortyrosinkinasen, welche in CD34+ Zellen am stärksten exprimiert wurden.

Rezeptor-tyrosinkinase		N	Mittelwert	Standardabweichung	Median	mittlerer Rang im Kruskal Wallis Test	asymptotische Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test
<u>FGFR4</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,0	0,0	79,5	0,0001
	Normales Knochenmark	6	0,0	0,0	0,0	43,5	
	AML	85	0,1	0,5	0,0	47,0	
	Gesamt	96	0,1	0,5			
<u>IRR</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,0	0,0	65,3	0,002
	Normales Knochenmark	7	0,0	0,0	0,0	46,5	
	AML	85	0,1	0,5	0,0	48,3	
	Gesamt	97	0,1	0,5			
<u>NTRK3</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,0	0,0	58,2	0,0001
	Normales Knochenmark	7	0,0	0,0	0,0	48,5	
	AML	85	0,0	0,0	0,0	48,5	
	Gesamt	97	0,0	0,0			
<u>PDGFRA</u>	CD34+ Zellen	5	1,3	2,0	0,4	77,6	0,004
	Normales Knochenmark	7	0,1	0,2	0,0	45,4	
	AML	85	0,2	0,5	0,0	47,6	
	Gesamt	97	0,2	0,7			
<u>PTK7</u>	CD34+ Zellen	4	2,8	1,4	2,4	53,5	0,01
	Normales Knochenmark	7	0,3	0,3	0,4	17,6	
	AML	85	15,6	98,1	2,4	50,8	
	Gesamt	96	13,9	92,4			
<u>RON</u>	CD34+ Zellen	5	1,1	1,3	0,6	77,3	0,0001
	Normales Knochenmark	7	0,4	0,7	0,0	60,0	
	AML	85	0,3	0,9	0,0	46,4	
	Gesamt	97	0,3	0,9			

Tabelle 6.3. Fortsetzung.

Rezeptor-tyrosinkinase		N	Mittelwert	Standardabweichung	Median	mittlerer Rang im Kruskal Wallis Test	asymptotische Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test
<u>ROR2</u>	CD34+ Zellen	5	0,0	0,0	0,0	63,2	0,04
	Normales Knochenmark	7	0,0	0,0	0,0	45,0	
	AML	85	2,7	24,3	0,0	48,5	
	Gesamt	97	2,3	22,7			
<u>TEK</u>	CD34+ Zellen	5	1,5	1,7	1,2	80,4	0,0001
	Normales Knochenmark	6	0,0	0,0	0,0	44,0	
	AML	85	1,8	10,6	0,0	46,9	
	Gesamt	96	1,7	10,0			
<u>TYRO3</u>	CD34+ Zellen	5	1,8	1,9	0,7	78,2	0,002
	Normales Knochenmark	7	1,7	2,1	0,9	73,1	
	AML	85	1,0	4,6	0,2	45,3	
	Gesamt	97	1,1	4,4			
<u>VEGFR1</u>	CD34+ Zellen	5	0,8	0,6	0,9	77,3	0,0001
	Normales Knochenmark	6	0,3	0,6	0,0	49,9	
	AML	85	0,3	1,1	0,0	46,7	
	Gesamt	96	0,3	1,0			

Tabelle 6.3. Fortsetzung.

Zwei weitere Rezeptortyrosinkinasen, die ebenfalls in AML im Vergleich zu CD34+ Zellen und normalem Knochenmark verstärkt exprimiert werden, sind EPHB6 und LTK (Tab. 6.1). EPH Rezeptoren bilden die größte Familie innerhalb der Rezeptortyrosinkinasen und wurden ursprünglich aus einer Erythropoetin-produzierenden menschlichen hepatozellulären Karzinom Zelllinie isoliert. Ihre Liganden sind die Zelloberflächenproteine Ephrin (Eph Rezeptorfamilie interagierende Proteine) A, das über Glycosylphosphatidylinositol an der Zelloberfläche verankert ist und Ephrin B. Dieses

besitzt eine Transmembrandomäne sowie eine zytosolische Domäne und ist somit zu bidirektionaler Signaltransduktion fähig (Wilkinson 2000). Dementsprechend werden EPHA und B Rezeptoren unterschieden.

Ephrin-EPH Interaktionen sind insbesondere für Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen der Entwicklung des Nervensystems, der Angiogenese und Tumorentwicklung von Bedeutung. Denn viele Tumore zeigen eine Überexpression von EPH Rezeptoren, die zu einer Verminderung der Zelladhäsion und damit zur Metastasierung beitragen kann (Jensen 2000). So war auch bei unseren AML Proben eine signifikant höhere Expression der Rezeptortyrosinkinase EPHB6 als in den CD34+ Stammzellen und dem normalen Knochenmark ($p = 0,001$; Tab. 6.1; Abb. 7) zu beobachten. Dagegen wiesen die verwandten Rezeptoren EPHB1 im normalen Knochenmark ($p = 0,002$; Tab. 6.2) und EPHA3 und EPHA4 in CD34+ Zellen die höchste Expression auf ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,02$; Tab. 6.3).

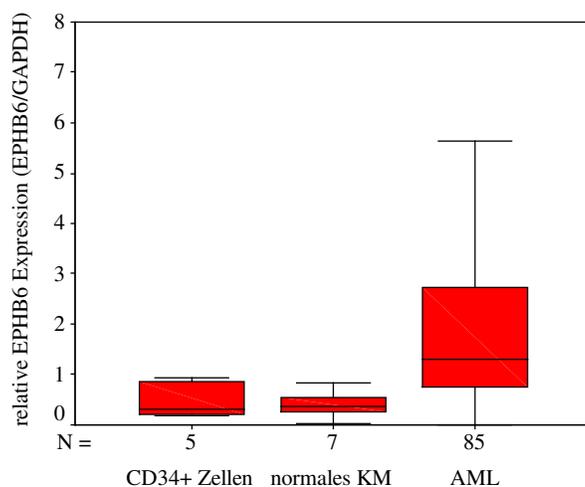


Abbildung 7. Darstellung der EPHB6 Expression als Boxplot. Der schattierte Bereich innerhalb einer Box beinhaltet die relative EPHB6 Expression (EPHB6/GAPDH) in den mittleren 50% der Proben. Die übrigen 50% setzen sich aus den jeweils 25% unterhalb und oberhalb der Box zusammen. Der Median (2. Quartile) ist als Linie innerhalb der Box gezeichnet, die 1. und 3. Quartile stellen die untere und obere Begrenzung der Box dar. Aus dem Diagramm geht deutlich die gegenüber CD34+ Zellen und normalem Knochenmark (KM) gesteigerte EPHB6 Expression in AML hervor.

Die Leukozyten-Tyrosin-Kinase LTK wird hauptsächlich in Prä-B-Zellen, im Gehirn, Plazenta und verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien exprimiert und bildet zusammen mit der Tyrosinkinase ALK eine Untergruppe der Insulinrezeptor-superfamilie (Ueno *et al.* 1996). Die Rezeptortyrosinkinase LTK wirkt u.a. über das Insulinrezeptorsubstrat IRS-1 antiapoptotisch in hämatopoetischen Zellen und fördert zudem zusätzlich über den PI3-Kinase-Signalweg das Überleben von Zellen (Ueno *et al.* 1997).

Bei den von uns untersuchten AML Proben lag eine deutlich gesteigerte Expression des LTK Rezeptors gegenüber CD34+ Stammzellen und normalem Knochenmark vor ($p = 0,005$; Tab. 6.1; Abb. 8).

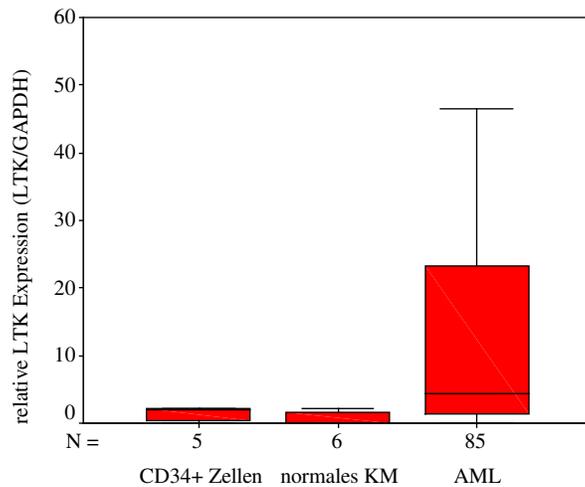


Abbildung 8. Darstellung der relativen LTK Expression als Boxplot. Das Diagramm zeigt die deutlich höhere LTK Expression in AML gegenüber CD34+ Zellen und normalem Knochenmark.

Nur die Rezeptortyrosinkinasen AATYK, EPHB1 und ROS1 zeigten die höchste Expression im normalen Knochenmark im Vergleich zu CD34+ Zellen und AML (Tab. 6.2), wohingegen bei den meisten anderen Rezeptoren die höchste Expression in den CD34+ Zellen gefunden wurde. Hierzu gehören die Rezeptortyrosinkinasen: DDR2,

EGFR, EPHA3, EPHA4, ERBB3, FGFR2 und 4, IRR, NTRK3/TRKC, PDGFRA, PTK7, RON, ROR2, TEK, TYRO3 und VEGFR1 (Tab. 6.3).

3.1.2 Analyse der FAB Stadien

Der Begriff der akuten myeloischen Leukämie fasst die verschiedene Subtypen FAB M1-7 zusammen. Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt im Differenzierungsprozess, bzw. in welcher Zellreihe, die maligne Transformation zur Leukämiezelle stattfindet, resultieren morphologisch und immunphänotypisch unterschiedliche AML Formen, denen möglicherweise verschiedene Pathomechanismen zugrunde liegen. Daher wurde mittels Mann-Whitey-U-Test nach Unterschieden in der Expression der Rezeptortyrosinkinasen zwischen unreiferen, myeloblastären und eher monozytär differenzierten akuten myeloischen Leukämien gesucht. Hierbei verglichen wir die Subtypen FAB M1 (myeloblastär undifferenziert; n = 13) und FAB M2 (myeloblastär differenziert; n = 20) auf der einen Seite mit FAB M4 (kombiniert myeloblastär und monozytär; n = 18) und FAB M5 (monoblastäre AML; n = 9) auf der anderen Seite. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Expression der Rezeptortyrosinkinasen NTRK1/TRKA, IGF1R und c-KIT in FAB M1+M2 im Vergleich mit FAB M4+M5 (Tab. 7).

Besonders deutlich wird der Unterschied in der Expressionshöhe zwischen den unterschiedlichen FAB Subtypen bei dem NTRK1/ TRKA Rezeptor, der in den myeloblastären Formen FAB M1 und FAB M2 deutlich höher exprimiert wird (Abb. 27).

Auch für die Rezeptoren EPHB6 und PTK7 ergab der Mann-Whitney-U-Test die höhere Expression in FAB M1+M2. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Vergleich der Mediane für EPHB6 (FAB M1+M2 vs. FAB M4+M5; Median: 1,952 vs. 0,866; Mittelwert: 3,927 vs. 4,693) und PTK7 (Median: 3,322 vs. 1,001; Mittelwert: 4,039 vs. 5,555) überein, auch wenn der Vergleich der Mittelwerte aufgrund der großen Streuung der EPHB6 bzw. PTK7 Expression in der Gruppe FAB M4+M5 dies scheinbar nicht bestätigt. Im Gegensatz dazu wurden die Rezeptoren CSF1R (Abb. 23) und EPHB3 in

den monozytären Formen FAB M4+M5 stärker exprimiert als in den myeloblastären Formen FAB M1+M2.

Rezeptor-tyrosinkinase	FAB	N	Mittelwert	Standardabweichung	Mittlerer Rang	Sig. (2-seitig) im Mann-Whitney-U-Test
<u>NTRK1</u>	FAB1+2	33	90,7	447,7	36,7	0,002
	FAB4+5	27	2,0	5,6	23,0	
<u>IGF1R</u>	FAB1+2	33	3,0	9,0	34,9	0,03
	FAB4+5	27	0,6	1,2	25,1	
<u>c-KIT</u>	FAB1+2	33	55,2	181,7	36,3	0,004
	FAB4+5	27	46,2	173,6	23,4	
<u>EPHB6</u>	FAB1+2	33	3,9	8,1	35,8	0,01
	FAB4+5	27	4,7	17,8	24,0	
<u>PTK7</u>	FAB1+2	33	4,0	3,5	36,5	0,003
	FAB4+5	27	5,6	17,7	23,2	
<u>CSF1R</u>	FAB1+2	33	3,3	5,0	24,2	0,002
	FAB4+5	27	13,0	26,8	38,1	
<u>EPHB3</u>	FAB1+2	33	2,3	11,4	26,5	0,04
	FAB4+5	27	1,8	3,3	35,3	

Tabelle 7. Vergleich der Expression von Rezeptortyrosinkinasen zwischen den myeloblastären AML Formen FAB M1+ M2 und den eher monozytär differenzierten Formen FAB M4+ M5 (Mann-Whitney-U-Test). Die Rezeptortyrosinkinasen NTRK1/TRK A, IGF1R, c-KIT, EPHB6 und PTK7 werden in den AML Subgruppen FAB M1+M2 höher exprimiert als in FAB M4+M5, wohingegen CSF1R und EPHB3 in FAB M4 + M5 höher exprimiert werden.

3.1.3 Zusammenhang zwischen RTK und Zyklin Expression

Ein Hauptmerkmal von Krebszellen liegt in der unkontrollierten Zellproliferation. Während in normalen Geweben ein Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellproliferation herrscht und der Zellzyklus genau reguliert wird, liegt vielen Tumoren eine Störung dieses Gleichgewichts durch Verlust der Zellzykluskontrolle zugrunde

(Sandal *et al.* 2002). Die verschiedenen Phasen des Zellzyklus, insbesondere der Kontrollpunkt am Übergang von der G1 zu S Phase, unterliegen einer Regulation durch sogenannte Zyklin-abhängige Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs), die als Komplex mit bestimmten Zyklinen vorliegen müssen, um aktiv zu sein. Ausgehend von der Zellzyklusphase, in der sie vorherrschen, lassen sich diese Zykline in verschiedene Klassen unterteilen; G1-Phase: Zyklin D1, D2, D3; G1/S-Übergang: Zyklin E; S-Phase: Zykline A1, A2; Mitose: Zykline B1, B2. Die Zyklinexpression wird durch mitogene Signale, z.B. Wachstumsfaktoren, gesteuert. So wurde bei den D-Zyklinen eine Induktion durch die Transkriptionsfaktoren c-Myc, NF- κ B und AP-1 (bestehend aus Jun und Fos) beschrieben (Ekholm *et al.* 2000). Darüberhinaus findet eine Regulation der D-Zykline auch auf der Translationsebene durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg statt. Unter dem Einfluss von Mitogenen kommt es zu einer Aktivierung des Translations-Initiations-Faktors eIF-4E und damit zu einer gesteigerten Zyklin D Translation, wohingegen antiproliferative Signale über eine Inaktivierung dieses Faktors zu einer verminderten Zyklin D Translation führen.

In verschiedenen malignen Neoplasien lässt sich eine Überexpression von Zyklinen nachweisen. Da die Zyklinexpression unter anderem durch Signaltransduktionswege reguliert wird, die unter dem Einfluss von Rezeptortyrosinkinasen stehen, suchten wir nach einem Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Rezeptortyrosinkinasen und der Expression verschiedener Zykline. Zu diesem Zweck wurde für die 55 untersuchten Rezeptortyrosinkinasen jeweils der Median der Expressionshöhe in AML-Blasten ermittelt. Anhand dieses Medians ließen sich die AML Patienten anschließend in 2 Gruppen unterteilen, und zwar eine Gruppe mit niedriger Rezeptorexpression (Expression < Median, bzw. bei Median = 0: Rezeptorexpression = 0) und eine Gruppe mit hoher Rezeptortyrosinkinasenexpression (Expression > Median, bzw. Expression > 0). Mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen wir für beide Gruppen die Expression bestimmter Zykline miteinander. Dabei ergab sich interessanterweise bei vielen Rezeptortyrosinkinasen eine signifikant höhere Zyklin Expression in der AML Patientengruppe mit höherer Rezeptorexpression. Nur die Rezeptortyrosinkinasen

ERBB3, EPHB3 und RET korrelierten im Gegensatz hierzu mit einer niedrigeren Zyklinexpression.

A-Zykline interagieren mit CDK2 und sind v.a. für die S-Phase des Zellzyklus von Bedeutung. Zyklin A1 wird unter physiologischen Bedingungen in hohem Maße im Hoden exprimiert, wo es für die Spermatogenese erforderlich ist (*Liu et al. 1998, Yang et al. 1997*). Außerdem findet sich auch bei hämatopoetischen CD34+ Stammzellen eine Zyklin A1 Expression, welche bei Stimulation der myeloiden Differenzierung gesteigert wird. Darüber hinaus lässt sich eine Überexpression von Zyklin A1 häufig in bestimmten AML Subtypen nachweisen, bei denen ein Differenzierungsblock im myeloblastären (FAB M2) oder promyelozytären (FAB M3) Stadium vorliegt (*Yang et al. 1999*). Auch in den Leukämiezelllinien ML-1, U937, NB4, KG-1 und THP1 sowie in Non-Hodgkin-Lymphomen wurde eine hohe Zyklin A1 Expression beschrieben (*Yang et al. 1997, Wolowiec et al 1999*).

In der vorliegenden Untersuchung fiel bei AML Patienten mit hoher Expression der Rezeptortyrosinkinasen INSR, PTK7, RYK und TIE eine 2,3- (RYK) bis 5,2- (PTK7) fach höhere relative Zyklin A1 Expression auf als bei Patienten mit einer niedrigeren relativen Expression dieser Rezeptoren. Umgekehrt war bei Expression von ERBB3, RET, bzw. hoher Expression von EPHB3, eine niedrigere relative Zyklin A1 Expression zu beobachten (Tab. 8).

Ähnlich wie bei Zyklin A1 konnte in der Forschung auch für Zyklin A2 eine Überexpression in Tumoren gezeigt werden, vor allem in Frühstadien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (non-small-cell lung cancer, NSCLC). Hierbei korrelierte eine hohe Zyklin A2 Expression mit Tumorproliferation und Prognose (*Müller-Tidow et al. 2001, Volm et al. 1997*).

Analog zu Zyklin A1 ergaben unsere Analysen auch bei Zyklin A2 einen Zusammenhang zwischen der Expression von Zyklin A2 und bestimmten Rezeptortyrosinkinasen. So wiesen AML Patienten mit hoher Expression der Rezeptortyrosinkinasen FGFR1, INSR, PTK7 und TYRO3 eine zwei bis dreifach höhere relative Expression von Zyklin A2 auf als Patienten mit einer niedrigeren Expression dieser Rezeptoren (Tab. 9).

relative Höhe der RTK Expression in Bezug auf den Median		N	Mittelwert der relativen Zyklin A1 Expression	Standardab- weichung	mittlerer Rang	asympt. Sig. im Mann-Whitney- U-Test
<u>INSR</u>	< 1,4	34	0,4	0,5	30,2	0,05
	> 1,4	35	1,4	2,6	39,7	
<u>PTK7</u>	< 2,4	37	0,3	0,4	27,8	0,00
	> 2,4	32	1,6	2,7	43,3	
<u>RYK</u>	< 1,2	37	0,6	1,3	28,8	0,01
	> 1,2	32	1,3	2,5	42,2	
<u>TIE</u>	< 5,0	37	0,4	0,5	29,5	0,02
	> 5,0	32	1,5	2,7	41,3	
<u>EPHB3</u>	< 0,2	38	1,1	2,2	40,3	0,02
	> 0,2	31	0,7	1,6	28,5	
<u>ERBB3</u>	= 0	67	1,0	2,0	35,9	0,03
	> 0	2	0,0	0,0	5,0	
<u>RET</u>	= 0	57	1,1	2,1	37,7	0,01
	> 0	12	0,3	0,3	22,0	

Tabelle 8. Zusammenhang zwischen der Expression von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und Zyklin A1 Expression (Mann-Whitney-U-Test). Hohe Expression der Rezeptortyrosinkinasen INSR, PTK7, RYK und TIE korreliert mit einer höheren Expression von Zyklin A1, während eine hohe Expression von EPHB3 bzw. eine Expression von ERBB3 und RET mit einer niedrigeren Zyklin A1 Expression korreliert.

Während die A-Zykline vor allem für die Regulation der S-Phase eine Rolle spielen, sind die Zykline D1, D2 und D3 wesentlich an der Steuerung der G1 Progression beteiligt, insbesondere am Übergang von der mittleren zur späten G1 Phase. Eine gesteigerte Expression dieser Zykline kommt häufig bei Tumoren vor. So wurde eine erhöhte Expression von Zyklin D1 in Kolonkarzinomen und anderen Tumoren gefunden (Sandal 2002). Zudem wurde eine Überexpression von Zyklin D2 in chronischen lymphatischen Leukämien der B-Zellreihe (B-CLL), im lymphoplasmazytischen Lymphom (LPL) sowie im Magenkarzinom beobachtet, wo eine Überexpression mit Tumorprogression und einer schlechten Prognose assoziiert war (Delmer et al. 1995, Takano et al. 2000).

relative Höhe der RTK Expression in Bezug auf den Median		N	Mittelwert der relativen Zyklin A2 Expression	Standardabweichung	mittlerer Rang	asympt. Sig. im Mann-Whitney-U-Test
<u>FGFR1</u>	< 0,3	37	0,1	0,2	29,5	0,01
	> 0,3	32	0,3	0,3	41,4	
<u>INSR</u>	< 1,4	34	0,1	0,1	28,3	0,01
	> 1,4	35	0,3	0,4	41,5	
<u>PTK7</u>	< 2,4	37	0,1	0,3	30,3	0,04
	> 2,4	32	0,2	0,3	40,4	
<u>TYRO3</u>	< 0,2	37	0,1	0,1	30,3	0,04
	> 0,2	32	0,3	0,4	40,4	

Tabelle 9. Zusammenhang zwischen der Expression von Rezeptortyrosinkinasen und Zyklin A2 Expression. Eine hohe Expression der Rezeptortyrosinkinasen FGFR1, INSR, PTK7 und TYRO3 ist mit einer hohen Zyklin A2 Expression vergesellschaftet.

Wiederum ergaben unsere Untersuchungen für AML Patienten mit einer relativ hohen Expression der Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, IGF1R, PTK7, RYK, TIE und TRKA eine ca. drei- bis vierfach höhere relative Zyklin D2 Expression als bei Patienten mit einer niedrigeren Expression dieser Rezeptortyrosinkinasen. Im Gegensatz dazu war eine Expression des Rezeptors RET mit einer signifikant niedrigeren Zyklin D2 Expression assoziiert als bei Patienten ohne nachweisbare RET Expression (Tab. 10).

In der Literatur wird eine Überexpression von Zyklin D3 u.a. in primär invasiven Mammakarzinomen beschrieben und ist hierbei mit Metastasenentwicklung assoziiert (*Bukholm 2001*). Desweiteren tritt eine Zyklin D3 Überexpression in malignen Melanomen auf, wobei für oberflächliche Melanome eine Korrelation mit früherem Rückfall und geringerem Gesamtüberleben nachgewiesen werden konnte (*Florenes et al. 2000*). Darüberhinaus wurde eine erhöhte Expression von Zyklin D3 auch in einigen Fällen von Non-Hodgkin-Lymphomen gefunden, in T-Zell Lymphomen häufiger als in B-Zell Lymphomen. Außerdem zeigte sich bei indolenten B-Zell Lymphomen eine Assoziation zwischen Überexpression von Zyklin D3 und einer Untergruppe von Patienten mit prognostisch ungünstigen klinischen Parametern sowie einer geringeren rezidivfreien Überlebenszeit und geringerem Gesamtüberleben (*Moller et al. 2001*).

relative Höhe der RTK Expression in Bezug auf den Median	N	Mittelwert der relativen Zyklin D2 Expression	Standard- abweichung	mittlerer Rang	asympt. Sig. im Mann-Whitney- U-Test
c-KIT < 9,1	37	9,6	7,5	26,4	0,0001
> 9,1	32	42,0	53,7	44,9	
IGF1R < 0,3	35	16,5	33,6	27,1	0,001
> 0,3	34	33,0	44,8	43,2	
TRK A < 1,4	36	11,8	11,1	28,9	0,01
> 1,4	33	38,6	53,8	41,7	
PTK7 < 2,4	37	13,5	21,3	27,8	0,001
> 2,4	32	37,5	51,8	43,3	
RYK < 1,2	37	12,8	13,0	29,6	0,02
> 1,2	32	38,3	54,5	41,2	
TIE < 5,0	37	13,3	14,7	29,3	0,01
> 5,0	32	37,8	54,2	41,6	
RET = 0	57	26,3	41,3	37,4	0,03
> 0	12	16,7	34,5	23,8	

Tabelle 10. Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe von Rezeptortyrosinkinasen und der Zyklin D2 Expression (Mann-Whitney-U-Test). Eine hohe Expression der Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, IGF1R, NTRK1/TRK A, PTK7, RYK und TIE korreliert mit einer hohen Expression von Zyklin D2, wohingegen eine RET Expression mit einer niedrigen Zyklin D2 Expression assoziiert ist.

Im Rahmen der vorliegenden Analyse wiesen AML Patienten mit überdurchschnittlich hoher Expression der Rezeptortyrosinkinasen CSF1R und MER eine etwa anderthalbfach höhere Zyklin D3 Expression auf. Hingegen wurde bei AML Patienten mit einer ERBB3 Expression eine niedrigere relative Zyklin D3 Expression festgestellt (Tab. 11).

relative Höhe der RTK Expression in Bezug auf den Median		N	Mittelwert der relativen Zyklin D3 Expression	Standardabweichung	mittlerer Rang	asympt. Sig. im Mann-Whitney-U-Test
CSF1R	< 2,4	36	0,9	0,8	29,6	0,02
	> 2,4	33	1,6	1,4	40,9	
MER	< 1,4	37	1,0	0,8	30,3	0,04
	> 1,4	32	1,6	1,4	40,4	
ERBB3	= 0	67	1,3	1,2	35,9	0,04
	> 0	2	0,2	0,0	6,0	

Tabelle 11. Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe von Rezeptortyrosinkinasen und Zyklin D3 Expression (Mann-Whitney-U-Test). Eine hohe Expression von CSF1R und MER bzw. die Abwesenheit einer ERBB3 Expression korrelieren mit einer hohen Zyklin D3 Expression.

E-Zykline sind im Komplex mit CDK2 and der Regulation des Übergangs von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus beteiligt. Eine Überexpression von Zyklin E (E1) konnte in verschiedenen Neoplasien, wie Karzinomen des Nierenbeckens und Ureters (*Furihata et al. 1998*), der Gallenblase (*Eguchi et al. 1999*), in zervikalen Neoplasien (*Dellas et al. 1998*), in Brustkrebs (*Nielsen et al. 1998*), in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (*Fukuse et al. 2000*) und in malignen Lymphomen nachgewiesen werden (*Erlanson et al. 1998*). In jungen Brustkrebspatientinnen korrelieren hohe Zyklin E1 Spiegel und niedrige Spiegel des CDK-Inhibitors p27 mit einer schlechten Prognose (*Porter et al. 1997*). Auch in frühen Stadien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist eine Überexpression von Zyklin E1 mit einer schlechten Prognose, mit Fernmetastasierung und chromosomaler Instabilität assoziiert (*Müller-Tidow et al. 2001, Spruck et al. 1999*).

Erneut zeigte sich bei den untersuchten AML Patienten eine um das drei bis vierfach gesteigerte relative Expression von Zyklin E1 bei Patienten mit einer hohen Expression der Rezeptortyrosinkinasen FGFR1, INSR und PTK7 im Vergleich zu solchen mit niedriger Expression dieser Rezeptoren (Tab. 12).

relative Höhe der RTK Expression in Bezug auf den Median		N	Mittelwert der relativen Zyklin E1 Expression	Standardabweichung	mittlerer Rang	asympt. Sig. im Mann-Whitney-U-Test
<u>FGFR1</u>	< 0,3	37	1,4	1,6	28,3	0,003
	> 0,3	32	5,9	15,6	42,8	
<u>INSR</u>	< 1,4	34	1,4	1,6	28,3	0,01
	> 1,4	35	5,5	15,0	41,5	
<u>PTK7</u>	< 2,5	37	1,7	2,3	28,9	0,01
	> 2,5	32	5,5	15,6	42,0	

Tabelle 12. Zusammenhang zwischen Zyklin E1 Expression und der Expression einzelner Rezeptortyrosinkinasen (Mann-Whitney-U-Test). Eine hohe Expression der Rezeptortyrosinkinasen FGFR1, INSR und PTK7 ist mit einer hohen Zyklin E1 Expression assoziiert.

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass eine hohe Expression bestimmter Rezeptortyrosinkinasen, vor allem des Insulinrezeptors, INSR, (Zykline A1, A2, E1) und der Protein-Tyrosinkinase 7, PTK7, (Zykline A1, A2, D2, E1), bei AML Patienten mit einer signifikant höheren Expression verschiedener Zykline korreliert.

Für einige wenige Rezeptoren hingegen, insbesondere für eine Expression von RET (rearranged during transformation) (Zykline A1, D2; Tab. 8, 10), ergab sich im Gegensatz dazu eine Assoziation mit einer niedrigeren Expression bestimmter Zykline in der zugehörigen AML Patientengruppe.

3.1.4 Überlebensanalysen

Eine Überexpression bzw. eine unphysiologische Expression bestimmter Rezeptortyrosinkinasen kommt in vielen verschiedenen Tumoren vor und weist hier eine große prognostische Bedeutung auf. Eine systematische Analyse sollte deshalb klären, welche Rezeptortyrosinkinasen bei AML mit Überleben assoziiert sind. Wie bereits erläutert, wurden hierzu die AML Patienten anhand des Medians des jeweiligen Rezeptors in zwei Gruppen unterteilt, eine Gruppe mit niedriger oder fehlender Expression

(Expression < Median oder Expression = 0 bei einem Median von 0) und eine Gruppe mit hoher Expression der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase (Expression > Median oder > 0). Diese beiden Gruppen wurden durch Kaplan-Meier-Überlebensanalyse bezüglich der rezidivfreien Überlebenszeit nach Erreichen der ersten Remission, also der Remissionsdauer, verglichen.

Als Ergebnis lässt sich dabei festhalten, dass eine hohe Expression der meisten Rezeptortyrosinkinasen überwiegend mit einem schlechteren Überleben assoziiert war. Allein für AML Patienten mit einer hohen Expression des Rezeptors c-KIT ergab sich eine signifikant bessere Prognose. Denn in der Gruppe höherer c-KIT Expression zeigte sich eine mehr als doppelt so lange rückfallsfreie Überlebenszeit (Mittelwert: 543 Tage vs. 264 Tage; $p = 0,04$; Abb. 9) und ein verlängertes Gesamtüberleben (Mittelwert: 583 Tage vs. 242 Tage; $p = 0,002$; Abb. 10).

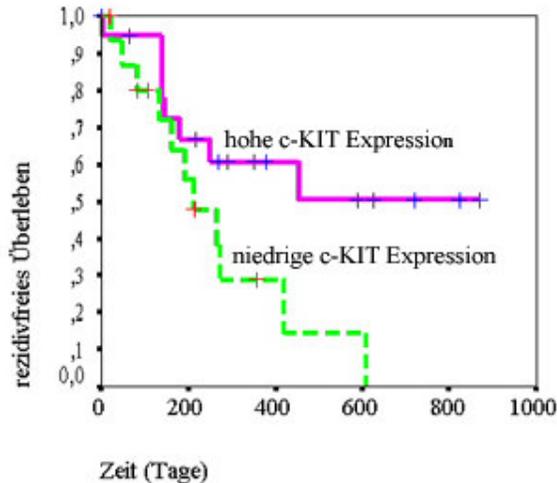


Abbildung 9. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Patienten mit einer über dem Median (9,055) liegenden c-KIT Expression ($n = 20$) zeigen ein signifikant längeres rückfallsfreies Überleben als Patienten mit einer unter dem Median liegenden c-KIT Expression ($n = 16$) ($p = 0,04$; siehe auch Tab. 13).

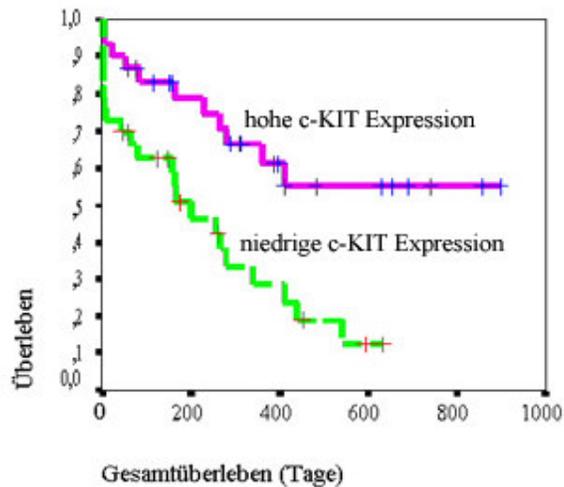


Abbildung 10. Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei AML. Patienten mit einer über dem Median (9,055) liegenden c-KIT Expression (n = 30) zeigen ein signifikant längeres Gesamtüberleben als Patienten mit einer unter dem Median liegenden c-KIT Expression (n = 33) ($p = 0,002$).

Die Rezeptortyrosinkinase c-KIT gehört zur Familie des PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) Rezeptors. Im Gegensatz zu c-KIT war eine hohe Expression der strukturell ähnlichen Rezeptortyrosinkinase CSF1R, die ebenfalls zu der PDGFR Familie zählt, mit einer signifikant schlechteren rückfallsfreien Überleben assoziiert (Mittelwert: 262 Tage vs. 580 Tage; $p = 0,01$; Abb. 11).

Desgleichen wiesen AML Patienten mit einer hohen Expression der Rezeptortyrosinkinase DDR1 (discoidin domain receptor) eine kürzere rezidivfreie Überlebenszeit (281 Tage vs. 580 Tage; $p = 0,04$; Abb. 12) sowie ein geringeres Gesamtüberleben auf (537 Tage vs. 270 Tage; $p = 0,045$; Abb. 13).

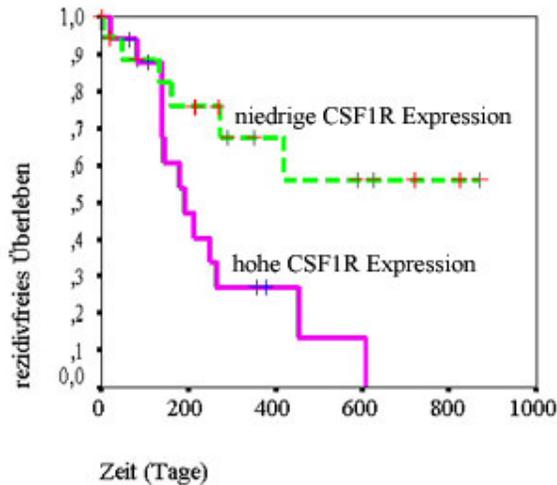


Abbildung 11. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Patienten mit einer über dem Median (2,411) liegenden CSF1R Expression (n = 17) zeigen ein signifikant kürzeres rückfallsfreies Überleben als Patienten mit einer unter dem Median liegenden CSF1R Expression (n = 19) (p = 0,01).

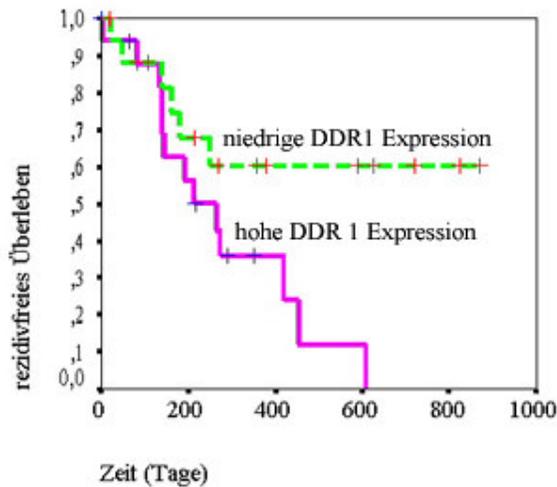


Abbildung 12. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Patienten mit einer über dem Median (0,0682) liegenden DDR1 Expression (n = 18) zeigen ein signifikant kürzeres rückfallsfreies Überleben als Patienten mit einer unter dem Median liegenden DDR1 Expression (n = 18) (p = 0,04).

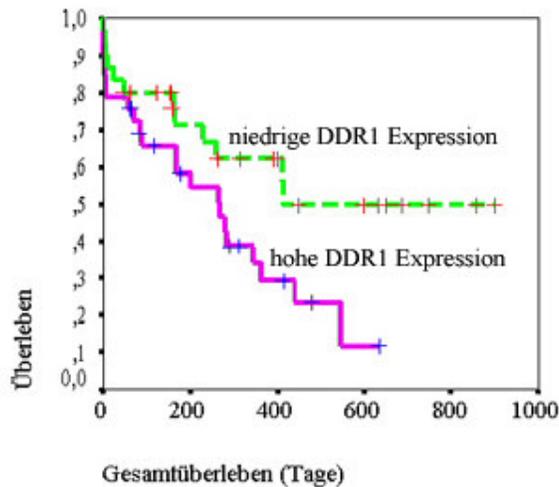


Abbildung 13. Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei AML. Patienten mit einer über dem Median (0,0682) liegenden DDR1 Expression (n = 33) zeigen ein signifikant kürzeres rückfallsfreies Überleben als Patienten mit einer unter dem Median liegenden DDR1 Expression (n = 30) ($p = 0,045$).

Eine Assoziation zwischen hoher Rezeptorexpression und geringerer rezidivfreien Überlebenszeit war ebenfalls bei dem Insulinrezeptor INSR zu beobachten (302 Tage vs. 565 Tage; $p = 0,02$; Abb. 14).

Auch AML Patienten mit einer Expression der Rezeptortyrosinkinase AXL (anexelekt, griech. für unkontrolliert) wiesen eine deutlich geringere rückfallsfreie Überlebenszeit auf als Patienten ohne eine Expression dieses Rezeptors (214 Tage vs. 516 Tage; $p = 0,01$; Abb. 15).

Ebenso zeigten AML Patienten mit einer Expression von RET (rearranged during transformation) sowohl eine kürzere rückfallsfreie Überlebenszeit (187 Tage vs. 500 Tage; $p = 0,0025$; Abb. 16) als auch ein schlechteres Gesamtüberleben (170 Tage vs. 478; $p = 0,005$; Abb. 17).

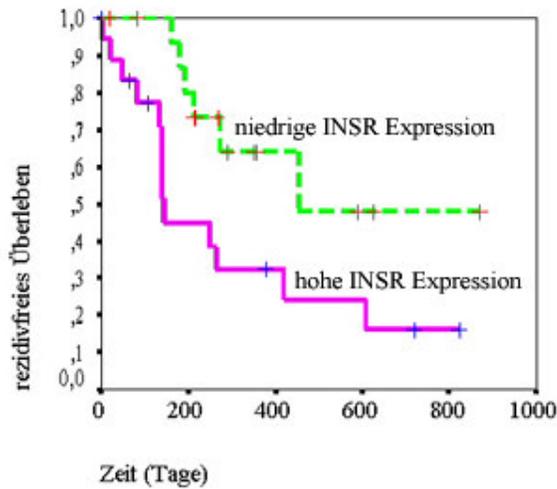


Abbildung 14. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Patienten mit einer über dem Median (1,4174) liegenden INSR Expression (n = 19) zeigen ein signifikant kürzeres rückfallsfreies Überleben als Patienten mit einer unter dem Median liegenden INSR Expression (n = 17) ($p = 0,02$).

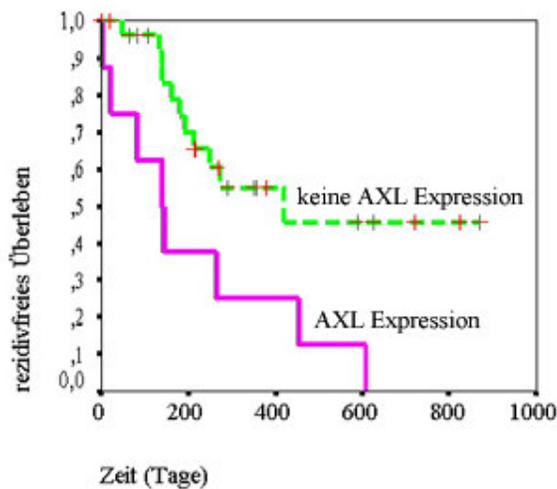


Abbildung 15. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Patienten mit einer Expression der Rezeptortyrosinkinase AXL (n = 8) zeigen eine signifikant kürzerer rückfallsfreie Überlebenszeit als Patienten ohne eine AXL Expression (n = 28) ($p = 0,01$).

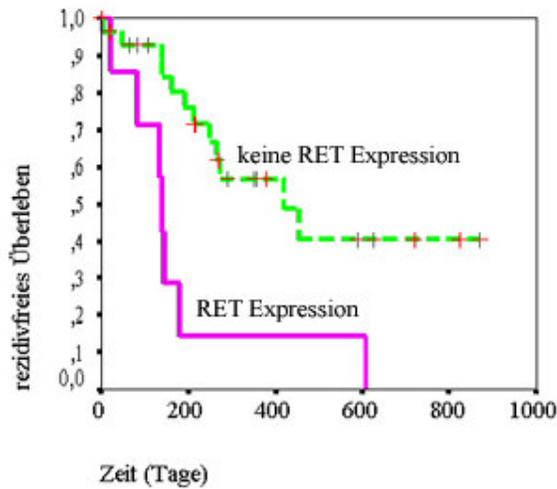


Abbildung 16. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Patienten mit einer Expression der Rezeptortyrosinkinase RET ($n = 7$) zeigen eine signifikant kürzerer rückfallsfreie Überlebenszeit als Patienten ohne eine RET Expression ($n = 29$) ($p = 0,0025$).

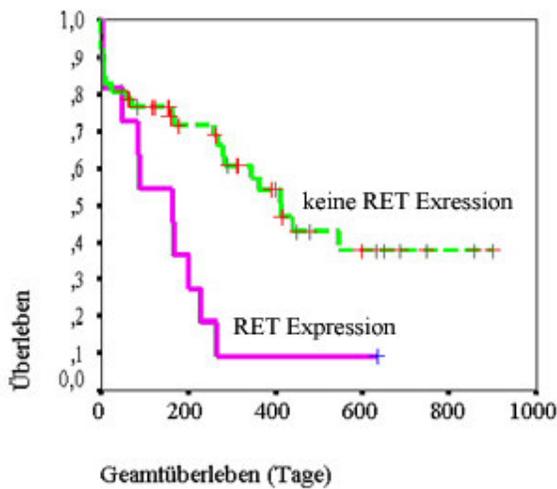


Abbildung 17. Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei AML. Patienten mit einer Expression der Rezeptortyrosinkinase RET ($n = 11$) zeigen eine signifikant kürzere Gesamtüberlebenszeit als Patienten ohne eine RET Expression ($n = 52$) ($p = 0,005$).

Um zu überprüfen, inwieweit sich eine Kombination dieser einzelnen Risikofaktoren auf die Prognose auswirkt, wurde die rückfallsfreie Überlebenszeit von AML Patienten, die mehr als zwei der Rezeptortyrosinkinasen CSF1R, DDR1, INSR, AXL und RET überdurchschnittlich hoch exprimieren, mit der Überlebenszeit von Patienten, die nur zwei oder weniger dieser fünf Rezeptoren überexprimieren, verglichen. Die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ergab in der Gruppe mit einer Überexpression von mehr als zwei der obengenannten Rezeptoren ($n = 12$) eine signifikant kürzere rückfallfreie Überlebenszeit als bei den Patienten, die weniger Rezeptortyrosinkinasen überexprimierten ($n = 24$) (197 Tage vs. 573 Tage; $p = 0,0002$; Abb. 18). Auch das Gesamtüberleben bei dieser Risikopatientengruppe ($n = 20$) war gegenüber der weniger gefährdeten Patientengruppe ($n = 43$) deutlich vermindert (222 Tage vs. 573 Tage; $p = 0,01$; Abb. 19).

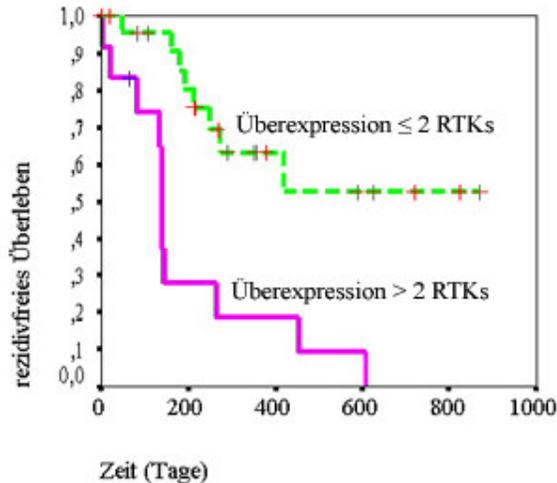


Abbildung 18. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Patienten mit einer Überexpression (Expression > Median) von mehr als zwei der Rezeptortyrosinkinasen CSF1R, DDR1, INSR, AXL oder RET ($n = 12$) weisen ein signifikant kürzeres rückfallsfreies Überleben auf als Patienten mit einer Überexpression von zwei oder weniger dieser Rezeptortyrosinkinasen ($n = 24$) ($p = 0,0002$).

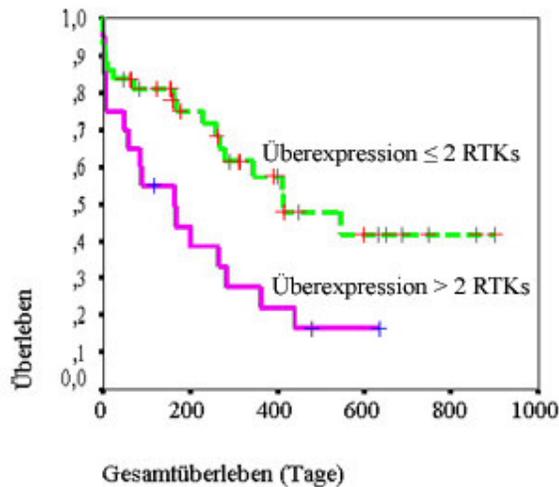


Abbildung 19. Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit bei AML. Patienten mit einer Überexpression (Expression > Median) von mehr als zwei der Rezeptortyrosinkinasen CSF1R, DDR1, INSR, AXL oder RET (n = 20) weisen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben auf als Patienten mit einer Überexpression von zwei oder weniger dieser Rezeptortyrosinkinasen (n = 43) (p = 0,01).

3.2 RT-PCR-Analyse der wichtigsten Rezeptortyrosinkinasen im Detail

Bisher wurden alle 55 analysierten Rezeptortyrosinkinasen gemeinsam in Hinblick auf ihre mögliche Verbindung zu AML untersucht. Um jedoch zu eindeutigeren Erkenntnissen über den Zusammenhang von Rezeptortyrosinkinasen und Leukämie zu gelangen, ist es notwendig, die nachfolgende Analyse auf einzelne Rezeptortyrosinkinasen zu konzentrieren. Dabei sollen die Rezeptortyrosinkinasen näher beleuchtet werden, bei denen unsere Untersuchungen im Vergleich zu normalem hämatopoetischen Zellen eine deutlich höhere Expression in AML ergaben. Konkret wird daher auf die PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) Familienmitglieder c-KIT, CSF1R und FLT3 sowie auf die Rezeptortyrosinkinase TRK A eingegangen, und es werden noch einmal die wichtigsten Ergebnisse zu diesen Rezeptoren im Überblick dargestellt. Diese Auswahl wird durch die Forschung bestätigt, die die Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, CSF1R, FLT3 und TRK A bereits seit längerem mit AML in Verbindung gebracht hat.

3.2.1 c-KIT

C-KIT, der Rezeptor für den Stammzell Faktor („stem cell factor“, SCF = KL), wird physiologischerweise vor allem im Knochenmark, in Mastzellen und Melanozyten exprimiert, während sein Ligand SCF überwiegend in Stromazellen, in Fibroblasten und Endothelzellen zu finden ist (Ashman, et al. 1991; Zwick et al. 2001).

Die Analyse ergab eine Expression von c-KIT in 96,5% (82 von 85) der AML Proben (Mittelwert: 42,07, Median: 9,0552, Minimum:0, Maximum: 1047,58). Dabei war die Expression von c-KIT bei AML signifikant höher als bei den unreifen CD34+ Stammzellen und dem normalen Knochenmark, das Zellen aller Differenzierungsgrade beinhaltet und die geringste c-KIT Expression zeigte (Tab. 6.1; Abb. 20). Innerhalb der AML erwies sich die c-KIT Expression in den myeloblastären Formen FAB M1 und M2 als signifikant höher als in den monozytär differenzierten Formen FAB M4 und M5 (Tab. 7; Abb. 21).

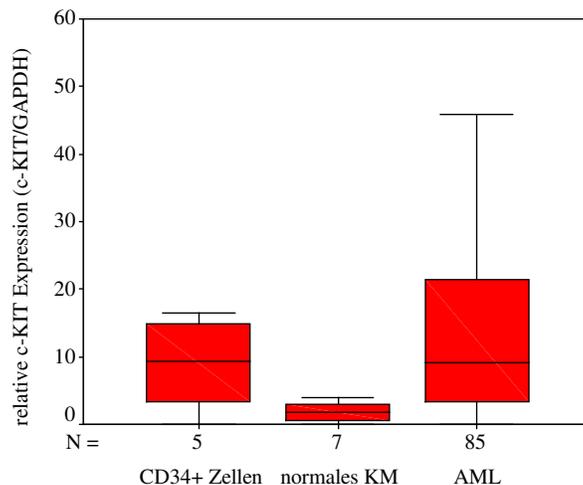


Abbildung 20. Darstellung der Unterschiede in der c-KIT Expression zwischen AML, CD34+Zellen und normalem Knochenmark als Boxplot. Während der Median (waagerechte Linie innerhalb der Box) bei AML und CD34+ Zellen annähernd gleich ist, zeigen die über dem Median liegenden 25% (oberer Teil der Box) sowie die restlichen oberen 15% (oberhalb der Box liegende Anteil) der AML Proben eine größere Streuung und insgesamt eine wesentlich höhere c-KIT Expression als CD34+Zellen. Im normalen Knochenmark ist dahingegen nur eine geringe c-KIT Expression nachweisbar.

Desweiteren fand sich im Mann-Whitney-U-Test bei AML Patienten mit hoher c-KIT Expression eine signifikant höhere Zyklin D2 Expression (Mittelwert: 42,0183 vs. 9,6129; mittlerer Rang: 44,94 vs. 26,41, Signifikanz des Mann-Whitney-U-Test: 0,0001; Tab. 10) als bei Patienten mit niedrigerer c-KIT Expression. Ebenso war eine Tendenz zu höherer Zyklin A1, A2, E1, E2 und C Expression in der AML Patientengruppe höherer c-KIT Expression erkennbar.

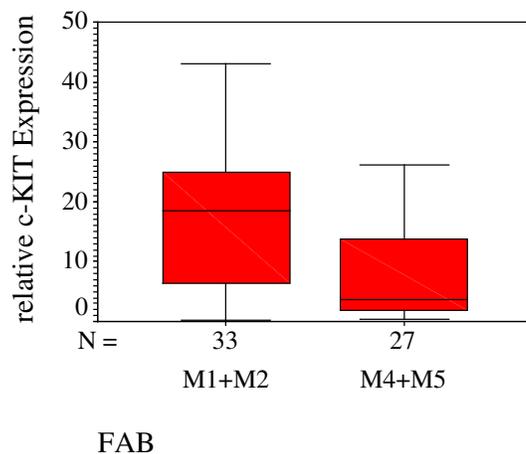


Abbildung 21. Darstellung der unterschiedlichen c-KIT Expression in den verschiedenen FAB Subtypen als Boxplot. In den myeloblastären FAB Subtypen M1 und M2 zeigt sich eine deutlich höhere c-KIT Expression als in den monozytären Subtypen FAB M4 und M5.

Darüberhinaus ergab der Mann-Whitney-U-Test mit einer Signifikanz von 0,03 eine niedrigere relative Expression des CDK-Inhibitors p21 Waf in der Patientengruppe mit einer über dem Median liegenden c-KIT Expression (mittlerer Rang: 29,38 vs. 39,86; Mittelwert: 2,3180 vs. 4,1057).

Die Kaplan-Meier Überlebensanalyse deckte mit einer Signifikanz von 0,04 eine deutlich längere rückfallsfreie Überlebenszeit (543 vs. 264 Tage; Abb. 9; Tab. 13) sowie ein längeres Gesamtüberleben (583 vs. 242 Tage; $p = 0,002$; Abb. 10) in der AML Patientengruppe höherer c-KIT Expression auf.

	c-KIT Expression > Median	c-KIT Expression < Median
mittlere Überlebenszeit	543 Tage	264 Tage
Standardfehler	85,51	55,03
95% Konfidenzintervall	375,34; 710,53	156,39; 372,12
Anzahl der Ereignisse	8	11
Anzahl zensierter Ereignisse	12	5
gesamt	20	16

Tabelle 13. Kaplan-Meier-Überlebensanalyse des rückfallsfreien Überlebens bei AML in Bezug auf die Höhe der c-KIT Expression. AML Patienten mit einer hohen Expression der Rezeptortyrosinkinase c-KIT zeigen eine deutlich längere rückfallsfreie Überlebenszeit als Patienten mit einer niedrigen c-KIT Expression (Abb.10).

3.2.2 CSF1R

Die CSF1R Rezeptortyrosinkinase (colony-stimulating factor 1 receptor) ist der Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden Faktor 1 (CSF1), auch bekannt als Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF). Dieser Rezeptor wird auf primitiven, pluri-potenten hämatopoetischen Stammzellen nur wenig bis mäßig exprimiert. Entwickeln sich diese Zellen zu lymphatischen Stammzellen, aus denen nur noch Lymphozyten (T-, B-Zellen und natürliche Killerzellen) hervorgehen können, findet sich keine CSF1R Expression mehr. Verläuft die Differenzierung jedoch durch IL-2 induziert in Richtung der myelo-monozytären Zellreihe, so kommt es zur Hochregulation des CSF1R Rezeptors (*Kondo et al. 2000*).

Die Rezeptortyrosinkinase CSF1R wurde insgesamt in 92,8% (79 von 85) der untersuchten AML Proben exprimiert (Mittelwert: 6,9439, Median: 2,4109, Minimum: 0, Maximum: 134,89). Dabei war die CSF1R Expression bei AML signifikant höher als im normalen Knochenmark und in den unreifen CD34+ Stammzellen, in denen sich die geringste CSF1R Expression fand (Tab. 6.1; Abb. 22).

Während der Median der relativen CSF1R Expression bei AML nur knapp über dem des normalen Knochenmarks liegt, weist ein erheblicher Teil der AML Fälle eine CSF1R Expression auf, die weit über die maximale Expression im normalen Knochenmark hinausreicht.

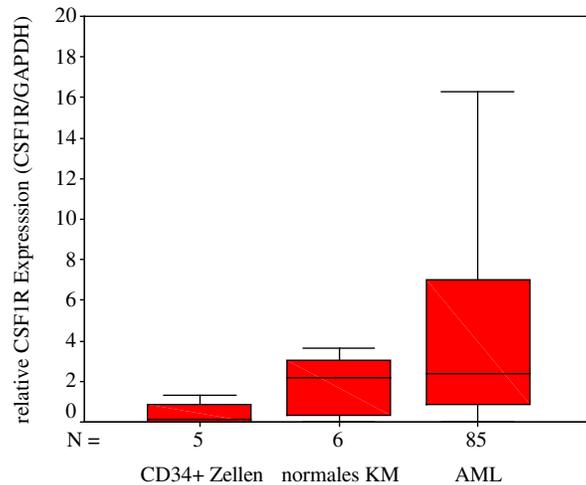


Abbildung 22. Darstellung der Unterschiede in der CSF1R Expression zwischen AML, CD34+Zellen und normalem Knochenmark als Boxplot. Während der Median für die Höhe der CSF1R Expression bei AML Blasten nur geringfügig höher ist als bei normalem Knochenmark, zeigen die oberen 50% der AML Proben eine deutlich größere Streuung und insgesamt eine wesentlich höhere CSF1R Expression als normales Knochenmark. CD34+ Zellen exprimieren vergleichsweise nur wenig CSF1R.

Entsprechend seiner Rolle als Rezeptor des Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktors wurde CSF1R in den monozytär differenzierten AML Formen FAB M4 und M5 signifikant stärker exprimiert als in den myeloblastären Formen FAB M1 und M2 (Mittlerwert: 12,962 vs. 3,315; $p = 0,002$; Tab. 7; Abb. 23).

Außerdem wies der Mann-Whitney-U-Test mit einer asymptotischen Signifikanz von 0,02 auf eine signifikant höhere Zyklin D3 Expression bei AML Patienten mit hoher CSF1R Expression hin (mittlerer Rang: 40,88 vs. 29,61; Tab. 11).

Während eine hohe Expression des strukturell ähnlichen c-KIT Rezeptors bei AML mit besserem Überleben korreliert, ergab die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit einer Signifikanz von 0,01 einen statistischen Zusammenhang zwischen hoher CSF1R Expression und einer um mehr als 300 Tage kürzeren rückfallsfreien Überlebenszeit (Tab. 14; Abb. 11).

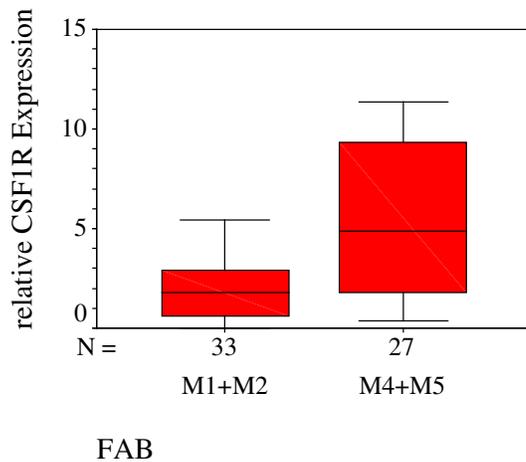


Abbildung 23. Darstellung der unterschiedlichen CSF1R Expression in den verschiedenen FAB Subtypen als Boxplot. Die monozytären FAB Subtypen M4 und M5 weisen eine erheblich höhere CSF1R Expression auf als die monoblastären FAB Subtypen M1 und M2.

	CSF1R Expression > Median	CSF1R Expression < Median
mittlere Überlebenszeit	262 Tage	580 Tage
Standardfehler	48,96	92,39
95% Konfidenzintervall	165,67; 357,58	398,74; 760,91
Anzahl der Ereignisse	13	6
Anzahl zensierter Ereignisse	4	13
gesamt	17	19

Tabelle 14. Kaplan-Meier-Überlebensanalyse des rückfallsfreien Überlebens bei AML in Bezug auf die Höhe der CSF1R Expression. AML Patienten mit einer hohen Expression der Rezeptortyrosinkinase CSF1R zeigen eine deutlich kürzere rückfallsfreie Überlebenszeit als Patienten mit einer niedrigen CSF1R Expression (Abb.11).

3.2.3 FLT3

Der Name FLT3 leitet sich ab von „FMS-like tyrosine kinase 3“ und stellt das humane Pendant zu dem viralen Onkogen v-FMS dar, welches aus dem „feline McDonough sarcoma virus“ stammt. Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 wird u.a. auf pluripotenten und multipotenten Stammzellen exprimiert. Zudem findet sich eine FLT3 Expression

bis zu einer bestimmten Reife auf Progenitoren von T- und B-Zellen, Granulozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und außerdem auf Progenitoren von Monozyten, wo die Expression bis zur Reife erhalten bleibt. Mit seinem Liganden FL (FLT3 Ligand) wirkt der Rezeptor FLT3 meist im Synergismus mit dem c-KIT Liganden und anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren bei der Steuerung von Wachstum, Überleben und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen und Progenitoren mit. Der FLT3 Rezeptor wird in der Mehrheit der leukämischen Zellen von AML Patienten exprimiert. Er fördert sowohl die Proliferation als auch das Überleben leukämischer Blasten und inhibiert die Apoptose durch Herunterregulation der Bax-Expression (*Lisovsky 1996*).

Auch bei unseren Analysen ergab sich in 94,1% (80 von 85) der AML Proben eine Expression des FLT3 Rezeptors (Mittelwert: 3043,773, Median: 11,3196, Minimum: 0, Maximum: 256129,66). Wie bereits erwähnt zeigte der Kruskal-Wallis-Test die mit Abstand höchste FLT3 Expression bei AML (Mittelwert: 3043,77), während sich in den CD34+ Stammzellen und im normalen Knochenmark nur eine vergleichsweise geringe Expression nachweisen ließ (Mittelwert der FLT3 Expression bei CD34+Stammzellen: 1,59; bei normalem Knochenmark:1,41; Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test: 0,0001; Tab. 6.1; Abb. 24).

Wie auch bei c-KIT fiel im Mann-Whitney-U-Test eine signifikant niedrigere Expression des CDK-Inhibitors p21 in der AML Patientengruppe mit höherer FLT3 Expression auf (mittlerer Rang: 29,60 vs. 40,56; Signifikanz: 0,02; Mittelwert: 2,2511 vs. 4,3324).

Desweiteren wurde die Häufigkeit des Auftretens von FLT3-ITD (internal tandem duplication) Mutationen untersucht. Dabei handelt es sich um die Verdopplung einer Sequenz im juxtamembranären Teil der FLT3 cDNA, die in der AML, nicht jedoch in der normalen Hämatopoese beobachtet wird und mit einer schlechteren Prognose der AML assoziiert ist (*Iwai 1999, Kiyoi 1999, Kondo 1999*).

In den analysierten AML Proben wurde in 80% (55 von 69) eine Expression des Wildtyp FLT3 Rezeptors gefunden, während in 20% (14 von 69) FLT3-ITD Mutationen anhand der Länge des PCR Produktes nachweisbar waren.

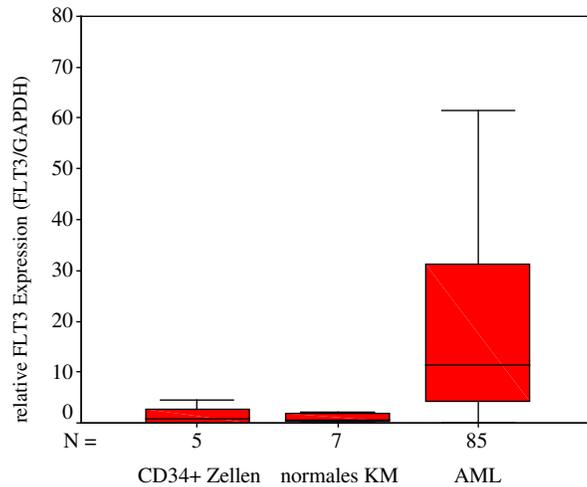


Abbildung 24. Darstellung der Unterschiede in der FLT3 Expression zwischen AML, CD34+Zellen und normalem Knochenmark als Boxplot. Aus den Boxplots geht hervor, dass der FLT3 Rezeptor in der Mehrheit (obere 75%) der AML Proben erheblich höher exprimiert wird als in CD34+ Zellen und im normalen Knochenmark.

In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigte sich ein Unterschied in der Überlebenszeit zwischen Patienten mit Wildtyp FLT3 und solchen mit FLT3-ITD- Mutationen (mittlere rückfallsfreie Überlebenszeit: 443 Tage bei Wildtyp FLT3 vs. 315 Tage bei FLT3-ITD-Mutationen). Dieser war aufgrund der geringen Patientenzahl jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,37$).

Der Mann-Whitney-U-Test ergab bei AML Patienten mit FLT3 ITD Mutation im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp FLT3 einen höheren Anteil an Blasten im Blut und höhere initiale Leukozytenzahlen (Tab. 15), wie dies bereits in der Literatur bei der akuten Promyelozytenleukämie beobachtet wurde (*Kiyoi 1997*).

	FLT3	N	Mittelwert	Standardabweichung	Mittlerer Rang im Mann-Whitney-U-Test	asympt. Sig. (2-seitig) im Mann-Whitney-U-Test
initiale Leukozytenzahl/ μ l	Wt	55	66134,55	137670,82	31,47	0,004
	ITD	14	176328,57	257069,47	48,86	
initialer Blastenteil im Blut (%)	Wt	55	49,73	33,43	32,2	0,02
	ITD	14	74,86	21,32	46	

Tabelle 15. Assoziation von FLT3 ITD Mutationen mit höheren initialen Leukozytenzahlen und höherem Blastenteil im Blut.

3.2.4 TRK A

Der hochaffine Neurotrophinrezeptor TRK A (Tropomyosin-Rezeptor-Kinase) spielt nicht nur im Nervensystem eine wichtige Rolle, sondern ist auch für die Hämatopoese von Bedeutung. Eine Expression dieses NGF (nerve growth factor) Rezeptors wurde sowohl bei Monozyten als auch bei B- und T-Lymphozyten beobachtet. Dabei fördert der TRK A Ligand NGF die Differenzierung von myeloischen Stammzellen, induziert Proliferation und Reifung von B-Lymphozyten und stimuliert die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus basophilen Granulozyten und Mastzellen. Zudem wirkt NGF über eine Induktion von Bcl-2 antiapoptotisch auf Mastzellen, B-Lymphozyten und Monozyten (*La Sala et al. 2000*). Neben neuronalem und hämatopoetischem Gewebe wurde eine Expression des TRK A Rezeptor darüber hinaus auch in Ösophagus-, Schilddrüsen- und Lungenkarzinomen beobachtet (*Koizumi et al. 1998; Ricci et al. 2001*).

Im Rahmen unserer Analyse wurde TRK A in 98,8% (84 von 85 Proben) der AML Patienten exprimiert (Mittelwert: 81,1999, Median: 1,3821, Minimum: 0, Maximum: 2840,14), wobei innerhalb der AML eine große Schwankungsbreite in der Expressionshöhe bestand. Der Vergleich der TRK A Expression zwischen CD34+ Zellen, normalem Knochenmark und AML ergab bei ähnlichem Median eine deutlich gesteigerte TRK A

Expression in einem Teil der AML Proben, die die maximale Expression in CD34+ Zellen und normalem Knochenmark weit übertrifft (Abb. 25).

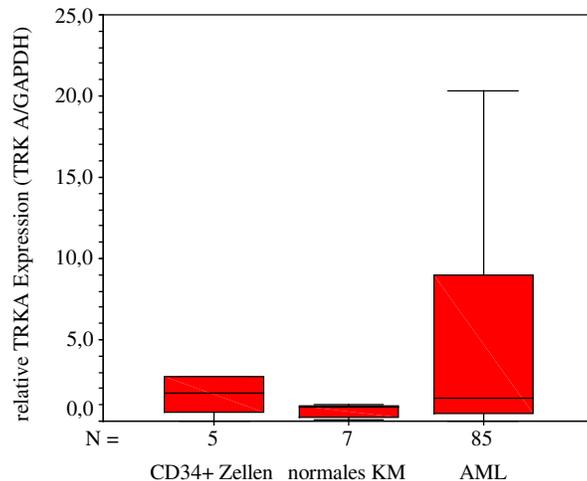


Abbildung 25. Darstellung der Unterschiede in der TRK A Expression zwischen AML, CD34+Zellen und normalem Knochenmark als Boxplot. Bei ähnlichem Median weist die obere Hälfte der AML Blasten eine deutlich höhere TRK A Expression auf als CD34+ Zellen und normales Knochenmark.

Außerdem untersuchten wir die TRK A Expression in verschiedenen Leukozytenpopulationen, wobei sich die höchste TRK A Expression in CD34+/CD33- also sehr frühen hämatopoetischen Stammzellen fand, wohingegen sich in den etwas reiferen CD34+/CD33+ Zellen nur noch eine sehr geringe TRK A Expression ergab. Darüber hinaus wiesen auch natürliche Killerzellen (CD56) eine relative hohe TRK A Expression auf (Abb. 26).

Da sich innerhalb der Gruppe der AML Proben sehr große Unterschiede in der Höhe der TRK A Expression zeigten, verglichen wir mittels Mann-Whitney-U-Tests verschiedene AML Subtypen bezüglich ihrer TRK A Expression miteinander. Dabei ließ sich in den myeloblastären Leukämieformen FAB M1 und M2 eine signifikant höhere Expression der Rezeptortyrosinkinase TRK A beobachten als in den monozytären Formen FAB M4

und M5 (mittlerer Rang: 36,67 vs. 22,96, $p = 0,002$; Mittelwert: 90,69 vs. 2,00; Tab. 7; Abb. 27).

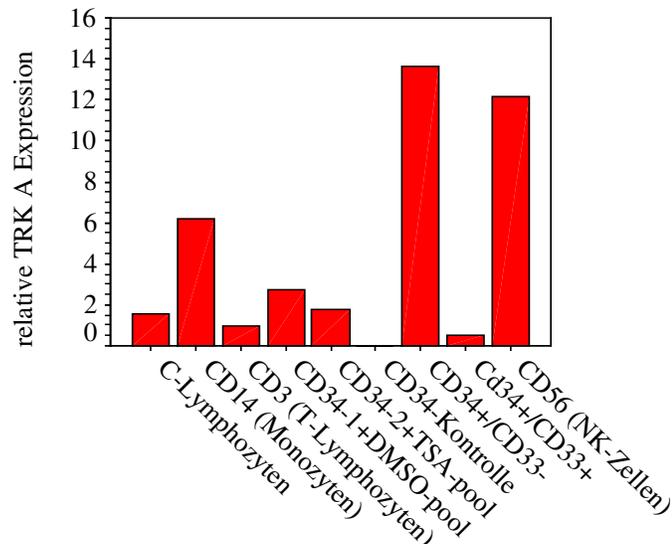


Abbildung 26. Vergleich der TRK A Expression zwischen unterschiedlichen Leukozytenpopulationen. Die höchste TRK A Expression war in sehr frühen CD34+/CD33- hämatopoetischen Stammzellen und in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nachweisbar.

Außerdem ergab der Mann-Whitney-U-Test bei AML Patienten mit einer hohen TRK A Expression (oberhalb des Medians von 1,3821) eine signifikant höhere Expression von Zyklin D2 (mittlerer Rang 41,67 vs. 28,89; asymptotische Signifikanz: 0,008; Tab. 10) sowie signifikant niedrigere initiale Thrombozytenwerte (mittlerer Rang 29,89 vs. 39,86, Signifikanz: 0,04; Mittelwert: 51182 vs. 81972) als bei AML Patienten mit einer niedrigeren (unterhalb des Medians liegenden) TRK A Expression.

Dennoch deutete die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse auf ein längeres rückfallsfreies Überleben (523,98 vs. 318,35 Tage) der AML Patienten mit höherer TRK A Expression im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit niedrigerer Expression hin (Abb. 28).

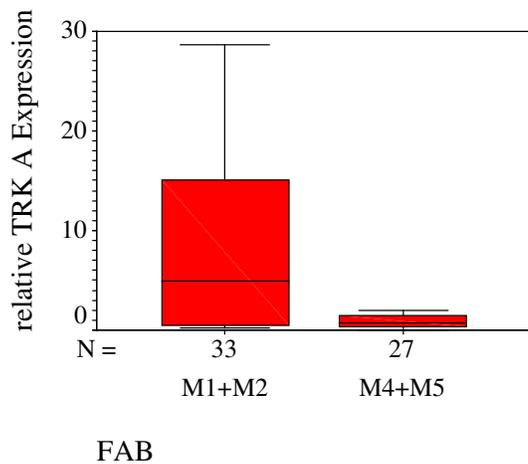


Abbildung 27. Darstellung der unterschiedlichen TRK A Expression in den verschiedenen FAB Subtypen als Boxplot. Bei den myeloblastären AML Subtypen FAB M1+M2 lässt sich eine sehr viel höhere TRK A Expression beobachten als in den monozytären Subtypen FAB M4+M5.

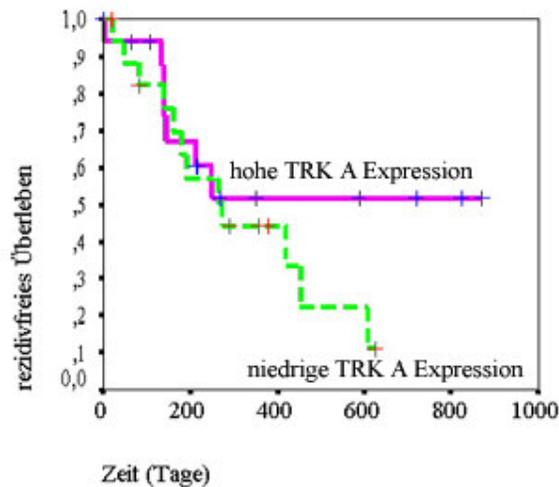


Abbildung 28. Kaplan-Meier-Analyse der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML. Bei Patienten mit einer über dem Median (1,3821) liegenden TRK A Expression ($n = 18$) deutet sich ein längeres rückfallsfreies Überleben an als bei Patienten mit einer unter dem Median liegenden TRK A Expression ($n = 18$) ($p = 0,298$).

3.3 Analyse der Deletionsmutante Δ TRK A mittels konventioneller PCR

Im Vergleich zu den anderen näher beschriebenen Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, CSF1R und FLT3 wurde TRK A von der Forschung bisher eher selten mit AML in Verbindung gebracht. Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass TRK A, insbesondere die kürzlich von Reuther entdeckte Deletionsmutante Δ TRK A, eine Rolle bei der Entstehung von Leukämie spielen könnte (Reuther *et al.* 2000). Um die generelle Bedeutung dieser Mutation für die AML abschätzen zu können, wurde daher die Häufigkeit des Auftretens der Δ TRK A Mutation bei AML Patienten aus Münster genauer untersucht.

In einem ersten Schritt wurden dabei die beiden leukämischen Zelllinien K562 und KG1, bei denen in der Literatur eine TRK A Expression beschrieben wurde, in Kultur genommen, um später eine positive Kontrolle für das eigentliche Experiment zu gewinnen (Xie *et al.* 2000). Die Expression der Rezeptortyrosinkinase TRK A lässt sich in diesen Zellen u.a. durch all-trans-Retinoinsäure (ATRA) induzieren, deren Rezeptor RAR α einen Transkriptionsaktivator darstellt (Xie *et al.* 1997). Deshalb wurden beide Zelllinien mit unterschiedlich hohen Konzentrationen von all-trans-Retinoinsäure (10^{-9} bis 10^{-6} M ATRA) behandelt, um so die Expression von TRK A zu steigern.

Darauf folgten die Isolation der RNA aus diesen Zellen und die anschließende reverse Transkription in die komplementäre DNA. Diese cDNA wurde schließlich im Taqman mittels der gegenüber der konventionellen PCR sensitiveren Real-time-RT-PCR analysiert. Dabei wiesen beide Zelllinien in der RT-PCR eine Expression von TRK A auf, mit Ausnahme der mit 10^{-6} M ATRA behandelten K562 Zellen und der ohne ATRA kultivierten KG1 Zellen, bei denen jeweils auch nach dem 40. PCR-Zyklus das Fluoreszenzsignal für TRK A unter dem festgelegten Schwellwert lag.

Während sich die TRK A Expression in K562 Zellen als ATRA-unabhängig erwies, zeigten die KG1 Zellen eine mit steigender ATRA Konzentration zunehmende TRK A Expression (Abb. 29). Die mit der höchsten ATRA Konzentration (10^{-6} M) behandelten KG1 Zellen zeigten auch im Vergleich zu K562 Zellen die höchste TRK A Expression und wurden deshalb für die weiteren Experimente ausgewählt.

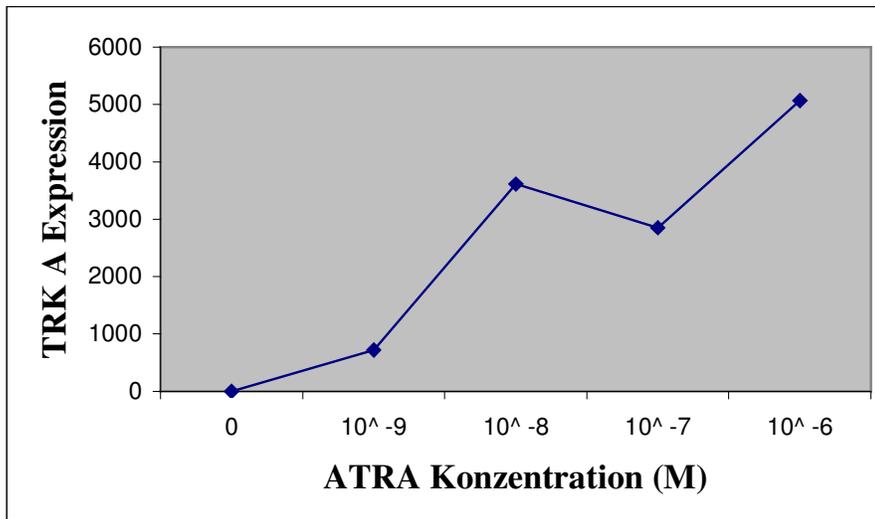


Abbildung 29. Dosisabhängige Induktion von TRK A durch ATRA in KG1 Zellen. Die TRK A Expression (standardbezogene TRK A Expression/standardbezogene GAPDH Expression) in KG1 Zellen steigt mit zunehmender ATRA Konzentration an.

Mittels konventioneller PCR wurde versucht, eine Expression der aktivierenden Deletionsmutante Δ TRK A in der Leukämiezelllinie KG1 sowie in primären AML Blasten nachzuweisen. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Deletion von 225 Nukleotiden, die zu einem Verlust von 75 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne des Rezeptors und damit zu einer konstitutionell aktivierten Tyrosinkinaseaktivität führt. Durch diese Deletion entsteht ein um 225 Nukleotide verkürztes PCR-Produkt von insgesamt 101 bp Länge, wohingegen ein normales Wildtyp TRK A Gen ein entsprechend längeres PCR-Produkt von 326 bp Länge ergibt (*Reuther et al. 2000*).

Die vorgenommenen PCR Analysen mit der aus den KG1 Zellen (mit 10^{-6} M ATRA behandelt) gewonnenen cDNA bestätigten die schon in der RT-PCR festgestellte Expression von TRK A. Diese manifestierte sich in einer dem Wildtyp TRK A zuzuordnenden einzelnen, deutlich erkennbaren Bande, die einem PCR Produkt von 326 bp Länge entsprach. Die Δ TRK A Mutation, die sich in einer zweiten Bande von 101 bp Länge zeigen würde, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der nunmehr etablierte Nachweis von TRK A wurde daraufhin auf die cDNA aus 57 AML Patientenproben angewandt. Dabei konnte in 46 Fällen eine TRK A Expression festgestellt werden. Nur in 11 AML Proben ließ sich keine TRK A spezifische Bande finden. Demgemäß zeigten 80,7% der untersuchten AML Proben (46 von 57 Proben) jeweils eine 326 bp entsprechende Bande, die auf eine Expression des Wildtyp TRK A Rezeptors hindeutete (Abb. 30).

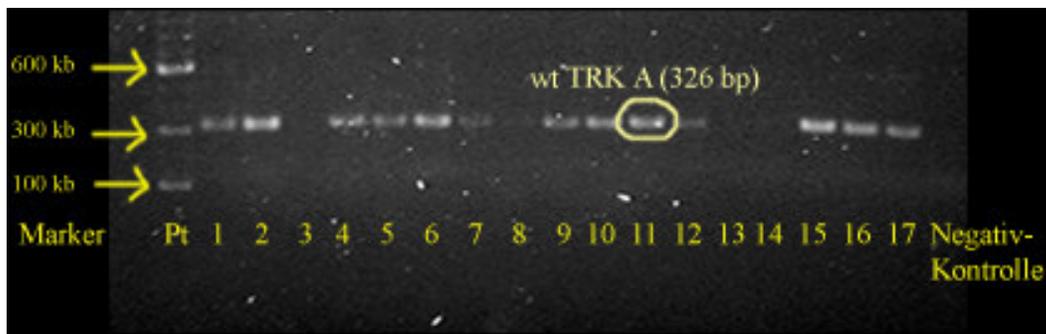


Abbildung 30. PCR von 17 AML Patienten mit Nachweis der Expression des Wt TRK A Rezeptors. Bei den Patienten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 zeigt sich eine deutliche Bande von 326 bp Länge, die dem Wildtyp TRK A Rezeptor entspricht. Bei den Patienten 3, 8, 13, 14 bzw. in der Negativkontrolle findet sich hingegen keine Bande. Keiner der Patienten wies die Δ TRK A Mutation auf, die eine Bande bei 101 bp ergeben würde.

Das für Δ TRK A spezifische kürzere PCR Produkt von 101 bp konnte hingegen in keinem der AML Fälle gefunden werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Δ TRK A nur in wenigen Fällen von AML vorkommt. Damit bestätigt sich Reuthers Hypothese, bei Δ TRK A handele es sich um eine eher seltene, nur sporadisch bei der AML auftretende Mutation.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von Rezeptortyrosinkinasen bei der AML zu untersuchen. Die dadurch gewonnenen Ergebnisse über die Expression von Rezeptortyrosinkinasen bei der AML können dazu beitragen, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Hierzu ermittelten wir mittels Real-time-RT-PCR in 85 AML Patientenproben die Expression von 55 verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen aus allen bekannten Rezeptortyrosinkinasefamilien und setzten diese in Beziehung zu normalem Knochenmark und CD34+ Stammzellen. Desweiteren suchten wir nach statistischen Zusammenhängen zwischen der Expression von Rezeptortyrosinkinasen und Parametern wie FAB Klassifikation, Zyklinexpression, Überleben und Blutbild.

Die Methode der Real-time-RT-PCR wurde für diese Arbeit ausgewählt, da sie gegenüber der konventionellen PCR zahlreiche Vorteile bietet. Durch ihre Schnelligkeit und den hohen Durchsatz eignet sie sich nicht nur ideal für umfangreiche Screening-Analysen unterschiedlicher Faktoren bei einer großen Patientenzahl, sondern sie erlaubt darüber hinaus auch eine verlässliche Bestimmung der Anfangskopienzahl des untersuchten Gens. Zudem ermöglicht diese Methode Messungen in einem weiten dynamischen Spektrum, so dass sich die Notwendigkeit serieller Verdünnungen der Proben reduziert. Da es sich um ein automatisiertes, geschlossenes System handelt und keine weiteren post-PCR Manipulationen erforderlich sind, verringert sich die Kontaminationsgefahr. Außerdem zeichnet sich die Real-time-RT-PCR durch eine hohe Sensitivität und geringere Variabilität als die konventionelle PCR aus. So wird in der Literatur eine Variabilität zwischen Duplikaten bzw. Triplets in demselben Experiment von 0-5% und zwischen unterschiedlichen Platten von unter 10% beschrieben, während für die konventionelle PCR eine Variabilität von 14% angegeben wird (*Bièche et al. 1998; Bustin 2000*). Diese Variabilität ist zum Teil durch die unterschiedliche Effizienz der reversen Transkription und der PCR-Reaktion bedingt, was eine entsprechende Standardisierung erforderlich macht. Wenngleich zwar eingeräumt werden muss, dass durch den exponentiellen Charakter bereits kleine Unterschiede in der Menge des Ausgangsmaterials oder der Reagenzien das Endergebnis beeinflussen können, stellt die Real-

time-RT-PCR im Allgemeinen jedoch ein sehr zuverlässiges Mittel dar, großangelegte Expressions-Untersuchungen wie die vorliegende durchzuführen.

Dabei lieferte unsere Analyse der Expression von 55 Rezeptortyrosinkinasen in AML mittels Real-time-RT-PCR zahlreiche Ergebnisse, die teilweise in der Literatur Bestätigung finden, größtenteils aber weit über den bisherigen Forschungsstand hinausgehen. So zeigte sich insgesamt in den AML Blasten auf mRNA Ebene in über 50% der Fälle eine Expression von 18 verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen. Neben den Mitgliedern der PDGFR Familie, deren Expression in AML und hämatopoetischen Stammzellen bereits gut dokumentiert ist, wurde interessanterweise auch eine Expression anderer, bisher weniger bekannter Rezeptortyrosinkinasenfamilien beobachtet. Im Gegensatz zum normalen Knochenmark und zu CD34+ Stammzellen, die eine Fülle verschiedener Rezeptortyrosinkinasen gleichzeitig exprimierten, beschränkte sich die Expression bei AML Blasten auf einige wenige Rezeptortyrosinkinasen. Damit kommt der einzelnen Rezeptortyrosinkinase bei der AML möglicherweise eine größere Bedeutung für das Zellüberleben zu, als dies bei einer größeren Redundanz in der Expression von Rezeptoren der Fall wäre, wie sie bei hämatopoetischen Stammzellen oder anderen Tumorarten beobachtet wird. Hierdurch scheint gerade bei der AML im Vergleich zu anderen Tumorarten eine selektive Inhibition einzelner Rezeptortyrosinkinasen, auf deren Funktion die AML Blasten im Gegensatz zu Zellen der normalen Hämatopoese zum Überleben angewiesen sind, eine aussichtsreiche Therapieoption darzustellen.

Zudem konnte im Vergleich zum normalen Knochenmark und CD34+ Stammzellen bei AML Blasten nicht nur eine signifikante Überexpression der PDGFR Mitglieder c-KIT, CSF1R und FLT3 nachgewiesen werden, sondern auch eine Überexpression der Rezeptortyrosinkinasen EPHB6 und LTK sowie eine Tendenz zu höherer TRK A Expression. Darüber hinaus ließ sich bei mehreren Rezeptortyrosinkinasen (CSF1R, DDR1, INSR, AXL und RET) eine Assoziation zwischen hoher Rezeptorexpression und überwiegend kürzerem Überleben bei AML herstellen. Da jedoch die Überexpression einiger Rezeptortyrosinkinasen gleichfalls mit einer hohen Zyklinexpression korrelierte, welche ihrerseits auch mit einer schlechten Prognose bei manchen Tumoren einhergehen kann, lag es nahe zu prüfen, ob sich der beobachtete Zusammenhang zwischen

Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen und kürzerem Überleben über die Zyklinexpression erklären ließe. Der Vergleich der rückfallsfreien Überlebenszeit bei AML zwischen Patienten mit niedriger Zyklinexpression (unterhalb des jeweiligen Medians) und Patienten mit hoher Zyklinexpression (oberhalb des Medians) mittels Kaplan-Meier-Überlebensanalyse lieferte aber für keines der untersuchten Zykline einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Zyklinexpression und Überleben bei AML. Außerdem war eine Expression der Rezeptortyrosinkinase RET, die im Gegensatz zu den meisten anderen Rezeptoren mit einer signifikant niedrigeren Expression der Zykline A1 und D2 korrelierte, ebenso mit einem schlechteren Überleben assoziiert wie beispielsweise eine hohe Expression des Insulinrezeptors INSR, die umgekehrt mit einer signifikant höheren Expression der Zykline A1, A2 und E1 korrelierte. Dies spricht ebenfalls dafür, dass sich der statistische Zusammenhang zwischen hoher Expression der Rezeptortyrosinkinasen CSF1R, DDR1, INSR, AXL und RET und schlechterem Überleben bei AML nicht auf eine Veränderung der Expressionsrate bestimmter Zykline zurückführen lässt, sondern einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt.

Da sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht alle gefundenen Ergebnisse erschöpfend diskutieren lassen, soll sich der Fokus auf die bei der AML am häufigsten exprimierten Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, CSF1R, FLT3 und TRK A richten. Zudem erlaubt die umfangreiche Literatur zu diesen Rezeptortyrosinkinasen eine genaue Erörterung unserer Messdaten im Kontext der bisherigen Forschung.

4.1 c-KIT

Unsere Analysen der Rezeptortyrosinkinase c-KIT ergaben in 96,5% der AML Proben eine c-KIT Expression, die signifikant höher war als in CD34+ Stammzellen und normalem Knochenmark. Dabei wurde innerhalb der AML in den myeloblastären Formen FAB M1 und M2 eine höhere c-KIT Expression beobachtet als in den monozytären Formen FAB M4 und M5. Desweiteren zeigte sich eine Assoziation zwischen hoher c-KIT

Expression und höherer Zyklin D2 Expression, niedrigerer Expression des CDK-Inhibitors p21 Waf und überraschenderweise signifikant längerer rückfallsfreier Überlebenszeit bei AML Patienten.

Bei der Rezeptortyrosinkinase c-KIT handelt es sich um das menschliche, zelluläre Homolog des im Provirus des Hardy-Zuckerman 4 Katzen Sarkom Virus entdeckten viralen Onkogens v-KIT. Physiologischerweise wird eine c-KIT Expression hauptsächlich im Knochenmark, in Mastzellen und Melanozyten beobachtet. Dabei ist die Funktion dieses Rezeptors sowohl für die normale Hämatopoese als auch für die Gametogenese und Melanogenese von Bedeutung, wodurch sich das aus inaktivierenden, „missense“ Mutationen dieses Rezeptors resultierende vererbare Krankheitsbild des „Piebaldismus“ mit fehlender Pigmentierung erklären lässt (*Robertson et al. 2000*).

Aktivierende Mutationen hingegen, die zu einer konstitutionellen Aktivierung des c-KIT Rezeptors führen, sind mit Mastozytose und familiären gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) assoziiert. Im Februar 2002 wurde in den USA für die Behandlung gastrointestinaler Stromatumoren der Tyrosinkinaseinhibitor STI571 zugelassen, der nicht nur die nicht-Rezeptortyrosinkinase abl hemmt und daher für die Behandlung bcr/abl-positiver chronischer myeloischer Leukämien eingesetzt wird, sondern auch die Rezeptortyrosinkinasen PDGFR und c-KIT inhibiert. Dieses Prinzip der spezifischen Hemmung einzelner Rezeptortyrosinkinasen wie c-KIT bietet eventuell neue Therapieansätze für die Behandlung von Neoplasien, denen eine Überaktivität der Rezeptortyrosinkinase c-KIT entweder durch aktivierende Mutationen oder durch gesteigerte Expression zugrunde liegt.

Im Rahmen der Hämatopoese wird c-KIT vor allem auf frühen hämatopoetischen Stammzellen zusammen mit dem Stammzellmarker CD34 exprimiert und im Laufe der weiteren Differenzierung herunterreguliert. Da die Rezeptortyrosinkinase c-KIT für die normale Hämatopoese von Bedeutung ist, aber auch bei einer Reihe hämatologischer Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheint, wurde die Expression dieses Rezeptors auf unterschiedlichen Zellpopulationen in einer Vielzahl von Studien untersucht. So steigt innerhalb des Kompartiments der pluripotenten Stammzellen die c-KIT Expression mit abnehmendem Ruhezustand bzw. Selbsterneuerungspotential der Stammzellen zunächst

an. Diese pluripotenten Stammzellen entwickeln sich dann entweder in Richtung der myeloischen oder der lymphatischen Reihe weiter. Dabei findet sich auf multipotenten myeloischen Progenitorzellen sowie den daraus hervorgehenden BFUs („burst-forming units“) und den nachfolgenden CFUs („colony-forming units“) der erythroiden, megakaryozytären, granulozytär/monozytären und basophilen Reihe in der Regel ebenfalls eine c-KIT Expression. Diese geht jedoch in der weiteren Differenzierung zu reifen Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen im Allgemeinen verloren bzw. ist nur noch vereinzelt auf Monozyten und Megakaryozyten nachweisbar. Eine Ausnahme bilden hierbei basophile Granulozyten und Mastzellen, die auch noch als reife Zellen c-KIT exprimieren. Im Gegensatz zur myeloischen Reihe wird c-KIT auf multipotenten lymphatischen Progenitorzellen und auf den davon abgeleiteten Pro-B-Zellen nur teilweise exprimiert, während sich auf Progenitoren von natürlichen Killerzellen (NK Zellen) und auf Pro-T-Zellen in der Regel eine c-KIT Expression nachweisen lässt. Auf reifen T- und B-Zellen findet sich hingegen keine Expression mehr, nur noch auf spezifischen Populationen ruhender NK Zellen mit hoher CD56 Expression (*Lyman et Jacobsen 1998*).

Der Ligand des c-KIT Rezeptors, der sogenannte KL (= Steel Faktor) oder Stammzellfaktor („stem cell factor“, SCF), wird physiologischerweise in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wie z.B. Stromazellen, Fibroblasten, Endothelzellen, und spielt während der Embryogenese eine wichtige Rolle für Proliferation, Überleben und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, Keimzellen und Melanozyten (*Lyman et Jacobsen 1998*). Im Rahmen der Hämatopoese fördert SCF dabei im Synergismus mit Erythropoetin die Proliferation erythroider Progenitoren sowie im Synergismus mit anderen Zytokinen, v.a. mit Thrombopoetin, Wachstum und Reifung von Megakaryozyten. Darüber hinaus stimuliert SCF Überleben, Proliferation, Chemotaxis, Adhäsion und die IgE-vermittelte Degranulation von Mastzellen (*Scheijen et Griffin 2002*).

Neben seinem Einfluss auf hämatopoetische Zellen zeigte SCF zudem in einigen Leukämiezelllinien und in einem Großteil frischer AML Blasten allein oder im Synergismus mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren eine proliferationsfördernde Wirkung (*Ikeda et al. 1991; Kuriu et al. 1991; Broudy et al. 1992; Pietsch et*

al. 1992; Kanakura et al. 1993). Dabei ließ sich in einigen Leukämiezellen bereits vor der Stimulation durch SCF eine Aktivierung von c-KIT in Form einer Phosphorylierung nachweisen. Darüber hinaus legt die Beobachtung einer Koexpression des c-KIT Rezeptors zusammen mit seinem Liganden SCF auf Leukämiezelllinien und auf AML Blasten die Vermutung eines autokrinen bzw. juxtakrinen Stimulationsmechanismus nahe. So wiesen Caceres-Cortes et al. die Bedeutung des c-KIT Rezeptors und seines membran-gebundenen Liganden SCF für das Überleben primärer AML Blasten nach (Caceres-Cortes et al. 2001). Normalerweise benötigen AML Blasten für eine autonome Proliferation eine hohe Zelldichte, welche Zell-Zell Interaktionen über den c-KIT Rezeptor und seine membrangebundenen Liganden ermöglicht, wohingegen bei geringeren Zellkonzentrationen die Zufuhr exogener Wachstumsfaktoren erforderlich wird. Durch die gezielte Hemmung des membrangebundenen SCF in AML Blasten mittels Antisense Strategien gelang es Carceres-Cortes, dieses Zelldichte-abhängige Wachstum zu verhindern und Apoptose zu induzieren. Diese Rolle des c-KIT Rezeptorsystems in der Proliferationsregulation von AML Blasten macht verständlich, warum eine Überexpression des c-KIT Rezeptors möglicherweise die autonome Proliferation von Leukämiezellen begünstigt.

In der Tat lässt sich eine c-KIT Expression bei der AML häufig beobachten. So wird in der Literatur je nach Studie eine c-KIT Expression in 60-87% der AML Fälle beschrieben [Sperling et al. 1997: 60% in Kinder und Erwachsenen AML; Schwartz et al. 1999: 63% (917 Erwachsenen AML Fälle, 167 Kinder AML); Valverde et al. 1996: 67%; Bene et al. 1998: 67% (69% entsprechend 613 von 883 Erwachsenen AML Fällen vs. 58% entsprechend 128 von 220 Kinder AML Fällen); Lauria et al. 1995: 70% (69 von 98 AML Fällen); Ikeda et al. 1991: 80% (20 von 25); Reuss-Borst et al. 1994: 87% (41 von 47 AML Fällen); Broudy et al. 1992: 100% (20 von 20)]. Desweiteren fand sich eine c-KIT Expression in 84% (16 von 19) von Patienten in myeloider Blastenkrise bei myeloproliferativen Erkrankungen (Valverde et al. 1996) sowie in 33% biphänotypischer akuter Leukämien (BAL) und in vier von vier untersuchten Fällen undifferenzierter akuter Leukämie (Bene et al. 1998). In der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) hingegen wird eine c-KIT Expression vergleichsweise selten entdeckt

(ca. 4%) und dann vor allem bei unreifen T-Zell ALL Fällen [*Reuss-Borst et al. 1994*: 0% (0 von 40 ALL Proben); *Lauria et al. 1995*: 2,7% (1 von 37 ALL Proben); *Valverde et al. 1996*: 4% (1 von 23 ALL Fällen); *Sperling et al. 1997*: 9% T-ALL vs. <3% B-ALL; *Bene et al. 1998*: 4% in ALL (11% entsprechend 23 von 207 T-ALL Fällen vs. 2% entsprechend 11 von 612 B-ALL Fällen)]. Daher schlugen Bene et al. c-KIT auch als diagnostischen Marker für den myeloiden Ursprung einer akuten Leukämie vor.

In den oben zitierten Studien wurde der c-KIT Rezeptor meist auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz bzw. Durchflusszytometrie direkt auf den AML Blasten nachgewiesen. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem in ihrer Spezifität, da sie erlaubt, gezielt den c-KIT Rezeptor auf einzelnen Blasten zu messen. Dafür ist die Detektionsschwelle jedoch relativ hoch, so dass eine geringe c-KIT Expression unter Umständen nicht erfasst wird. So zeigte sich in der Studie Laurias mittels Northern Blot Analyse nicht nur in der Mehrzahl der vorher durch Antikörperbindung als c-KIT+ eingestuften AML Fälle eine c-KIT Expression auf RNA Ebene, sondern auch in solchen Fällen, in denen vorher mittels Antikörper keine c-KIT Expression entdeckt werden konnte (*Lauria et al. 1995*). Außerdem unterscheiden die meisten Studien nur zwischen dem Vorhandensein und dem Fehlen einer c-KIT Expression und differenzieren nicht nach unterschiedlicher Expressionshöhe. Die von uns angewandte Methode der RT-PCR hingegen zeichnet sich durch eine wesentlich höhere Sensitivität aus, wodurch sich die von uns auf mRNA Ebene gemessene viel höhere Expressionsrate von 96,5% (82 von 85) bei der AML erklären lässt. Dabei fanden wir in allen FAB Subtypen eine c-KIT Expression, welche allerdings in den myeloischen Subtypen FAB M1 und FAB M2 signifikant höher war als in den monozytischen Subtypen FAB M4 und FAB M5 (Mittelwert: 55,187 vs. 46,197; $p = 0,004$). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit mehreren anderen Studien, in denen FAB-unabhängig in allen AML Subtypen eine c-KIT Expression nachgewiesen werden konnte. In den meisten dieser Studien jedoch wurde in den myeloischen Subtypen FAB M1 und M2 häufiger eine c-KIT Expression entdeckt als in den Subtypen M4 und M5, was sich durch die relativ geringe Expressionshöhe in den beiden letztgenannten Subtypen erklären ließe (*Schwartz et al. 1999*; *Bene et al. 1998*; *Cole et al. 1996*; *Reuss-Borst et al. 1994*). Nur

Lauria et al. beobachteten stattdessen häufiger eine c-KIT Expression in den FAB Subtypen M4 und M5 (*Lauria et al. 1995*).

Desweiteren ergab unser Vergleich der relativen Expressionshöhe in den AML Proben (Mittelwert: 42,068; Median: 9,055) eine signifikant höhere c-KIT Expression als in CD34+ Stammzellen (Mittelwert: 8,767; Median: 9,249) und normalem Knochenmark (Mittelwert: 1,819; Median: 1,779; $p = 0,009$). Dabei zeigte sich innerhalb der Gruppe der AML eine große Schwankungsbreite in der relativen Höhe der c-KIT Expression. Dies spiegelt sich in dem auffälligen Unterschied zwischen dem Median und dem Mittelwert der c-KIT Expression wider. Während der Median der Expressionshöhe bei AML ungefähr dem Median der CD34+ Zellen entsprach, bzw. sogar eher leicht darunter lag, wies ein Teil der AML Proben eine deutlich gesteigerte c-KIT Expression auf, die in dem erheblich höheren Mittelwert zum Ausdruck kommt. Die Expression in den CD34+ Stammzellen hingegen erschien relativ homogen und war um einiges höher als die Expression in normalem Knochenmark. Diese relativ hohe Expression des c-KIT Rezeptors sowohl in AML Blasten als auch in CD34+ Zellen entspricht der in der Literatur beschriebenen Koexpression von c-KIT und dem Stammzellmarker CD34 auf unreifen myeloischen Zellen (*Muroi et al. 1995*; *Sperling et al. 1997*). Zudem wiesen bereits Cole et al. auf die von uns beobachtete Variabilität in der Höhe der c-KIT Expression auf AML Blasten hin. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurden in der genannten Studie mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie in den 80 untersuchten AML Proben ähnliche oder sogar geringere c-KIT Rezeptorlevel gemessen als auf normalen Stammzellen und Progenitorzellen (*Cole et al. 1996*). Auch Broudy et al. beschrieben eine ähnlich hohe oder geringere c-KIT Expression in AML Blasten als in normalen Blasten (*Broudy et al. 1992*). Zwar stimmen diese Beobachtungen mit dem Vergleich der von uns errechneten Mediane für die relativen Expressionshöhe zwischen AML Blasten und CD34+ Stammzellen überein, sie bestätigen aber nicht die von uns gefundene starke c-KIT Überexpression in einem Teil der AML Fälle. Diese Differenz lässt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Methodik erklären. Zum einen könnte es sein, dass es in den AML Blasten – beispielsweise durch gesteigerte Transkription oder Genamplifikation – zwar zu einer starken Zunahme der c-KIT mRNA

kommt, wie sie in der RT-PCR gemessen wurde, dass dieser Überschuss an c-KIT mRNA jedoch nicht in das entsprechende Rezeptorprotein translatiert wird, welches man in der Immunfluoreszenz detektieren würde. Dem könnten verschiedene Ursachen zugrunde liegen, beispielsweise eine verkürzte Halbwertszeit der mRNA sowie c-KIT Mutationen, die entweder zu einem nichtfunktionstüchtigen Rezeptor führen oder nicht mehr vom anti-c-KIT-Antikörper erkannt werden. Zum anderen könnte es sein, dass die Immunfluoreszenz nicht in der Lage ist, den quantitativen Unterschied zwischen AML Blasten mit durchschnittlicher c-KIT Expression und solchen mit starker Überexpression exakt zu bestimmen. Dies könnte möglicherweise der Fall sein, wenn es aufgrund hoher Rezeptordichte zu einer spontanen ligandenunabhängigen Rezeptordimerisierung käme, so dass die Bindung des in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörpers an sein Epitop beeinträchtigt würde. Wenngleich eine c-KIT Überexpression bei der AML wohl nicht generell vorkommt, kann letztlich nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest in einem Teil der AML Fälle eine solche Überexpression doch vorliegt und eventuell an der Pathogenese der Leukämie beteiligt sein könnte.

Bestätigt wird diese Hypothese dadurch, dass in der Literatur bereits einige Fälle einer erhöhten c-KIT Expression im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen beobachtet wurden. So ergab eine Studie Shaos in mononukleären Zellen des Knochenmarks von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) signifikant höhere c-KIT Protein und mRNA Level als in Zellen normaler Kontrollen (*Shao et al. 2001*). Dabei wies dieser überexprimierte c-KIT Rezeptor bei MDS in dem Sinne eine gestörte Funktion auf, dass sich im Gegensatz zu den Kontrollen keine weitere Stimulation der Koloniebildung durch SCF, IL-3 oder Erythropoetin mehr erreichen ließ. Außerdem wurden in dieser Studie bei refraktärer Anämie mit Blasten Exzess (RAEB) bzw. in Transformation (RAEB-t) signifikant höhere c-KIT Proteinlevel gemessen als bei refraktöser Anämie alleine. Auch bei Patienten mit Mastozytose fand sich eine gegenüber Kontrollen erhöhte c-KIT mRNA Expression. Diese betraf nur solche Patienten mit einem assoziierten myelodysplastischen Syndrom oder mit aggressiver Mastozytose, nicht jedoch mit indolenter Mastozytose (*Nagata et al. 1998*).

Bislang gibt es keine gesicherten Forschungsergebnisse über die zellulären Auswirkungen einer gesteigerten c-KIT Expression. Nichtsdestoweniger kann eine konstitutive Expression des c-KIT Rezeptors das leukämische Potential von myeloiden Zellen verstärken, wie in einem Mäusemodell gezeigt wurde (*Hu et al. 1995*). In diesem Experiment wurde die IL-3 abhängige myeloide Mäusezelllinie 32D mit murinem c-KIT transfiziert und diese 32D-KIT Zellen in Empfängermäuse injiziert. Dabei erkrankten ausschließlich Mäuse mit injizierten 32D-KIT Zellen und wiesen zirkulierende leukämische Blasten und eine Infiltration von Knochenmark, Milz, Gehirn, Leber, Lunge und Nieren auf, nicht jedoch Mäuse mit normalen 32D Zellen. Während einige der den erkrankten Tieren entnommenen Zellen in ihrem Wachstum weiterhin auf IL-3 oder SCF angewiesen waren, waren einige andere Leukämiezellen in der Lage, sich unabhängig von Wachstumsfaktoren zu vermehren.

Einen weiteren Hinweis auf den Beitrag einer Überexpression des normalen c-KIT Rezeptors zur malignen Transformation von Zellen liefert Caruana (*Caruana et al. 1998*). Nach dieser Studie induzierte die ektope Expression des murinen c-KIT Rezeptors in NIH3T3 Mäusefibroblasten eine Transformation dieser Zellen, gekennzeichnet durch morphologische Veränderungen, Wachstum in niedrigen Serumkonzentrationen, Fokusbildung sowie durch Tumorbildung in nackten Mäusen. Während diese Transformation in den meisten Fällen von der Anwesenheit des c-KIT Liganden SCF abhängig war, wurden auch einige von Wachstumsfaktoren unabhängige Kolonien entdeckt, deren Zellen alle einen hohen Level an c-KIT Protein an der Zelloberfläche aufwiesen. Dieses Phänomen schien dabei nicht auf einen autokrinen Stimulationsmechanismus durch SCF Koexpression zurückzuführen sein. Zudem ließ sich allgemein eine positive Korrelation zwischen Höhe der c-KIT Protein und mRNA Expression und SCF-abhängigem Zellwachstum sowie Koloniebildung ab einer Dichte von mehr als $2,5 \times 10^4$ Rezeptoren pro Zellen beobachten. Klone, die eine geringere Rezeptordichte besaßen, waren in der Regel nicht fähig, Kolonien zu bilden. Innerhalb eines intermediären Bereiches zeigte sich ein umso schnelleres Koloniewachstum, je höher die c-KIT Expression war. Interessanterweise führte eine zu hohe c-KIT Rezeptordichte dann wiederum zu einer Abnahme der Koloniebildung. Anscheinend

werden für die Transformation von NIH3T3 Zellen optimale Level des c-KIT Rezeptors benötigt, die etwas höher als normal sind, jedoch auch nicht zu hoch sein dürfen. Möglicherweise ist somit für die Transformation eine bestimmte Stärke der Signaltransduktion durch c-KIT erforderlich. Eine wichtige Rolle für die Transformation von NIH3T3 Zellen scheint hierbei die Stimulierung der Raf/MAPK Kaskade zu spielen.

Während eine mäßige Raf Aktivität zur Induktion von Zyklin D1 und Zyklin E bzw. zur Aktivierung des Zyklin D/CDK4 und Zyklin E/CDK2 Komplexes und somit zur Progression des Zellzyklus führt, resultiert eine sehr starke Raf Aktivität in einer Induktion des CDK-Inhibitors p21^{Cip1} und im G1 Arrest von Mäusefibroblasten (Woods *et al.* 1997; Sewing *et al.* 1997). Es ist zwar nicht klar, inwieweit sich diese Mechanismen für die Transformation von Mäusefibroblasten auf die maligne Transformation von menschlichen hämatopoetischen Zellen zu Leukämiezellen übertragen lassen. Jedoch führt eine Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase c-KIT in hämatopoetischen Zellen u.a. zur Aktivierung der Ras-Raf-MAPK Kaskade (Linnekin 1999). Legt man die oben erläuterten Mechanismen zugrunde, so könnte eine relativ hohe Expression des c-KIT Rezeptors zu einer Aktivierung der Ras-Raf-MAPK Kaskade führen, die zwar stärker als normal ist und somit diesen Zellen einen Proliferationsvorteil verschafft, die jedoch noch nicht so stark ist, dass sie eine p21 Induktion und damit einen Zyklusarrest verursachen würde. Dies könnte unsere Beobachtung erklären, dass eine überdurchschnittlich hohe c-KIT Expression bei AML Patienten mit einer signifikant höheren Zyklin D2 Expression und einer niedrigeren Expression des CDK-Inhibitors p21 korreliert. Dabei würde allerdings vorausgesetzt, dass Zyklin D2, wie Zyklin D1 in Mäusefibroblasten, durch die Ras-Raf-MAPK Kaskade induziert würde. Es ist jedoch auch möglich, dass eine c-KIT Aktivierung über den PI3 Kinase Weg zur Induktion von Zyklin D2 führt, wie dies in Spermato gonien für Zyklin D3 der Fall ist (Feng *et al.* 2000).

Die physiologische Funktion der D-Zykline besteht vor allem in der Steuerung der G1 Progression, insbesondere des Übergangs von der mittleren zur späten G1 Phase, wobei der aktive Komplex aus D-Zyklinen und CDK4 bzw. CDK6 die Phosphorylierung des Tumorsuppressors Rb katalysiert. Diese Funktion der D-Zykline macht verständlich,

warum eine Überexpression dieser Zykline, wie sie in vielen Tumoren beobachtet wird, möglicherweise zu ungehinderter G1 Progression führt und damit zu unkontrollierter, wachstumsfaktorunabhängiger Zellproliferation beitragen könnte.

Im Gegensatz zu Zyklin D2 ergaben unsere Analysen keinen signifikanten Unterschied in der Expressionshöhe der beiden anderen D-Zykline D1 und D3 zwischen AML Patienten mit hoher und solchen mit niedriger c-KIT Expression, was möglicherweise auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus zurückzuführen ist.

Während alle bislang diskutierten Ergebnisse und die hierzu zitierte Literatur eher auf einen möglichen Zusammenhang hinweisen zwischen c-KIT Überexpression und Leukämogenese bzw. gesteigertem Proliferationspotential der AML Blasten, ergaben unsere Analysen überraschenderweise eine signifikant längere rückfallsfreie Überlebenszeit bei AML Patienten mit einer über dem Median liegenden c-KIT Expression im Vergleich zu Patienten mit geringerer c-KIT Expression. Wenngleich ältere Studien eine Assoziation zwischen c-KIT Expression und einer schlechteren Prognose suggerierten (*Ashman et al. 1988*), konnte in den meisten nachfolgenden Studien keine Korrelation zwischen c-KIT Expression und prognostischen Faktoren wie Ansprechen auf Therapie, Remissionsrate, ereignisfreies und Gesamt-Überleben nachgewiesen werden (*Reuss-Borst et al. 1994; Smith et al. 1994; Lauria et al. 1995*). Allerdings verglichen diese Studien zumeist nur AML Patienten mit und solche ohne c-KIT Expression untereinander, ungeachtet der relativen Expressionshöhe.

Eine mögliche Erklärung für den von uns beobachteten Zusammenhang zwischen hoher c-KIT Expression und besserer Prognose könnte die Beobachtung darstellen, dass eine c-KIT Expression besonders häufig (88%) bei AML Patienten mit prognostisch günstigen zytogenetischen Veränderungen wie den Translokationen t(8;21), t(15;17) oder der Inversion inv(16) auftritt (*Schwartz et al. 1999; Sperling et al. 1997*). So zeigte sich unter unseren AML Patienten bei keinem Patienten ohne c-KIT Expression eine dieser zytogenetischen Veränderungen, und auch nur bei einem der 26 AML Patienten mit einer unter dem Median liegenden c-KIT Expression war eine inv(16) nachweisbar. Dagegen lagen bei AML Patienten mit einer über dem Median liegenden c-KIT Expression in 12% (3 von 25) eine t(8;21), in 8% (2 von 25) eine t(15;17) und in 8% (2

von 25) eine *inv(16)* vor. Die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ergab zwar wegen der relativ geringen Patientenzahl mit verfügbaren Überlebensdaten keine Korrelation zwischen einer dieser zytogenetischen Alterationen und längerem rückfallsfreiem Überleben. Dennoch könnte die Assoziation zwischen höherer c-KIT Expression und längerem Überleben durchaus durch das häufigere Vorhandensein prognostisch günstiger chromosomaler Veränderungen bedingt sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese allerdings nicht weiter verfolgt werden, da für einen Großteil der Patienten keine Daten bezüglich der Zytogenetik verfügbar waren.

4.2 CSF1R

Unsere Messdaten ergaben in 93% der AML Proben eine Expression der Rezeptortyrosinkinase CSF1R, die in den monozytären Formen FAB M4 und M5 am ausgeprägtesten war. Im Vergleich zu normalem Knochenmark und CD34+ Stammzellen zeigte sich in AML Blasten eine Überexpression des CSF1R Rezeptors. Außerdem war eine hohe CSF1R Expression bei AML Patienten mit einer höheren Zyklin D3 Expression sowie einer schlechteren Prognose vergesellschaftet.

Die CSF1R Rezeptortyrosinkinase (colony-stimulating factor 1 receptor) wird von dem Proto-Onkogen *c-fms* kodiert und ist der Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden Faktor 1 (CSF1), auch bekannt als Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), der die Proliferation und die Differenzierung von monozytischen Progenitoren fördert sowie das Überleben von reifen Makrophagen begünstigt (*Stanley et al. 1983*). Dabei wird der CSF1R Rezeptor auf primitiven, multipotenten hämatopoetischen Stammzellen, mononukleären Phagozytenprogenitoren, Monoblasten, Promonozyten, Monozyten, Gewebsmakrophagen, Osteoklasten, Prä-B-Zellen, glatten Muskelzellen und Neuronen exprimiert.

Wichtige Hinweise auf die physiologischen Funktionen des CSF1R Rezeptors und seines Liganden CSF lieferten Experimente mit „knock-out“ Mäusen, die entweder CSF1R selbst (*csf1r/csf1r-*) oder CSF (*op/op*) nicht exprimieren. Phänotypisch sind

diese Mäuse gekennzeichnet durch osteopetrotische Skelettveränderungen im frühen Alter mangels Osteoklastenaktivität sowie durch Mangel an Makrophagen in anderen Organen wie Milz, Leber und Darm. Darüber hinaus übt CSF1 über den murinen, nicht jedoch über den humanen CSF1R Rezeptor, anscheinend eine negative Regulation auf die erythroide Differenzierung hämatopoetischer, pluripotenter Stammzellen in Mäusen aus, was die gesteigerte Anzahl von sogenannten erythroiden „burst-forming units“ (BFU-E) in (*csf1r*^{-/-}) und (*op/op*) Mäusen erklärt (*Pawlak et al. 2000*). Zudem fallen im peripheren Blut dieser „knock-out“ Mäuse ein erniedrigter Prozentsatz an Lymphozyten und Monozyten sowie ein erhöhter Prozentsatz an Granulozyten auf. Da die beiden letztgenannten Populationen aus denselben Progenitoren hervorgehen, ist die Vermehrung der Granulozytenfraktion wahrscheinlich durch die verminderte Stimulation der Monozytopoese bedingt (*Dai et al. 2002*). Der Abfall der Blutlymphozyten hingegen ist vermutlich auf die in CSF1 defizienten (*op/op*) Mäusen beobachtete gesteigerte Apoptoserate von Prä-B-Zellen zurückzuführen, welche sich durch die Gabe von CSF1 wieder senken ließ (*Lu et Osmond 2001*). Diese antiapoptotische Funktion der Rezeptortyrosinkinase CSF1R könnte möglicherweise auch in AML Blasten zum Tragen kommen und diesen einen Selektionsvorteil verschaffen.

So konnte bereits in mehreren Studien eine Expression der Rezeptortyrosinkinase CSF1R auf AML Blasten nachgewiesen werden. Beispielweise beobachteten Ashmun et al. in 30% (15 von 50) der Kinder mit AML und in 15% (4 von 26) der Erwachsenen mit AML eine CSF1R Expression (*Ashmun et al. 1989*). Diese war dabei auf Blasten mit monozytischen Differenzierungsmerkmalen (FAB M4 und M5) am höchsten. Aber auch auf Zellen mit eher granulozytärer Differenzierung (FAB M1-M3) konnte der CSF1 Rezeptor entdeckt werden. Darüber hinaus fanden Rambaldi et al. mittels Northern-Blot-Hybridisierung in 10 von 17 AML Fällen eine Expression des Liganden CSF1 und in 7 von 15 Fällen eine Expression des Rezeptors CSF1R. Außerdem zeigte sich in 5 Fällen sogar eine Koexpression des CSF1 Rezeptors und seines Liganden CSF1 (*Rambaldi et al. 1988*).

Unter Verwendung der sensitiveren Methode der Real-time-RT-PCR konnten wir in 92,8% (79 von 85) der untersuchten AML Proben eine Expression der CSF1R

Rezeptortyrosinkinase (Mittelwert: 6,9439, Median: 2,4109, Minimum: 0, Maximum: 134,89) feststellen. Auch hier ergab sich in den monozytär differenzierten AML Subtypen FAB M4 und FAB M5 eine signifikant höhere CSF1R Expression als in den myeloblastären Subtypen FAB M1 und FAB M2 (Mittlerwert: 12,962 vs. 3,315; $p = 0,002$). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der primären Rolle von CSF1 als Regulator von Proliferation, Differenzierung und Überleben mononukleärer Phagozyten.

Der Vergleich der CSF1R Expression zwischen AML, CD34+ Zellen und normalem Knochenmark erbrachte bei der AML (Mittelwert: 6,94) eine signifikant höhere CSF1R Expression als im normalen Knochenmark (1,89) und in den unreifen CD34+ Stammzellen (0,46), in denen sich die geringste CSF1R Expression fand ($p = 0,02$). Diese Ergebnisse deckten sich mit der Mikroarray Studie Larramendy's, in der 15 AML und 5 gesunde Knochenmarkproben hinsichtlich ihres unterschiedlichen Genexpressionsprofils untersucht wurden. Zu den in der AML im Vergleich zum normalen Knochenmark überexprimierten Genen (Ratio > 4) gehörte unter anderem der CSF1R Rezeptor, wobei die CSF1R Expression bei Patienten mit mehr als $30 \times 10^9/L$ Leukozyten signifikant höher war (Larramendy *et al.* 2002). Allerdings könnte sich diese Beobachtung auch auf die unterschiedliche Verteilung der FAB Subtypen mit monozytischer Differenzierung in dieser Studie zurückführen lassen. Immerhin 44% (7 von 16) der Patienten mit hohen Leukozytenzahlen zählten zu dem AML Subtyp FAB M4/5, wohingegen nur 18% (2 von 11) in der Patientengruppe mit niedrigeren Leukozytenzahlen diesen Subtyp aufwiesen.

Auch bei unseren Analysen ließen sich in der Patientengruppe mit höherer CSF1R Expression leicht höhere Leukozytenzahlen als bei AML Patienten mit niedrigerer CSF1R Expression erkennen (Mittelwert: 98435,45 vs. 79378,61; $p = 0,49$). Diese Tendenz scheint jedoch FAB-unabhängig zu sein, da sich bei unseren AML Patienten zwischen FAB M4/5 und FAB M1/2 kein Unterschied in der Leukozytenzahl ergab. Dennoch stellt sich die Frage, inwieweit die von uns und Larramendy beobachtete Überexpression der Rezeptortyrosinkinase CSF1R in der AML im Vergleich zum normalen Knochenmark auf den unterschiedlichen Gehalt monozytärer Zellen zurück-

zuführen ist. Da die monozytär differenzierten Subtypen FAB M4 und M5 ca. 39,7% unserer AML Fälle ausmachten, der Gehalt an Zellen monozytärer Differenzierung im normalen Knochenmark hingegen geringer ist, wurde der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der CSF1R Expression zwischen CD34+Zellen, normalem Knochenmark und AML noch einmal durchgeführt. Hierbei wurden diesmal jedoch nur die FAB Subtypen M0, M1, M2, M3 und M6 ausgewählt, um den Einfluss der hohen CSF1R Expression in den Subtypen FAB M4/5 von der Wertung auszunehmen. Unter diesen Bedingungen zeigte sich zwischen AML, normalem Knochenmark und CD34+ Zellen kein signifikanter Unterschied mehr in der Höhe der CSF1R Expression. Möglicherweise spiegelt die hohe CSF1R Expression auf monozytär differenzierten AML Blasten keine pathologisch gesteigerte Rezeptorexpression im Rahmen der Leukämogenese wieder, sondern nur die physiologische Expression dieses Rezeptors auf Zellen der monozytären Reihe, die auch auf nicht-transformierten Zellen vorkommt.

Andererseits sprechen einige Beobachtungen für einen Zusammenhag zwischen CSF1R Überexpression und der Entstehung von Leukämien. So führte eine Überexpression des CSF1 Rezeptors in der myeloiden Zelllinie FDC-P1 zu verschiedenen Phänotypen, die teilweise eine Dissoziation zwischen CSF1 induzierter Proliferation und Differenzierung aufwiesen. Während der erste Phänotyp eine CSF1 abhängige Proliferation und monozytäre Differenzierung nach CSF1 Stimulation zeigte, bewirkte CSF1 Stimulation im zweiten Phänotyp im Gegenteil sogar eine Hemmung der Proliferation und eine Differenzierungsinduktion. Der dritte Phänotyp schließlich wuchs autonom, reagierte auf CSF1 Stimulation nicht mehr mit Differenzierung und sezernierte CSF1, was auf einen autokrinen Transformationsmechanismus in diesen Zellen schließen ließ. (*McArthur et al. 1995*).

Einen weiteren Beleg für diese Hypothese stellen Untersuchungen an Mäusen dar, in denen die provirale Integration des F-MuL Virus (Friend murine leukemia virus) an einer bestimmten Integrationsstelle stromaufwärts des c-fms Proto-Onkogens zur Steigerung der Transkription dieses Gens führte. Dabei ging die Überexpression des normalen CSF1 Rezeptors mit der Entwicklung von myeloblastischen Leukämien bei diesen F-MuLV infizierten Mäusen einher (*Gisselbrecht et al. 1987*). Da dieselben

myeloblastischen Leukämiezellen gleichfalls den Liganden CSF1 koexprimierten, könnte auch hier eine autokrine Aktivierungsschleife zur Unterhaltung der Leukämie beigetragen haben.

Zudem induzierte die Infektion von Mäusen mit einem Viruskomplex bestehend aus einem c-fms enthaltenden Virus und F-MuLV als Helfervirus denselben Typ Leukämie, allerdings mit einer kürzeren Latenzzeit, wobei in 60% der integrierten Proviren eine aktivierende Mutation des CSF1 Rezeptors vorlag (*De Parseval et al. 1995*). Auch bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) und AML wurden aktivierende Mutationen der CSF1R Rezeptortyrosinkinase beschrieben, welche am häufigsten das Codon 969 und viel seltener das Codon 301 betrafen (*Tobal et al. 1990; Ridge et al. 1990*). Die Mutation des Codons 969 beeinträchtigt vermutlich die negativ regulatorische Funktion der C-terminalen Domäne des Rezeptors. Dadurch könnte eine gesteigerte Antwort auf Ligandenbindung ausgelöst werden, die Zellen mit dieser Mutation in einer CSF1-haltigen Umgebung einen Wachstumsvorteil verschaffen könnte. Jedoch scheint diese Mutation weder ausreichend noch erforderlich zur Entwicklung einer AML zu sein.

Die Aktivierung der CSF1R Rezeptortyrosinkinase stimuliert eine Vielzahl unterschiedlicher Signaltransduktionswege, wie z.B. den PI3 Kinase/Akt Weg, der wichtig für CSF1 vermitteltes Zellüberleben ist. Darüber hinaus vermag CSF1 die Expression sowohl der Transkriptionsfaktoren c-myc und c-fos als auch der Zykline D1 und D2 zu induzieren, welche für den Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus von Bedeutung sind (*Roussel et al. 1995*). Während die Induktion von c-myc und Zyklin D1 vermutlich durch Aktivierung des Raf/MEK/MAP Kinase Wegs vermittelt wird, sind für die Induktion von Zyklin D2 wahrscheinlich drei verschiedene Signalwege parallel verantwortlich, der Src-, der MAPK/ERK Kinase und der c-myc Signalweg (*Aziz et al. 1999; Dey et al. 2000*). Die von uns in diesem Zusammenhang beobachtete signifikant höhere Zyklin D3 Expression bei AML Patienten mit höherer CSF1R Expression (Mittelwert: 1,5989 vs. 0,9277; $p = 0,02$) beruht möglicherweise auf einer infolge der CSF1R Überexpression gesteigerten oder qualitativ veränderten Signaltransduktion. Diese könnte eine abnorme Induktion von Zyklin D3 bei fehlendem Einfluss auf die

Expression der beiden anderen D-Zykline bewirken, was erklären würde, warum bei unseren Analysen zwischen AML Patienten mit hoher und solchen mit niedriger CSF1R Expression im Gegensatz zu Zyklin D3 kein signifikanter Unterschied in der Expression von Zyklin D1 und D2 zu verzeichnen war.

Insgesamt bleibt die Rolle einer Überexpression des CSF1 Rezeptors bei der Leukämogenese noch unklar und ist in einem größeren, komplexen Zusammenspiel mit zusätzlich vorliegenden transformatorischen Mutationen und einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren zu sehen, wie Zelltyp, Reifungsstadium und exogenen Einflüssen, beispielsweise parakriner oder auch autokriner Stimulation durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren. Für die Bedeutung der Rezeptortyrosinkinase CSF1R bei der AML spricht jedoch eindeutig die von uns in der Kaplan-Meier-Analyse gefundene Assoziation zwischen hoher CSF1R Expression und kürzerem rückfallsfreiem Überleben bei AML Patienten (262 Tage vs. 580 Tage; $p = 0,01$). Dieses Phänomen scheint unabhängig von den FAB Klassifizierung zu sein, da sich in der Kaplan-Meier Überlebensanalyse kein signifikanter Unterschied in der rückfallsfreien Überlebenszeit zwischen den monozytischen Subtypen FAB4/5 mit höherer CSF1R Expression und den Subtypen FAB1/2 ergab. In der Literatur ist diese Korrelation zwischen erhöhter CSF1R Expression und schlechter Prognose bisher nur für solide Tumoren, wie Mamma-, Endometrium- und Ovarialkarzinom beschrieben (*Coussens et Werb 2001*). Im Falle des Brustkrebs hängt dies allerdings mit einer gesteigerten Infiltration des Primärtumors durch CSF1R exprimierenden Makrophagen zusammen, die zu einer beschleunigten Progression des unabhängig davon entstandenen Primärtumors beiträgt und das Auftreten von Lungenmetastasen begünstigt (*Lin et al. 2001*). Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CSF1 und seinem Rezeptor CSF1R in normalen ovariellen Granulosazellen zur Zellproliferation und Tumorbildung führte, was auf eine direkte Rolle des CSF1 Rezeptors bei der Tumorprogression und der damit verbundenen schlechten Prognose bei Ovarialkarzinomen hinweist (*Keshava et al. 1999*).

Es ist also nicht auszuschließen, dass auch bei der AML eine Überexpression von CSF1R, vor allem in Verbindung mit einer gleichzeitigen Koexpression des Liganden

CSF, die Proliferation und das Überleben der Leukämiezellen begünstigt und somit zur schlechteren Prognose dieser AML Patienten beiträgt.

4.3 FLT3

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) wird in hohem Maße in einer Vielzahl hämatologischer Erkrankungen exprimiert, so beispielsweise in 70%-80% der akuten myeloischen Leukämie aller FAB Subtypen, in akuten lymphoblastischen Leukämien sowie in Leukämien, die sich von B-Vorläuferzellen ableiten. Aber auch in T-Zell akuten lymphatischen Leukämien (T-ALL) und während der Blastenkrise der chronisch myeloischen Leukämie (CML) findet sich eine FLT3 Expression (*Rosnet et al. 1996, Drexler et al. 1996*).

Auch bei unseren Analysen konnte in 94% (80 von 85) der AML Fälle eine FLT3 Expression nachgewiesen werden, die insgesamt in den AML Blasten sehr viel höher war als in CD34+Stammzellen und normalem Knochenmark. Innerhalb der AML fiel eine Korrelation zwischen hoher FLT3 Expression und niedriger Expression von p21 Waf auf. Darüber hinaus fanden sich in 20% der AML Patienten FLT3 ITD Mutationen, die mit einem höheren Anteil an Blasten im Blut und höheren initialen Leukozytenzahlen bei diesen Patienten assoziiert waren.

Im normalen Knochenmark beschränkt sich die FLT3 Expression auf frühe Vorstufen der Hämatopoese, einschließlich CD34+ Zellen mit hoher c-KIT Expression, und scheint vor allem für die Entwicklung multipotenter Stammzellen und B-Zellen von Bedeutung zu sein (Abb. 1). Daneben wurde ebenfalls in der Plazenta, den Gonaden und dem Gehirn eine FLT3 Expression beobachtet (*Gilliland und Griffin 2002*). Bei den von uns untersuchten CD34+ Zellen (n =5), zeigte sich nur bei denjenigen CD34+ Zellen eine FLT3 Expression, die auch c-KIT exprimierten (in 3 von 4 c-KIT exprimierenden CD34+ Zellen), während in der Probe ohne c-KIT Expression auch keine FLT3 Expression entdeckt wurde.

Zudem beschrieben Carow et al. in 33 von 33 B-Zell-ALL Fällen, in 12 von 12 AML Fällen und in drei von elf T-Zell-ALL Fällen eine erhöhte Expression von FLT3 RNA gegenüber normalem Knochenmark. Auch auf Proteinebene konnte in 14 von 14 B-Zell-ALL, in 36 von 41 AML und einem von vier T-Zell-ALL Fällen durch Western Blotting eine FLT3 Expression nachgewiesen werden, wohingegen im normalen Knochenmark keine FLT3 Expression entdeckt wurde (*Carow et al. 1996*). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Beobachtungen einer extrem hohen FLT3 Expression in AML (n = 85; Mittelwert: 3043,77) im Vergleich zu CD34+ Stammzellen (n = 5; Mittelwert: 1,59) und normalem Knochenmark (n = 7; Mittelwert: 1,41; Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test: 0,0001). Um die Auswirkungen dieser FLT3 Überexpression, vor allem im Hinblick auf ihren möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese der Leukämie, beurteilen zu können, ist es erforderlich, zunächst die physiologischen Funktionen des FLT3 Rezeptors und seines Liganden FL genauer darzustellen.

Bei dem Liganden des FLT3 Rezeptors handelt es sich um ein Typ I transmembranäres Protein, das neben der membrangebundenen auch in einer löslichen Form existiert, wobei beide Formen in der Lage sind, den FLT3 Rezeptor zu aktivieren (*Gilliland und Griffin 2002*). FL wird unter anderem auf Knochenmarksfibroblasten in der Umgebung von hämatopoetischen Zellen, aber auch auf hämatopoetischen Zellen der myeloischen und der B- und T-Zelllinie selbst exprimiert. Teilweise erscheint er sogar auf ein und derselben Zelllinie zusammen mit seinem Rezeptor FLT3, wodurch eine autokrine und parakrine Stimulation ermöglicht wird (*Drexler et al. 1999*). Dabei wirkt FL als Wachstumsfaktor im Synergismus mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), CSF1 (colony-stimulating factor 1), GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und SCF (stem cell factor), sowie mit den Interleukinen IL3, IL6 auf unreife myeloische Zellen und Stammzellen. Außerdem ist er in der Lage, CD34+ Zellen zu expandieren (*Rusten et al. 1996*).

Im Rahmen der Leukämie fördert die FLT3 Aktivierung durch FL die Proliferation und das Überleben von primären AML und ALL Zellen sowie von myeloischen und monozytoiden leukämischen Zelllinien (*Drexler et al. 1999; Meyer et Drexler 1999; Lisovsky et al. 1996; McKenna et al. 1996; Piacibello et al. 1995*). Der antiapoptotische

Effekt von FL, insbesondere in Kombination mit GM-CSF, wird dabei vermutlich unter anderem durch eine Verhinderung der Hochregulation des proapoptotisch wirkenden Bax erreicht, und nicht durch eine Hochregulation des antiapoptotischen Bcl2 (*Lisovsky et al. 1996*). Obwohl nicht alle FLT3 exprimierenden AML Blasten auf den Liganden FL zu reagieren scheinen (*Stacchini et al. 1996*), legen die proliferationsfördernden und apoptosehemmenden Wirkungen des FLT3/FL Rezeptorsystems auf die Mehrzahl der AML Blasten dennoch die Vermutung nahe, dass FLT3 an der Entstehung bzw. der Unterhaltung von Leukämie beteiligt ist. Hierbei scheint insbesondere Mutationen des FLT3 Rezeptors wie FLT3-ITD Mutationen oder D853-Mutationen (*Yamoto et al. 2001; Abu-Duhier et al. 2001*) eine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese der AML zuzukommen.

Die vielfältigen Wirkungen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 auf Proliferation, Differenzierung und Überleben hämatopoetischer Zellen werden über eine Reihe von Signal-transduktionswegen vermittelt, die zum Teil bereits aufgeklärt werden konnten. So führt eine Stimulation der humanen Rezeptortyrosinkinase FLT3 durch ihren Liganden Fl zur direkten Assoziation mit Grb2 und Socs1 sowie zur Tyrosinphosphorylierung zahlreicher Proteine wie Cbl, CblB, Shc, Shp2, SHIP, Gab1, Gab2 und STAT5a. Im Gegensatz zum murinen FLT3 Rezeptor besitzt der humane FLT3 Rezeptor keine direkte Bindungsstelle für die p85-Untereinheit der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase). Stattdessen wird die PI3K Aktivierung über eine Assoziation von p85-PI3K mit den durch FLT3 tyrosinphosphorylierten Proteinen Cbl, CblB, Shc, Shp2, SHIP, Gab1, Gab2 erreicht. Neben der Aktivierung des PI3K Signalwegs vermögen die infolge FL Stimulation phosphorylierten Proteine Gab1 und Gab2 zudem Shp2 zu aktivieren sowie mit Grb2 und Shc zu interagieren (*Scheijen et Griffin 2002; Zhang et Broxmeyer 1999, 2000; Abb. 31*).

Zudem scheint für die Signaltransduktion des FLT3 Rezeptors die Aktivierung von STAT5a (signal transducer and activator of transcription) eine wichtige Rolle zu spielen (*Zhang, Fukunda et al. 2000*). In der Zelllinie Baf4/FLT3 – eine murine, IL-3 abhängige hämatopoetische Zelllinie, die mit humanem Wildtyp FLT3 transfiziert wurde und dieses stabil exprimiert – wiesen Zhang et al. eine Aktivierung von STAT5a infolge

tion des Wildtyp FLT3 Rezeptors durch FL zwar eine schnelle Aktivierung der MAP Kinase bewirkt, jedoch keine Aktivierung von STAT5. Allerdings wurde in dieser Studie nicht zwischen STAT5a und 5b differenziert, die sich anscheinend in ihrer Funktion unterscheiden. Sowohl in FLT3-ITD transfizierten Zellen als auch in klinischen AML Proben von Patienten mit FLT3-ITD Mutationen fand sich anders als beim Wildtyp eine konstitutive Aktivierung der MAP Kinase und von STAT5 (*Hayakawa et al. 2000*). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Mizuki et al., die nach FL Stimulation des Wildtyp FLT3 Rezeptors in 32D/FLT3-WT Zellen nur eine sehr geringe STAT5 Phosphorylierung feststellten, wohingegen FLT3-ITD Mutationen zu starker, konstitutiver STAT5 Aktivierung führten (*Mizuki et al. 2000*). Die Frage, ob eine Überexpression des Wildtyp FLT3 Rezeptors eine funktionell relevante STAT5a Aktivierung bewirken könnte, ist also nicht eindeutig geklärt.

Wenngleich sich der funktionelle Beitrag einer Überexpression des Wildtyp FLT3 Rezeptors zur Leukämogenese nicht eindeutig klären lässt, spielt die Rezeptor-tyrosinkinase FLT3 für die akute myeloische Leukämie dennoch eine bedeutende Rolle, da es sich bei FLT3 um eines der in AML am häufigsten mutierten Gene handelt. So finden sich in ca. 30% der AML Patienten aktivierende Mutationen des FLT3 Rezeptors. Dabei handelt es sich in 24% der Fälle um sogenannte „interne Tandem Duplikationen“ (ITD Mutationen) und in 7% der Fälle um Punktmutationen in der Aktivierungsschleife des Rezeptors, beispielsweise die Mutationen D8345Y oder D838V (*Gilliland und Griffin 2002*). Unter ITD Mutationen versteht man Wiederholungen von Aminosäuresequenzen in der juxtamembranären Domäne des Rezeptors von interindividuell unterschiedlicher Länge. Dadurch wird vermutlich die autoinhibitorische Funktion der juxtamembranären Domäne auf die Kinaseaktivität des Rezeptors gestört, so dass es zur konstitutionellen Aktivierung der Tyrosinkinase des FLT3 Rezeptors kommt. Allerdings führen nicht alle FLT3-ITD Mutationen zu dieser konstitutionellen Tyrosinkinaseaktivierung (*Fenski et al. 2000*).

FLT3-ITD Mutationen kommen in allen FAB Stadien der AML vor, am häufigsten im Subtyp M3 und am seltensten im Subtyp M2. Daneben treten sie auch beim myelodysplastischen Syndrom, in 15% der sekundären AML Fälle und sehr selten in der

akuten lymphatischen Leukämie auf. In normalen hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks mit hoher Expression des Wildtyp FLT3 Rezeptors konnten jedoch bisher keine ITD Mutationen entdeckt werden (*Ishii et al. 1999*). Auch in den von uns untersuchten AML Proben fanden sich in 20% (14 von 69) FLT3-ITD Mutationen. Diese korrelierten mit einem höheren Anteil an Blasten im Blut (75% vs. 50%; Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,02$) und höheren initialen Leukozytenzahlen (176.329 vs. 66.135; $p = 0,004$). Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben in der Literatur überein, wonach in einer großen englischen Studie mit 854 AML Patienten, von denen 27% FLT3-ITD Mutationen aufwiesen, diese Mutationen mit Leukozytose und mit einem hohen Blastenanteil im Knochenmark assoziiert waren (*Kottaridis et al. 2001*). Außerdem fiel in dieser Studie eine Assoziation zwischen FLT3-ITD Mutationen und einer niedrigeren kompletten Remissionsrate, einer höheren Todesrate in der Induktionsphase sowie einem erhöhten Rückfallsrisiko und geringerem krankheitsfreien, ereignisfreien und Gesamtüberleben auf. Desgleichen beobachteten Rombouts et al. eine Korrelation zwischen FLT3-ITD Mutationen (18 von 63 AML Patienten) und reduzierter kompletter Remissionsrate, gesteigerter Rückfallsrate und geringerem ereignisfreiem Überleben (*Rombouts et al. 2000*). Hingegen ergab eine Studie Whitmans (mit 82 AML Patienten unter 60 Jahren, darunter 23 Patienten mit FLT3-ITD Mutationen) nur bei den Patienten eine geringere krankheitsfreie und geringere Gesamtüberlebenszeit, die neben der FLT3-ITD Mutation des einen Allels auch noch einen Verlust des zweiten funktionellen Wildtypallels, also den Genotyp FLT3 [(ITD/-); $n = 8$], aufwiesen (*Whitman et al. 2001*). Die Patienten jedoch, die noch ein zweites funktionsfähiges Wildtypallel des FLT3 Rezeptors besaßen [FLT3 (ITD/WT)] zeigten keinen Unterschied im Überleben im Vergleich zu AML Patienten ohne FLT3-ITD Mutationen [FLT3(WT/WT)]. Auch wir fanden keine signifikanten prognostischen Unterschiede zwischen den AML Patienten mit FLT3-ITD Mutationen und solchen ohne Mutation. Dies könnte sich aber einerseits durch die relativ geringe Patientenzahl mit FLT3-ITD Mutationen erklären lassen, zum anderen durch die fehlende Differenzierung zwischen dem prognostisch sehr ungünstigen Genotyp (ITD/-) bzw. (ITD/ITD) und dem scheinbar weniger gefährlichen heterozygoten Genotyp

(ITD/WT). Trotzdem ließ sich in der Kaplan-Meier-Überlebens-analyse bei Patienten mit FLT3-ITD Mutationen eine Tendenz zu kürzerer Remissionsdauer bzw. geringerer rückfallsfreier Überlebenszeit (Mittelwert: 315 Tage vs. 443 Tage, gültige Ereignisse: 3 ITD-Mutationen vs. 16 Wildtypen; $p = 0,37$) sowie geringerem Gesamtüberleben (Mittelwert: 227 Tage vs. 452 Tage, gültige Ereignisse: 9 ITD-Mutationen vs. 25 Wildtypen; $p = 0,1$) erkennen.

Für die leukämogene Wirkung von FLT3-ITD Mutationen gibt es in der Literatur zahlreiche Anhaltspunkte. Beispielsweise konnte in der IL-3-abhängigen myeloischen Progenitor Zelllinie 32D durch FLT3-ITD Mutationen eine Resistenzentwicklung gegenüber strahleninduzierter Apoptose erzielt werden. Außerdem waren diese FLT3-ITD transfizierten Zellen in der Lage, sich unabhängig von den Wachstumsfaktoren IL-3 und FL zu vermehren (*Mizuki et al. 2000*). Nach Injektion von 32D/FLT3-ITD Zellen in Mäuse entwickelten die meisten innerhalb kurzer Zeit eine leukämieähnliche Erkrankung mit Hepatosplenomegalie und Blasteninfiltration des Knochenmarks, wohingegen nach Injektion von 32D/FLT3-WT Zellen nur einige wenige Mäuse nach einer viel längeren Latenzzeit eine ähnliche Krankheit zeigten.

Die transformatorischen Eigenschaften von FLT3-ITD Mutationen konnten auch von einigen anderen Forschergruppen nachgewiesen werden. So beobachteten Kelly et al. ein Induktion von IL-3-unabhängigem Wachstum bei Ba/F3 Zellen durch FLT3-ITD Mutationen, nicht jedoch durch den Wildtyp FLT3 Rezeptor. Selbst Stimulation dieser FLT3 überexprimierenden Zellen mittels FL reichte nicht aus, um IL-3-unabhängiges Wachstum zu induzieren. Darüber hinaus wurden in einem murinen Knochenmarkstransplantationsmodell aus primären, humanen Leukämieproben geklonte FLT3-ITD Mutationen in murine Knochenmarkzellen retroviral transduziert und wieder in Mäuse transplantiert. In diesem Modell führten FLT3-ITD Mutationen mit einer Latenz von 40-60 Tagen zu einer myeloproliferativen Erkrankung der betreffenden Mäuse mit Leukozytose, extramedullärer Blutbildung in Milz und Leber sowie einer Splenomegalie (*Kelly, Liu et al. 2002*). Wildtyp FLT3 hingegen verursachte keine hämatologische Erkrankung (>200 Tage).

Diese Ergebnisse deuten zum einen auf einen qualitativen und/oder quantitativen Unterschied in der Signaltransduktion von FLT3-ITD Mutationen im Vergleich zum Wildtyprezeptor hin. Zum anderen verdeutlichen sie, dass FLT3-ITD Mutationen allein ausreichen, um einen myeloproliferativen Phänotyp hervorzurufen, dennoch aber nicht genügen, um das Vollbild einer AML auszulösen. Hierzu bedarf es zusätzlicher Mutationen, die die normale Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinträchtigen.

Diese Überlegungen führen zu der „2-hit“ Hypothese, nach der für die Entwicklung einer AML die Kombination von zwei Klassen unterschiedlicher Mutationen nötig ist. Dabei handelt es sich einerseits um Klasse I Mutationen, die einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil bieten, aber selbst die Differenzierung nicht oder kaum beeinflussen wie FLT3-ITD Mutationen, FLT3 D835Y, N- oder K-Ras Mutationen und andererseits um Klasse II Mutationen, die in erster Linie dazu dienen, die Differenzierung zu stören. Hierzu zählen beispielsweise Translokationen oder Mutationen in Genen, die für die normale hämatopoetische Differenzierung erforderlich sind (*Kelly et Gilliland 2002; Kelly, Liu et al. 2002; Gilliland et Griffin 2002; Abb. 32*).

Diese Hypothese wird durch die klinische Beobachtung gestützt, dass FLT3 Mutationen bei der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) häufig zusammen mit der Translokation t(15;17) auftreten, die das Fusionsprotein PML/RAR α kodiert. Die Expression dieses Proteins verursacht ein myeloproliferatives Syndrom in transgenen Mäusen, reicht jedoch allein nicht aus, um eine AML hervorzurufen. Transduziert man hingegen in Knochenmarkzellen von diesen PML/RAR α transgenen Mäusen zusätzlich noch FLT3-ITD Mutationen, so entwickeln diese in kurzer Zeit eine APL ähnliche Erkrankung, die auf andere Empfänger transplantabel ist und die auf Behandlung mit ATRA (all-trans-retinoic acid) anspricht (*Kelly, Kutok et al. 2002*).

Legt man der APL dieses „2-hit“ Modell zugrunde, so könnten sich für bestimmte Patientengruppen neue Therapiemöglichkeiten, im Sinne einer Kombinationstherapie aus FLT3 Tyrosinkinaseinhibitoren und ATRA, als vorteilhaft erweisen. Daneben könnte bei AML Patienten, die auf die herkömmlichen Behandlungsmethoden nicht ansprechen, oder bei denen prognostisch ungünstige FLT3-ITD Mutationen vorliegen, eine Therapie mit FLT3-Inhibitoren versucht werden. Zu nennen wären hierfür etwa CEP-

701, ein Hemmer von FLT3-ITD Mutationen und von Mutationen der Aktivierungsschleife, der Wirkung in primären AML Zellen mit ITD Mutationen zeigte (Levis *et al.* 2002) oder CT53518, das neben FLT3 auch c-KIT und PDGFR hemmt (Kelly, Yu *et al.* 2002) sowie SU5614, SU5416, SU11248 (O'Farrell *et al.* 2001; Yee *et al.* 2001) und PKC412 (Weisberg *et al.* 2002).

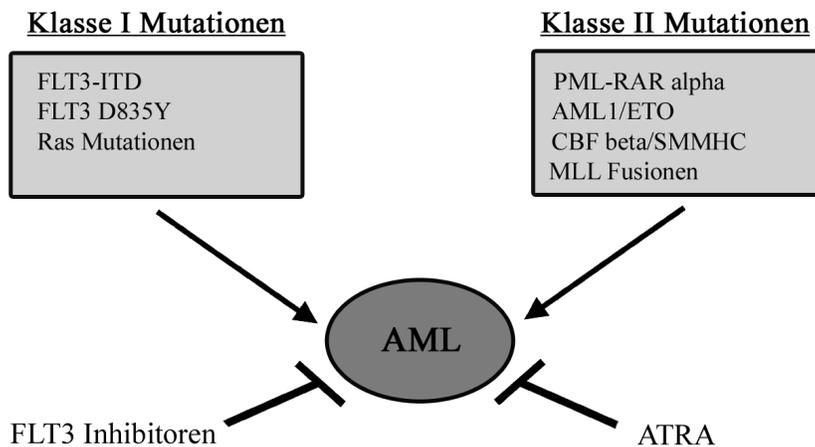


Abbildung 32: Modell der Kooperation zwischen aktivierenden Mutationen des FLT3 Rezeptors und Rearrangements der Gene für hämatopoetische Transkriptionsfaktoren. Nach der „2-hit“ Hypothese sind an der Entstehung der AML zwei Klassen unterschiedlicher Mutationen beteiligt: Klasse I Mutationen, wie die aktivierenden Mutationen FLT3-ITD, FLT3 D835Y oder Ras Mutationen, die der Zelle einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil verleihen, die Differenzierung jedoch unbeeinflusst lassen; Klasse II Mutationen, wie z.B. t(15;17), t(8;21) und inv(16), die zu den Fusionsproteinen PML/RAR α , AML1/ETO und CBF β /SMMHC führen und in erster Linie die hämatopoetische Differenzierung beeinträchtigen, aber alleine nicht ausreichen, um eine Leukämie zu entwickeln. Erst die Kombination beider Arten von Mutationen ruft durch gesteigerte Proliferation und Überleben von Progenitorzellen sowie durch eine Störung der Differenzierung eine AML hervor. Diese Hypothese impliziert neue Therapiestrategien, bestehend aus einer Kombination von spezifischen FLT3 Inhibitoren mit Substanzen (z.B. ATRA), die in den Pathomechanismus der Transkriptionsfaktor involvierenden Fusionsproteine eingreifen (nach Gilliland *et Griffin* 2002).

Im Gegensatz zur gut dokumentierten onkogenen Potenz von Mutationen des FLT3 Rezeptors und deren Rolle bei der Leukämogenese gibt es für die Beteiligung einer Überexpression des Wildtyp FLT3 Rezeptors an der Pathogenese der AML nur wenige

Hinweise. Dies schließt jedoch nicht aus, dass in einem Teil der AML Fälle eine sehr starke Überexpression von FLT3, deren proliferationsfördernde und antiapoptotische Wirkung eventuell noch durch andere Mutationen verstärkt wird, in Kombination mit zusätzlichen Translokationen, die die Differenzierung beeinträchtigen, doch zur Entstehung der AML beitragen kann. Für die Bedeutung einer gesteigerten FLT3 Expression im Rahmen der AML spricht jedenfalls die eindeutig höhere Expression von FLT3 in AML Blasten im Vergleich zu CD34+ Stammzellen und normalem Knochenmark, die nicht nur im Rahmen unserer Studie deutlich wird, sondern auch von mehreren anderen Forschungsgruppen belegt wurde.

4.4 TRK A

Der hochaffine Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors (NGF) TRK A spielt nicht nur im Nervensystem sondern auch in der Hämatopoese und bei der Immunantwort eine Rolle. So wurde eine Expression dieses Rezeptors sowohl in neuronalem Gewebe als auch in einer Vielzahl nicht-neuronaler Gewebe und Tumoren wie Karzinomen des Ösophagus, der Schilddrüse, des Magens und Kolons sowie bei Lungenkrebs entdeckt (*Koizumi et al. 1998; Ricci et al. 2001*). Auch bei Prostata- und Pankreaskarzinomen scheint ein autokriner Stimulationsmechanismus über aberrante Expression von TRK Rezeptoren und ihren Liganden von Bedeutung zu sein. In beiden Krebsarten ließ sich durch gezielte Hemmung des TRK Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor CEP-701 eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums erreichen (*Miknyoczki et al. 1999; Weeraratna et al. 2001*).

Von den im Zusammenhang mit AML untersuchten Rezeptortyrosinkinasen war TRK A für uns deswegen von besonderem Interesse, weil er mit fast 99% die bei unseren AML Proben am häufigsten exprimierte Rezeptortyrosinkinase darstellte, die Forschung diesen Rezeptor jedoch bisher nur selten mit Leukämie in Verbindung gebracht hat. Unsere Analysen ergaben dabei in den myeloblastären AML Formen FAB M1 und M2 die höchste TRK A Expression. Darüber hinaus zeigte sich in einem großen Teil der

AML Fälle eine gegenüber CD34+ Stammzellen und normalem Knochenmark deutlich gesteigerte TRK A Expression. Desweiteren war bei AML Patienten mit einer hohen TRK A Expression eine höhere Expression von Zyklin D2 sowie interessanterweise eine Tendenz zu längerem rückfallsfreien Überleben zu beobachten.

Auch mittels konventioneller PCR ließ sich in den 57 untersuchten AML Patientenproben in über 80% der Fälle eine Expression des TRK A Rezeptors nachweisen. Diese Differenz zu der sehr viel höheren Expressionshäufigkeit von 98,8% (84 von 85) in der Real-time-RT-PCR erklärt sich zum einen durch die höhere Sensitivität dieser Methode gegenüber der konventionellen PCR. Zum anderen wurden bei der Real-time-RT-PCR 40 Amplifikationszyklen durchgeführt sowie ca. die fünffache Menge an cDNA verwendet, während bei der TRKA Analyse mittels konventioneller PCR nur 35 Zyklen zur Amplifikation benutzt wurden. Daher konnte die konventionellen PCR Analyse möglicherweise die AML Fälle mit nur geringer TRKA Expression nicht erfassen. Außerdem wurde nur eine kleinere Anzahl von AML Patienten (57 gegenüber 85) mittels dieser Methode untersucht, so dass das Ergebnis der Real-time-RT-PCR Analyse der wirklichen Häufigkeit der TRKA Expression bei AML wahrscheinlich näher kommt. Demnach wird die Rezeptortyrosinkinase TRKA in nahezu 99% der AML Fälle exprimiert. Zudem fand sich auch in CD34+ Stammzellen und im normalen Knochenmark in 100% eine Expression von TRK A.

In der Literatur wird eine Expression von TRK A in 5%-10% humaner CD34+ Stammzellen und in 12%-15% angereicherter Mäuse-Präkursor Knochenmarkzellen (*Chevalier et al. 1994*) sowie in normalen menschlichen Knochenmarkzellen (*Laurenzi et al. 1998*) beschrieben. Ebenso ließ sich eine Expression der TRK A Isoform TRK A1 in fetalem und adulten Knochenmark und hier überwiegend in Proerythroblasten und Erythroblasten, aber auch in Mastozyten und einigen Stromazellen (adventitielle retikuläre Zellen, Makrophagen, Endothelzellen) feststellen (*Labouyrie et al. 1999*). Diese Isoform TRK A1 entsteht durch alternatives Spleißen und kommt vor allem in nicht-neuronalem Gewebe vor, wohingegen die Isoform TRK AII, die sich von ersterer durch die Insertion von sechs Aminosäuren in der extrazellulären Domäne unterscheidet, vorwiegend in neuronalem Gewebe exprimiert wird (*Barker et al. 1993*). Im Gegensatz zur

TRK AI Isoform ist TRK AII in der Lage, neben NGF auch Neurotrophin 3 zu binden (*Clary et al. 1994*).

Außer im Knochenmark und im Nervensystem findet sich eine Expression des TRK A Rezeptors auch in Monozyten, in denen TRK A durch Induktion von Bcl-2 die Apoptose hemmt (*La Sala et al. 2000*) und im Zuge der weiteren Differenzierung zu Makrophagen herunterreguliert wird (*Ehrhard, Ganter et al. 1993*). Desweiteren wird TRK A in Gedächtnis-B-Zellen exprimiert, auf die NGF als autokriner Überlebensfaktor wirkt (*Torcia et al. 1996*). Außerdem ließ sich eine TRK A Expression bei aktivierten CD4+ T-Lymphozyten (*Ehrhard et al. 1994; Lambiase et al. 1997; Ehrhard, Erb et al. 1993*) nachweisen sowie bei Mastzellen (*Bullock et al. 1996; Tam et al. 1997*), Epithelzellen des Thymus und der Tonsillarkrypten und bei Zellen, die sich von Monozyten ableiten, wie Epitheloidzellen, Langerhans Riesenzellen, folliculäre dendritische Zellen und interdigitierende, retikuläre Zellen (*Labouyrie et al. 1997*). Darüber hinaus wurde eine hohe TRK A Expression in einigen hämato-onkologischen Erkrankungen beobachtet, so beispielsweise in Lymphomzellen von verschiedenen B-Zell-Lymphomen, anaplastischen, großzelligen Lymphomen und in Reed-Sternberg Zellen (*Labouyrie et al. 1997*). Auch in den myeloischen Leukämiezelllinien HEL, K562 und KG1 sowie bei 44% (n = 59) der Patienten mit primärer AML beschrieben Kaebisch et al. eine TRK A Expression (*Kaebisch et al. 1996*). Der von uns ermittelte deutlich höhere Wert von nahezu 99% für die AML erklärt sich eventuell durch die sensitivere Methodik. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen ließ sich in der Studie Kaebischs auch keine Korrelation zwischen TRK A Expression und FAB Klassifikation nachweisen, wohingegen wir zwar in allen FAB Subtypen eine TRK A Expression entdeckten, die mittlere relative Expressionshöhe aber in den myeloischen Subtypen FAB M1 und M2 signifikant höher war als in den monozytären Formen FAB M4 und M5.

Daneben zeigte sich in dem Anteil unserer AML Proben, die eine über dem Median liegende TRK A Expression aufwiesen, eine sehr große Variabilität in der relativen Expressionshöhe, wobei in einem Teil dieser AML Fälle die relative Höhe der TRK A Expression weit über der normalen Expression in CD34+ Stammzellen und normalem Knochenmark lag. Diese Überexpression des TRK A Rezeptors bei AML im Vergleich

zu normalem Knochenmark wurde auch in einer Mikroarray Studie bei 3 von 15 AML Patienten beobachtet (*Larramendy et al. 2002*). Ob und wie sich eine solche Überexpression auf hämatopoetische Zellen auswirkt und inwiefern sie zur Leukämogenese beitragen könnte, lässt sich jedoch nicht mit Sicherheit sagen. In der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 bewirkte die Überexpression von TRK A zwar eine konstitutive Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinase mit konsekutiver chronischen Stimulierung des überlebensfördernden PI3 Kinase/Akt Signalwegs und der MAPK Kaskade, was zu einem ligandenunabhängigem Neuritenwachstum führte (*Leoni et Valtorta 2002*). Diese konstitutive Kinaseaktivität resultierte aber nicht in einer veränderten Signaltransduktion im Sinne einer onkogenen Transformation, sondern behielt die ursprüngliche Signalwirkung, nämlich die Differenzierung, bei.

Wie im Nervensystem scheint der Wildtyp TRK A Rezeptor auch in der Hämatopoese eine Rolle für die Differenzierung zu spielen. So vermag der TRK A Ligand NGF, in frühen hämatopoetischen Progenitorzellen des Mäuseknochenmarks im Synergismus mit dem hämatopoetischen Wachstumsfaktor M-CSF die Proliferation und die Differenzierung zu stimulieren (*Chevalier et al. 1994*). Ebenso ließ sich in einigen Leukämiezelllinien eine Förderung der Differenzierung durch Aktivierung des TRK A Rezeptors beobachten. In den Leukämiezelllinien K562 und KG-1 beispielweise wird die TRK A Expression durch Retinoinsäure (RA) induziert (*Xie et al. 1997*), wobei in KG-1 Zellen auch noch andere Differenzierungsinduktoren wie Vit D3 (1,25-dihydroxy-Vitamin D3), 1-beta-D-arabinofuranosyl-Cytosin (Ara-C), Natriumbutyrat (NaBut) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) die TRK A Expression steigern können (*Xie et al. Leuk Lymphoma 2000*). Die Aktivierung des induzierten TRK A Rezeptors durch NGF potenzierte dabei den Differenzierungseffekt von Retinoinsäure und Natriumbutyrat. Desgleichen wurde in der humanen chronischen myeloischen Leukämiezelllinie K562 eine Steigerung der TRK A Expression durch die Induktoren der megakaryozytären Differenzierung, Natriumbutyrat und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, nachgewiesen. Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des hochregulierten TRK A Rezeptors durch seinen Liganden NGF die Natriumbutyrat und Phorbol-12-

Myristat-13-Acetat induzierte megakaryozytäre Differenzierung von K562 Zellen verstärkte (Xie et al. *Leukemia Research* 2000).

Darüber hinaus wiesen K562 Zellen eine konstitutive Expression von NGF auf, was möglicherweise auf einen autokrinen Stimulationsmechanismus hindeuten könnte. Die Hypothese einer autokrinen bzw. parakrinen Stimulierung des TRK A Rezeptors wird durch die Beobachtung gestützt, dass in menschlichem adultem Knochenmark und in noch stärkerem Maße in fetalem Knochenmark neben TRK A auch der Ligand NGF exprimiert wird (Labouyrie et al. 1999). Andererseits konnten Kaebisch et al. keine NGF Expression in AML Proben feststellen, womit die Bedeutung einer autokrinen NGF/TRK A Aktivierungsschleife für die Leukämogenese unwahrscheinlich erscheint (Kaebisch et al. 1996).

Insgesamt legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass der normale TRK A Rezeptor, eventuell auch in Überexpression, die Differenzierung sowohl hämatopoetischer als auch leukämischer Zellen fördert. Somit könnte sich eine Überexpression des normalen TRK A Rezeptors bei der AML durch Differenzierungsinduktion eher vorteilhaft für den Patienten auswirken, wodurch sich die gefundene Tendenz eines längeren rückfallsfreien Überlebens bei AML Patienten mit einer über dem Median liegenden TRK A Expression erklären ließe. In Neuroblastomen korreliert eine hohe TRK A Expression ebenfalls mit einer guten Prognose, wohingegen aggressive Neuroblastome, oft mit einer Amplifikation des Myc-Onkogens vergesellschaftet, eine niedrige TRK A Expression aufweisen (Nakagawara 2001; Eggert et al. 2000).

Während die Überexpression des Wildtyp TRK A Rezeptors allein also vermutlich keine onkogene Potenz mit sich bringt, sondern im Gegenteil eher die Differenzierung begünstigt, können Mutationen des TRK A Rezeptors anscheinend sehr wohl eine maligne Transformation bewirken. So wurden bereits einige Fälle von Aktivierung des TRK A Rezeptors durch Mutationen oder Translokationen im Kolonkarzinom, im papillären Schilddrüsenkarzinom und auch bei der AML beobachtet. Unser besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf die von Reuther et al. beschriebene Mutation Δ TRK A, die ursprünglich aus einer AML Patientenprobe isoliert wurde (Abb. 33). Diese Deletionsmutante konnte Fibroblasten und epitheliale Zelllinien transformieren sowie

die apoptotischen und Wachstums-Eigenschaften von 32D myeloiden Mäuse-Progenitorzellen ändern. Darum untersuchten wir die Häufigkeit des Auftretens von Δ TRK A in 57 AML Proben mittels konventioneller PCR. Mit den verwendeten Primern stellt sich der Wildtyp TRK A Rezeptor als ein Produkt von 326 bp Länge dar, während Δ TRK A aufgrund der Deletion von 225 bp ein PCR-Produkt von nur 101 bp Länge liefert.

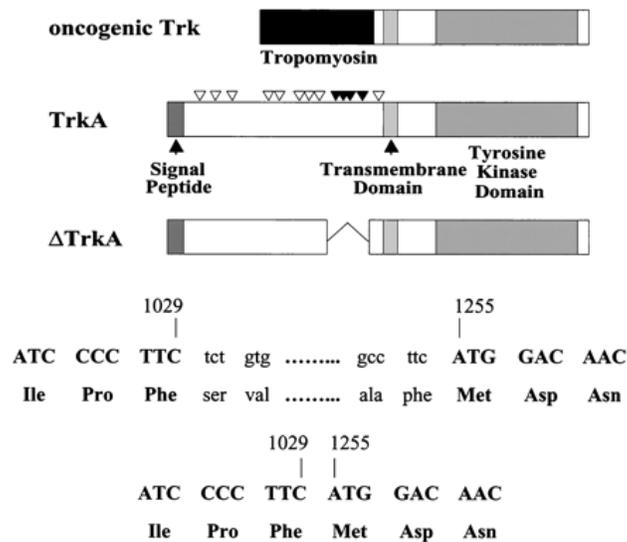


Abbildung 33: Schematische Darstellung des onkogenen TRK A, des Wildtyp TRK A und Δ TRK A. Onkogenes TRK A enthält Sequenzen des Tropomyosin an Stelle des Großteils der extrazellulären Domäne von TRK A. Δ TRK A weist eine Deletion von 225 Nukleotiden (Nukleotide 1030-1254 basierend auf der Genbank Nummer M23102) im TRK A Gen auf, welche zu einem Verlust von 75 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne des TRK A Rezeptors führt. Hierdurch werden vier Glycosylierungsstellen (ausgefüllte Dreiecke) des TRK A Rezeptors entfernt (nach Reuther et al. 2000).

Die Tatsache, dass bei keiner einzigen Probe ($n = 57$) die Δ TRK A Mutation gefunden werden konnte, deutet auf die Seltenheit dieser speziellen Mutation hin. Hierfür spricht auch, dass Reuther et al. ebenfalls bei der Untersuchung 11 zusätzlicher AML Proben keine weiteren Δ TRK A Mutationen entdecken konnten.

Wichtig ist jedoch die Erkenntnis, dass eine solche Mutation des TRK A Rezeptors aufgrund ihrer Lokalisation zur malignen Entartung von Zellen beisteuern kann. So

betrifft die bei Δ TRK A beschriebene Deletion von 225 Nukleotiden Teile des Exons 8 (Reuther *et al.* 2000), welches die zweite Immunglobulin-ähnliche Domäne der extrazellulären Region des Rezeptors kodiert (Mardy *et al.* 1999). Die extrazelluläre Region des TRK A Rezeptors setzt sich von N-terminal her zusammen aus drei Leuzin-reichen Motiven (LRM), die von zwei Cysteinclustern umrahmt werden, und anschließend folgen zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen, die für die NGF Bindung wichtig sind (Abb. 4). Gerade dieser zweiten Ig-ähnlichen Domäne, die auch bei der Δ TRK A Mutation betroffen ist, scheint eine besondere Bedeutung zuzukommen bei der Verhinderung einer spontanen Rezeptordimerisierung und damit der ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität in Abwesenheit des Liganden NGF. So konnte Arevalo anhand verschiedener Mutationen der extrazellulären Region nachweisen, dass Deletionen einer, vor allem der zweiten, oder beider Ig-ähnlichen Domänen zu ligandenunabhängiger Neuritenbildung in PC12 Phäochromozytomzellen führten. Diese ging mit einer spontanen Dimerisierung sowie Phosphorylierung des mutierten TRK A Rezeptors in Abwesenheit des Liganden NGF einher (Arevalo *et al.* 2000). Außerdem förderten Deletionen der zweiten Ig-ähnlichen Domäne die Proliferation von Rat1 Zellen und die Tumorbildung *in vivo* nach Injektion in nackte Mäuse.

Insgesamt stehen diese Beobachtungen Arevalos im Einklang mit der von Reuther beschriebenen onkogenen Potenz des Δ TRK A Rezeptors. Insbesondere die ligandenunabhängige gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität und Hyperphosphorylierung des mutierten TRK A Rezeptors sowie die daraus resultierende erhöhte Aktivität der Ras-Raf-ERK Kaskade fügen sich gut in dieses Bild. Denn diese Kaskade spielt einerseits bei PC12 Phäochromozytomzellen eine Rolle bei der Differenzierung und begünstigt somit die in diesen Zellen beobachtete Neuritenbildung, andererseits ist Ras für das Überleben myeloischer Zellen von Bedeutung, so dass eine gesteigerte Ras-Aktivität einen potentiellen Kofaktor bei der Leukämogenese darstellt. Auch der Verlust von vier Glycosylierungsstellen durch die Δ TRK A Mutation könnte zur konstitutiven Kinaseaktivität beitragen, weil die Glycosylierung normalerweise eine ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors verhindert (Watson *et al.* 1999).

Darüber hinaus konnten Arevalo et al. zeigen, dass spezifische Punktmutationen, die den Austausch nur einer einzigen Aminosäure bedingen, die Struktur der zweiten Ig-ähnlichen Domäne so verändern können, dass es zur spontanen Aktivierung des TRK A Rezeptors kommt (Arevalo et al. 2000). Ebenso wurden schon 1990 von Coulier et al. Punktmutationen, beispielsweise in einem konservierten Cysteinrest der zweiten Ig-ähnlichen Domäne, beschrieben, die eine aktivierte, onkogene Form des TRK A Rezeptors zur Folge haben (Coulier et al. 1990). Es ist daher nicht auszuschließen, dass in den untersuchten AML Fällen zwar nicht Δ TRK A, aber dafür andere Mutationen vorlagen, beispielsweise Punktmutationen, die keine Längenänderung des PCR Produktes nach sich ziehen. Auch die in der Real-time-RT-PCR gefundene Überexpression von TRK A in einem Teil der AML Fälle beinhaltet möglicherweise unentdeckte Mutationen. Solche Mutationen könnten zur Aktivierung des TRK A Rezeptors geführt und dadurch zur Entstehung oder Aufrechterhaltung der Leukämie beigetragen haben.

Die Daten dieser Arbeit, die die Überexpression der Rezeptortyrosinkinasen c-KIT, CSF1R, FLT3, EPHB6 und LTK bei der AML belegen, liefern Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapieformen zur Inhibition spezifischer Rezeptortyrosinkinasen. Zudem könnte im Rahmen der Diagnostik der Nachweis einer Überexpression einer oder mehrerer prognostisch relevanter Rezeptortyrosinkinasen (c-KIT, CSF1R, DDR1, INSR, AXL, RET) zur Einschätzung des Risikoprofils und der Prognose von AML Patienten beitragen und somit die Wahl der geeigneten Therapie beeinflussen.

5. Literaturverzeichnis:

1. Abu-Duhier, F.M., Goodeve, A.C. et al. (2001) Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 113:983-988
2. Arevalo, J.C., Conde, B. et al. (2000) TrkA Immunglobulin-Like Ligand Binding Domains Inhibit Spontaneous Activation of the Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 20:5908-5916
3. Ashman, L.K., Roberts, M.M. et al. (1988) Expression of 150-kD cell surface antigen identified by monoclonal antibody YB5.B8 is associated with poor prognosis in acute non-lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 12:923-928
4. Ashman, L.K., Camareri, A.C. et al. (1991) Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 78:30-37
5. Ashmun, R.A., Look, A.T. et al. (1989) Monoclonal antibodies to the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) detect epitopes on normal mononuclear phagocytes and on human myeloid leukemic blast cells. *Blood* 73:827-837
6. Aziz, N., Cherwinski, H. McMahon, M. (1999) Complementation of defective colony-stimulating factor 1 receptor signaling and mitogenesis by Raf and v-Src. *Mol Cell Biol* 19:1101-1115
7. Barker, PA, Lomen-Hoerth, C. et al. (1993) Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem* 268:15150-15157
8. Bene, M.C., Bernier, M. et al. (1998) The Reliability and Specificity of c-kit for the Diagnosis of Acute Myeloid Leukemias and Undifferentiated Leukemias. *Blood* 92:596-599
9. Berchuck, A., Kamel, A. et al. (1990) Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Research* 50:4087-4091

10. Bièche, I., Olivi, M. et al. (1998) Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *Int J Cancer* 78:661-666
11. Böcker/Denk/Heitz: Pathologie, 2. Auflage; Urban & Fischer, 2001; Seite 484-485; 502-503
12. Bongarzone, L., Pierotti, M.A. et al. (1989) High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 4:1457-1462
13. Broudy, V.C., Smith, F.O. et al. (1992) Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor. *Blood* 80:60-67
14. Buchner, T., Hiddemann, W. et al. (1999) Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 93:4116-4124
15. Bukholm, I.R., Bukholm, G., Nesland, J.M. (2001) Over-expression of cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 93:283-287
16. Bullock, E.D., Johnson Jr., E.M. (1996) Nerve Growth Factor Induces the Expression of Certain Cytokine Genes and bcl-2 in Mast Cells. *JBC* 271: 27500-27508
17. Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193
18. Caceres-Cortes, J.R., Alvarado-Moreno, J.A. et al. (2001) Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Research* 61:6281-6289

19. Carow, C.E., Levenstein, M. et al. (1996) Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 87:1089-1096
20. Caruana, G., Cambareri, A.C. et al. (1998) Transformation of NIH3T3 fibroblasts by the c-Kit receptor tyrosine kinase: effect of receptor density and ligand-requirement. *Oncogene* 16:179-190
21. Chevalier, S., Praloran, V. et al. (1994) Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood* 83:1479-1485
22. Clary, DO, Reichardt, LF (1994) An alternatively spliced form of nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11133-11137
23. Cole, S.R., Aylett, G.W. et al. (1996) Increased expression of c-Kit or its ligand Steel Factor is not a common feature of adult acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 10:288-296
24. Cooper, C.S., Park, M. et al. (1984) Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311:29-33
25. Coulier F., Kumar, R. et al. (1990) Human trk oncogenes activated by point mutation, in-frame deletion, and duplication of the tyrosine kinase domain. *Molecular and Cellular Biology* 10:4202-4210
26. Coussens, L.M., Werb, Z. (2001) Inflammatory Cells and Cancer: Think Different ! *J. Exp. Med.* 193:F23-F26
27. Dai, X.-M., Ryan, G.R. et al. (2002) Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99:111-120
28. Dellas, A., Schultheiss, E. et al. (1998) Association of p27Kip1, cyclin E and c-myc expression with progression and prognosis in HPV-positive cervical neoplasms. *Anticancer Research* 18:3991-3998

29. Delmer, A., Ajchenbaum-Cymbalista, F. et al. (1995) Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood* 85:2870-2876
30. Dey, A., She, H. et al. (2000) Colony-stimulating factor-1 receptor utilizes multiple signaling pathways to induce cyclin D2 expression. *Mol Biol Cell* 11:3835-3848
31. Dong, J. et al. (1999) Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:6235-6240
32. Drexler, H.G. (1996) Expression of FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 10:588-599
33. Drexler, H.G., Meyer, C., Quentmeier, H. (1999) Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 33:93-91
34. Eggert, A., Ikegaki, N. et al. (2000) Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. *Klin Padiatr* 212:200-205
35. Eguchi, N., Fujii, K. et al. (1999) Cyclin E overexpression in human gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 6:93-96
36. Ehrhard, PB, Erb, P. et al. (1993) Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10984-10988
37. Ehrhard, PB, Ganter, U. et al. (1993) Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5423-5427
38. Ehrhard, PB, Erb, P. et al. (1994) Expression of functional trk tyrosine kinase receptors alter T cell activation. *J Immunol* 15:2705-2709
39. Ekholm, S.V., Reed, S.I. (2000) Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* 12:676-684
40. Erlanson, M., Portin, C. et al. (1998) Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas – prognostic implications. *Blood* 92:770-777

41. O'Farrell, A., Abrams, T. et al. (2001) SU5416 and SU11248 inhibit Flt3 activity: therapeutic application in AML. *Blood* 89:118a; zit. n: Gilliland, Griffin 2002
42. Feng, L.X., Ravindranath, N., Dym, M. (2000) Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinases pathway in spermatogonia. *J Biol Chem* 275:25572-25576
43. Fenski, R., Flesch, K. et al. (2000) Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol* 108:322-330
44. Florenes, V.A., Faye, R.S. et al. (2000) Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma : deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 6:3614-3620
45. Fukuse, T., Hirata, T. et al. (2000) Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 60:242-244
46. Furihata, M., Ohtsuki, Y. et al. (1998) Prognostic significance of cyclin E and p53 overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter. *British Journal of Cancer* 77:783-788
47. Gibson, U.E., Heid, C.A. et al. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6:995-1001
48. Gilliland, D.G., Griffin, J.D. (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100:1532-1542
49. Gisselbrecht, S., Fichelson, S. et al. (1987) Frequent c-fms activation by proviral insertion in mouse myeloblastic leukaemias. *Nature* 329:259-261
50. Graham, D.K., Dawson, T.L. et al. (1994) Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ* 5:647-657
51. Grandis, J. R. et al. (1998) Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck

- squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 69:55-62
52. Greene, L.A., Kaplan, D.R. (1995) Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 5:579-587
 53. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57-70
 54. Hayakawa, F., Towatari, M. et al. (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
 55. Higuchi, R., Fockler, C. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030
 56. Hoffbrand/Pettit/Hoelzer: Roche Grundkurs Hämatologie; Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin • Wien 1997, Seite 1-11
 57. Hsieh, E.T. et al. (2000) Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha is independent of ras mutations in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 29:151-157
 58. Hu, Q., Trevisan, M. et al. (1995) c-KIT expression enhances the leukemogenic potential of 32D cells. *J Clin Invest* 95:2530-2538
 59. Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and Beyond. *Cell* 100:113-127
 60. Ikeda, H., Kanakura, Y. et al. (1991) Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* 78:2962-2968
 61. Iwai, T. et al. (1999) Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia* 13:38-43
 62. Ishii, E., Zaitzu, M. et al. (1999) High expression but no internal tandem duplication of FLT3 in normal hematopoietic cells. *Pediatr Hematol Oncol* 16:437-441
 63. Jensen, P.L. (2000) Eph Receptors and Ephrins. *Stem Cells* 18:63-64
 64. Kaebisch, A., Brokt, S. et al. (1996) Expression of the nerve growth factor receptor c-TRK in human myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 95:102-109

65. Kanakura, Y., Ikeda, H. et al. (1993) Expression, function and activation of the proto-oncogene c-kit product in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 10:35-41
66. Katzav, S., Martin-Zanca, D. et al. (1989) The trk oncogene abrogates growth factor requirements and transforms hematopoietic cells. *Oncogene* 4:1129-1135
67. Kelly, L.M., Gilliland, D.G. (2002) Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:179-198
68. Kelly, L.M., Kutok, J.L. et al. (2002) PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8283-8288
69. Kelly, L.M., Liu, Q. et al. (2002) FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 99:310-318
70. Kelly, L.M., Yu, J.C. et al. (2002) CT53518, a novel selective FLT3-antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* 1:421-432
71. Keshava, N., Gubba, S., Tekmal, R.R. (1999) Overexpression of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and its receptor, c-fms, in normal ovarian granulosa cells leads to cell proliferation and tumorigenesis. *J Soc Gynecol Investig* 6:41-49
72. Kindler, T., Breitenbücher, F. et al. (2003) Sustained complete hematologic remission after administration of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in a patient with refractory, secondary AML. *Blood* 101:2960-2962
73. Kiyoi, H. et al. (1997) Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia* 11:1447-1452
74. Kiyoi, H. et al. (1999) Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93:3074-3080

75. Koizumi, H., Morita, M. et al. (1998) Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. *Pathol Int* 48:93-101
76. Kondo, M. et al. (1999) Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia. *Med Pediatr Oncol* 33: 525-529
77. Kondo, M., Scherer, D.C. et al. (2000) Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* 407:383-386
78. Kottaridis, P.D., Gale, R.E. et al. (2001) The Presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98:1752-1759
79. Kuriu, A., Ikeda, H. et al. (1991) Proliferation of human myeloid leukemia cell line associated with the tyrosine-phosphorylation and activation of the proto-oncogene c-kit product. *Blood* 78: 2834-2840
80. Labouyrie, E., Parrens, M. et al. (1997) Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues. *J Neuroimmunology* 77:161-173
81. Labouyrie, E., Dubus, P. et al. (1999). Expression of Neurotrophins and their Receptors in Human Bone Marrow. *American Journal of Pathology* 154: 405-415
82. Lambiase, A., Bracci-Laudiero, L. et al. (1997) Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 100:408-414
83. Larramendy, M.L., Niini, T. et al. (2002) Overexpression of translocation-associated fusion genes of FGFR1, MYC, NPM1 and DEK, but absence of the translocations in acute myeloid leukemia. A microarray analysis. *Hematologica* 87:569-577

84. Laurenzi, MA, Beccari T. et al. (1998) Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in human granulocytes and bone marrow cells - enhanced neurotrophin-4 expression induced by LTB₄. *Journal of Leukocyte Biology* 64:228-234
85. Lauria, F., Bagnara, G.P. et al. (1995) Cytofluorimetric and functional analysis of c-kit receptor in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 18:451-455
86. Leoni, C., Valtorta, F. (2002) Constitutive TrkA activity in receptor-overexpressing PC12 clones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291:972-978
87. Levis, M., Allebach, J. et al. (2002) A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 99:3885-3891
88. Libermann, T.A. et al. (1985) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature* 313:144-147
89. Lin, E.Y., Nguyen, A.V. et al. (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193:727-740
90. Linnekin, D. (1999) Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31:1053-1074
91. Lisovsky, M., Estrov, Z. et al. (1996) Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 88:3987-3997
92. Lu, L., Osmond, D.G. (2001) Regulation of cell survival during B lymphopoiesis in mouse bone marrow: enhanced pre-B-cell apoptosis in CSF-1 deficient op/op mutant mice. *Exp Hematol* 29:596-601
93. Lyman, S. D., Jacobsen, S. E. W. (1998) c-kit Ligand and Flt3 Ligand : Stem/Progenitor Cell Factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91: 1101-1134
94. Mardy, S., Miura, Y. et al. (1999) Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis : Novel Mutations in the TRKA (NTRK1) Gene Encoding A High-

- Affinity Receptor for Nerve Growth Factor. *American Journal of Human Genetics* 64:1570-1579
95. Marta, G., Bongarzone, I. et al. (1995) A Sequence Analysis of the Genomic Regions Involved in the Rearrangements between TPM3 and NTRK1 Genes Producing TRK Oncogenes in Papillary Thyroid Carcinomas. *Genomics* 28: 15-24
 96. Martin-Zanca, D., Hughes, S., H., Barbacid, M. (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319:743-748
 97. McArthur, G.A., Metcalf, D. et al. (1995) Overexpression of C-FMS in the myeloid cell line FDC-P1 induces transformation that dissociates M-CSF-induced proliferation and differentiation. *Leukemia* 9:68-76
 98. McKenna, H.J., Smith, F.O. et al. (1996) Effects of flt3 ligand on acute myeloid and lymphocytic leukemic blast cells from children. *Exp Hematol* 24:378-385
 99. Meyer, C., Drexler, H.G. (1999) FLT3 ligand inhibits apoptosis and promotes survival of myeloid leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma* 32:577-581
 100. Miknyoczki, S.J., Chang, H. et al. (1999) The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 5:2205-2212
 101. Miknyoczki, S.J., Dionne, C.A. et al. (1999) The novel Trk receptor tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits antitumor efficacy against human pancreatic carcinoma (Panc1) xenograft growth and in vivo invasiveness. *Ann N Y Acad Sci.* 880:252-262
 102. Miura, Y., Mardy, S. et al. (2000) Mutation and polymorphism analysis of the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor in congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) families. *Hum Genet* 106:116-124

103. Mizuki, M., Fenski, R. 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
104. Moller, M.B., Nielsen, O., Pedersen, N.T. (2001) Cyclin D3 expression in non-Hodgkin lymphoma. Correlation with other cell cycle regulators and clinical features. *Am J Clin Pathol* 115:404-412
105. Müller-Tidow, C., Metzger, R. et al. (2001) Cyclin E is the Only Cyclin-dependent Kinase 2-associated Cyclin and Predicts Metastasis and Survival in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* 61:647-653
106. Muroi, K., Nakamura, M. et al. (1995) Expression of c-kit receptor (CD117) and CD34 in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 16:297-305
107. Musholt, TJ, Musholt, PB et al. (2000) Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 128:984-993
108. Nagata, H., Worobec, A.S. et al. (1998) Elevated Expression of the proto-oncogene c-kit in patients with mastocytosis. *Leukemia* 12:175-181
109. Nakagawara, A. (2001) Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neuronal development. *Cancer Letters* 169:107-114
110. Nielsen, N.H., Arnerlov, C. et al. (1998) Cyclin E expression and proliferation in breast cancer. *Anal Cell Pathol* 17:177-188
111. De Parseval, N., Bordereaux, D. et al. (1995) Isolation of new oncogenic forms of the murine c-fms gene. *Journal of Virology* 69:3597-3604
112. Pawlak, G., Grasset, M.F. et al. (2000) Receptor for macrophage colony-stimulating factor transduces a signal decreasing erythroid potential in the multipotent hematopoietic EML cell line. *Exp Hematol* 28:1164-1173
113. Piacibello, W., Fubini, L. et al. (1995) Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 86:4105-4114

114. Pietsch, T., Kyas, U. et al. (1992) Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells : heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 80:1199-1206
115. Rambaldi, A., Wakamiya, N. et al. (1988) Expression of macrophage colony-stimulating factor and c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *J Clin Invest* 81:1030-1035
116. Rane, S.G., Reddy, E.P. (2002) JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* 21:3334-3358
117. Redner, R.L., Wang, J., Johnson M. (1999) Chromatin Remodeling and Leukemia: New Therapeutic Paradigms. *Blood* 94:417-428
118. Reuss-Borst, M.A., Buhring, H.J. et al. (1994) AML: immunophenotypic heterogeneity and prognostic significance of c-kit expression. *Leukemia* 8:258-263
119. Reuther, G.W., Lambert, Q.T. et al. (2000) Identifikation and Characterization of an Activating TrkA Deletion Mutation in Acute Myeloid Leukemia. *Molecular and Cellular Biology* 20:8655-8666
120. Ricci, A., Greco, S. et al. (2001) Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:439-446
121. Ridge, S.A., Worwood, M. et al. (1990) FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1377-1380
122. Robertson, Scott C., Tynan, J. A., Donoghue, D. J.(2000) RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *TIG* 16:265-271
123. Robinson, Dan R, Wu, Yi-Mi, Lin, Su-Fang (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19:5548-5557
124. Rombouts, W.J., Blokland, I. et al. (2000) Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia* 14:675-683
125. Rosnet, O., Buhring, H.J. et al. (1996) Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 10:238-248

126. Roussel, M.F., Theodoras, A.M. et al. (1995) Rescue of defective mitogenic signaling by D-type cyclins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6837-6841
127. Rusten, L.S., Lyman, S.D. et al. (1996) The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood* 87:1317-1325
128. La Sala, A., Corinti, S. et al. (2000) Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology* 68:104-110
129. Sandal, T. (2002) Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist* 7:73-81
130. Scheijen, B., Griffin, J.D. (2002) Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 21:3314-3333
131. Schwartz, S., Heinecke, A. et al. (1999) Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 34:85-94
132. Senn, H.-J. et al.: Checkliste Onkologie, 5. neubearbeitete Auflage 2001, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
133. Sewing, A., Wiseman, B. et al. (1997) High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17:5588-5597
134. Shao, Z., Zhang, H. et al. (2001) Expression and function of c-kit receptor in bone marrow mononuclear cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Chin Med J (Engl)* 114:481-485
135. Smith, F.O., Broudy, V.C. et al. (1994) Cell surface expression of c-kit receptors by childhood acute myeloid leukemia blasts is not of prognostic value: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 84:847-852
136. Sperling, C., Schwartz, S. et al. (1997) Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. *Haematologica* 82:617-621
137. Spruck, C.H., Wong, K.A. et al. (1999) Deregulated cyclin E induces chromosomal instability. *Nature* 401:297-300

138. Stacchini, A., Fubini, L. et al. (1996) Expression of type III receptor tyrosine kinases FLT3 and KIT and responses to their ligands by acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 10:1584-1591
139. Stanley, E.R., Guilbert, L.J. et al. (1983) CSF-1 – a mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J Cell Biochemistry* 21:151-159
140. Takano, Y., Kato, Y. et al. (2000) Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with poor prognosis in gastric cancer cases. *Am J Pathol* 156:585-594
141. Tam, SY, Tsai, M. et al. (1997) Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* 90:1807-1820
142. Tenen, D.G., Hromas, R. et al. (1997) Transcription Factors, Normal Myeloid Development and Leukemia. *Blood* 90:489-519
143. Thiemes Innere Medizin: TIM.-Stuttgart; New York; Thieme, 1999; Seiten 865-869
144. Tobal, K., Pagliuca, A. et al. (1990) Mutation of the human FMS gene (M-CSF receptor) in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 4:486-489
145. Torcia, M., Bracci-Laudiero, L. et al. (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85:345-356
146. Ueno, H., Sasaki, K., et al. (1996) Growth and Survival Signals transmitted via Two Distinct NPXY Motifs within Leukocyte Tyrosine Kinase, an Insulin Receptor-related Tyrosine Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 271:27707-27714
147. Ueno, H., Honda, H., et al. (1997) The phosphatidylinositol 3' kinase pathway is required of the survival signal of leukocyte tyrosine kinase. *Oncogene* 14:3067-3072
148. Valverde, L.R., Matutes, E. et al. (1996) C-kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. *Ann Hematol* 72:11-15

149. Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D. (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100:2292-2302
150. Volm, M., Koomägi, R. et al. (1997) Cyclin A is associated with an unfavorable outcome in patients with non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 75:1774-1778
151. Watson, F.L., Porcionatto, M.A. et al. (1999) TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiology* 39:323-336
152. Weeraratna, A.T., Dalrymple, S.L. et al. (2001) Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 7:2237-2245
153. Weisberg, E., Boulton, C. et al. (2002) Inhibition of mutant Flt3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 1:433-443
154. Whitman, S.P., Archer, K.J. et al. (2001) Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Research* 61:7233-7239
155. Wiley, H.S., Burke, P.M. (2001) Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Endocytic Trafficking. *Traffic* 2:12-18
156. Wilkinson, D.G. (2000) Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol* 196:177-244
157. Wolowiec, D., Berger, F. et al. (1999) CDK1 and cyclin A expression is linked to cell proliferation and associated with prognosis in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 35:147-157
158. Woods, D., Parry, D. et al. (1997) Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17:5598-5611

159. Xie, P., Cheung, WM et al. (1997) Induction of TrkA receptor by retinoic acid in leukaemia cell lines. *Neuroreport* 8:1067-1070
160. Xie, P., Chan, F.S. et al. (2000) Induction of TrkA expression by differentiation inducers in human myeloid leukemia KG-1 cells. *Leuk Lymphoma* 36 :595-601
161. Xie, P., Chan, F.S. et al. (2000) Nerve growth factor potentiated the sodium butyrate- and PMA-induced megakaryocytic differentiation of K562 leukemia cells. *Leukemia Research* 24:751-759
162. Yang, R., Morosetti, R., Koeffler, H.P. (1997) Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines. *Cancer Research* 57:913-920
163. Yamamoto, Y., Kiyoi, H. et al. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97:2434-2439
164. Yang, R., Nakamaki, T. et al. (1999) Cyclin A1 expression in leukemia and normal hematopoietic cells. *Blood* 93:2067-2074
165. Yee, K., O'Farrell, A. et al. (2001) SU5416 and SU5614 inhibit wild-type and activated mutant Flt3 signaling in leukemia cells. *Blood* 89:838a; zit. n: Gilliland, Griffin 2002
166. Zhang, S., Broxmeyer, H.E. (1999) p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 254:440-445
167. Zhang, S., Broxmeyer, H.E. (2000) Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2 and PI3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 277:195-199
168. Zhang, S., Fukunda, S. et al. (2000) Essential Role of Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)5a but Not Stat5b for Flt3-dependent Signaling. *The Journal of Experimental Medicine* 192:719-728

-
169. Zhang, Y.-Z. et al. (2000) Cell Surface Trk Receptors Mediate NGF-Induced Survival While Internalized Receptors Regulate NGF-Induced Differentiation. *The Journal of Neuroscience* 20:5671-5678
 170. Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer* 8:161-173
 171. Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends in Molecular Medicine* 8:17-23

6. Lebenslauf

Name: Kerstin Becker
Geburtsdatum: 16.10.1978
Geburtsort: Münster
Eltern: Barbara Becker, geb. Symanzik
Werner Becker
Geschwister: Marcus, geb. 09.11.1985
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985-1989 Ketteler-Grundschule Hamm
1989-1998 Freiherr-vom-Stein Gymnasium Hamm
1998 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

1998-2004 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster
01.09.2000 Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08.09.2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

20.10.2003- Innere Medizin in der Medizinischen Klinik für
08.02.2004 Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum
Münster

09.02.-31.05.2004	Chirurgie am Universitätsklinikum Grenoble, Frankreich
01.06.-19.09.2004	Neurologie am Universitätsklinikum Münster
16.11.2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02.12.2004	Approbation als Ärztin
07.03.2005	Tag der mündlichen Promotionsprüfung
Auslandsaufenthalte:	insgesamt vier Monate Forschungspraktikum in den USA 2002 (Stony Brook, State University of New York) auf dem Gebiet der molekularen Tumorforschung vier Monate Chirurgie am Universitätsklinikum Grenoble, Frankreich
Publikationen:	Müller-Tidow, C., Schwäble, J., Steffen, B., Tidow, N., Brandt, B., Becker, K. et al. (2004) High-Throughput Analysis of Genome-Wide Receptor Tyrosine Kinase Expression in Human Cancers Identifies Potential Novel Drug Targets. <i>Clinical Cancer Research</i> 10:1241-1249 Concin, N., Becker, K. et al. (2004) Transdominant Δ TAp73 Isoforms Are Frequently Up-regulated in Ovarian Cancer. Evidence for Their Role as Epigenetic p53 Inhibitors in <i>Vivo</i> . <i>Cancer Research</i> 64:2449-2460

Hamm, den 09.03.2005

7. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Carsten Müller-Tidow für die Überlassung des Themas und seine engagierte persönliche Betreuung, insbesondere auch für seine Zeit, die ich stets beanspruchen durfte.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Onkologie, die mit Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft zu einem angenehmen und erfolgreichen Arbeiten beigetragen haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner Freundin Astrid Bußmann für ihre bereitwillige germanistische Hilfeleistung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich stets mit großem Verständnis unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

=	gleich
%	Prozent
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
<	kleiner als
>	größer als
°C	Grad Celsius
AATYK	apoptosis-associated tyrosine kinase
Abb.	Abbildung
Akt	Serin-Threonin-Kinase, homolog zum viralen Onkogen v-akt eines murinen Thymom-Virus
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytenleukämie
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all-trans retinoic acid
Aufl.	Auflage
AXL	anexelekto (gr. für unkontrolliert)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, Onkogen
BCR-ABL	Fusionsprotein aus dem BCR- und dem Ableson-Maus- Leukämie-Gen
BFU	burst forming unit
bp	base pairs
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
CBFβ	core-binding factor β
CBL	Onkogen des Cas NS-1 Retrovirus

CD	Differenzierungsantigen (clusters of differentiation)
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	komplementäre (copy) Desoxyribonukleinsäure
c-KIT	zelluläres (cellular) Homolog zu v-KIT
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CSF	colony-stimulating factor
CSF1R	colony-stimulating factor 1 receptor
CFU	colony-forming unit
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAG	Diacylglycerin
DDR	discoidin domain receptor
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
del.	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPH	erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma line
ERK	extracellular signal regulated protein kinase
et al.	et alteri
ETO	für eight twenty-one [t(8;21)]
FAB	French-American-British
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FKS	fetales Kälberserum
FL	FLT3-Ligand

FLT3	FMS-like tyrosine kinase
FMS	Feline McDonough sarcoma virus
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histondeazetylaseaktivität
HLA	Humanes Lymphozytenantigen
IGF1R	insuline-like growth factor 1 receptor
IL	Interleukin
INSR	insuline receptor
inv.	Inversion
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRR	insuline receptor-related receptor
ITD	internal tandem duplication
JAK	Janus Kinase
JNK	jun amino-terminal kinase
kb	kilobase
KL	Kit-Ligand
KM	Knochenmark
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LTK	leukocyte tyrosine kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MUSK	muscle-specific receptor tyrosine kinase
Myc	Onkogen des Hühner-Myelocystosevirus
MYH11	myosin heavy chain 11
N	Anzahl
NGF	nerve growth factor
NK	natural killer
nm	Nanometer
NSCLC	non-small cell lung cancer
P	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
Pfu	Pyrococcus furiosus
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositoltriphosphat
PLC γ	Phospholipase C γ
PML	Promyelozytenleukämie
PML-RAR α	Promyelozytenleukämie/Retinsäurerezeptor α
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindende Domäne
PTK7	protein tyrosine kinase
Raf	Serin/Threonin Kinase der MAPKK-Familie, homolog zum viralen Onkogen v-raf (isoliert aus dem murinen Sarkom Virus 3661)
RAR α	retinoic acid receptor α
Ras	kleines G-Protein, homolog zu dem aus Ratten-Sarkom isolierten viralen Onkogen v-ras
Rb	Retinoblastomgenprodukt
RET	rearranged during transformation
RNA	Ribonukleinsäure

ROR	rar (retinoic acid receptor)-related orphan receptor
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	stem cell factor
SH2-Domäne	Src homology 2 Domäne
SHIP	Src-homology domain containing inositol phosphatase
SHP	Src-homology domain containing phosphatase
SOS	son of sevenless, Guaninnukleotid-Austauschfaktor
Src	Humanes Homolog des v-src Onkogens des „Rous“ Sarkom Virus
STATs	signal transducers and activators of transcription
t.	Translokation
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TIE	tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains
TNF	Tumornekrosefaktor
TRK	tropomyosin receptor kinase
u.a.	unter anderem
U/ μ l	Units (Einheiten) pro Mikroliter
VEGFR	vascular endothelium growth factor receptor
vgl.	vergleiche
v-KIT	Onkogen des Hardy-Zuckermann 4 Katzen Sarkom Virus
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem