

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel -**

**AML1/ETO antagonisiert die STAT5-vermittelte
Funktion von Flt3-ITD in 32D-Zellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

**der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von Christian Reicherts
aus Köln**

2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Serve

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Serve

ZUSAMMENFASSUNG

AML1/ETO antagonisiert die STAT5-vermittelte Funktion von Flt3-ITD in 32D-Zellen Christian Reicherts

Chromosomenrearrangements wie die Translokation t(8;21) mit dem Fusionsprotein AML1/ETO und Mutationen in Genen, die für Tyrosinkinasen wie die Internen Tandem Duplikationen (ITD) des Flt3-Rezeptors kodieren, stellen Meilensteine in der Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) dar. Interessanterweise exprimieren AML-Blasten so gut wie nie beide Mutationen – das Fusionsprotein AML1/ETO und Flt3-ITD.

Mittels Colony Assays wurden die funktionellen Konsequenzen der Präsenz beider Mutationen in der murinen hämatopoetischen Zelllinie 32D analysiert. Dabei zeigten Zellen, die mit AML1/ETO und Flt3-ITD kotransfiziert wurden, eine beinahe 90% Reduktion des Koloniewachstums im Vergleich mit denen, die AML1/ETO und den Wildtyprezeptor von Flt3 exprimierten. Flt3-ITD führt zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von STAT5 und damit Liganden unabhängigem Wachstum und Leukämogenese. Zur Untersuchung der Auswirkungen von AML1/ETO auf die Expressionsmuster von bekannten STAT5 Zielgenen wurden die Expressionsniveaus von STAT5 Zielgenen auf mRNA-Niveau wiederum in Zellen, die beide Mutationen enthielten, verglichen mit denen, die nur das Fusionsprotein und den Wildtyprezeptor trugen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Induktion dieser Zielgene um 60-85%. Dieser repressive Effekt wurde bei einzelnen Gene auch auf Proteinniveau mittels Western Blot weiterverfolgt. Mit der Hilfe der EMSA-Technik konnte eine dosisabhängige Inhibierung der STAT5-Bindung an seine spezifische DNA-Bindungssequenz durch AML1/ETO nachgewiesen werden. Die Untersuchung der STAT5-Phosphorylierung, der notwendige Schritt für die Transkriptionsfaktoraktivität, zeigte eine AML1/ETO induzierte Reduktion des STAT5-Phosphorylierungsstatus.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit das erste Mal der repressive Effekt von AML1/ETO auf die Flt3-induzierte STAT5-Funktion demonstriert werden, am ehesten durch die Inhibition der STAT5-Phosphorylierung.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„AML1/ETO antagonisiert die STAT5-vermittelte Funktion von Flt3-ITD in 32D-Zellen“

in der

*Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Onkologie (Direktor: Prof. Dr. W.E. Berdel) der
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster*

unter Anleitung von *Herrn Prof. Dr. C. Müller-Tidow*

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 15.11.2011

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die akute myeloische Leukämie	1
1.2	Die molekulare Pathogenese der AML	9
1.2.1	Molekulare Grundlagen der gestörten Signaltransduktion	9
1.2.2	Molekulare Grundlagen der gestörten Genregulation am Beispiel AML1/ETO	15
1.3	Grundidee und analytische Ziele dieser Arbeit	18
2	Ergebnisse	22
2.1	AML1/ETO und Flt3-ITD-Mutationen antagonisieren sich gegenseitig in der Induktion von Koloniewachstum in 32D-Zellen	22
2.2	Hemmung des Koloniewachstums in 32D-Zellen ist unabhängig von der AML1-DNA-Bindungsdomäne	24
2.3	AML1/ETO inhibiert die Phosphorylierung von STAT5 in 32D-Flt3-ITD-Zellen	27
2.4	AML1/ETO induziert ein spezifisches Verteilungsmuster von STAT5 in Flt3-ITD positiven Zellen	29
2.5	AML1/ETO inhibiert dosisabhängig die DNA-Bindung von STAT5	31
2.6	AML1/ETO reprimiert die Expression STAT5 abhängiger Zielgene auf mRNA-und Proteinniveau	32
2.6.1	Repression von PIM-2 auf mRNA-Niveau	33
2.6.2	Repression weiterer STAT5-abhängiger Gene unter AML1/ETO	35
2.6.3	Repression von CIS-1 auf Proteinniveau	37
3	Diskussion	39

4	Material und Methoden	49
4.1	Plasmide	49
4.2	Kulturmedien und Puffer	49
4.3	Chemikalien	51
4.4	Verbrauchsmaterial	52
4.5	Geräte	53
4.6	Zelllinien und Transfektionen	53
4.7	Colony-Assay	54
4.8	Anti-Phospho-STAT5 Western-Blot	55
4.9	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	56
4.10	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	56
4.11	FACS-Analyse und Sorting	57
4.12	RT-PCR	57
4.13	Anti-CIS Western Blot	63
5	Literaturverzeichnis	64
6	Danksagungen	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	FAB-Klassifikation der AML
Tabelle 2:	WHO-Klassifikation der AML
Tabelle 3:	Klassifizierung charakteristischer Veränderungen des Karyotyps hinsichtlich ihrer Prognose

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung des Flt3-Homodimers, seiner funktionellen Substruktur und der Mutationslokalisationen
- Abbildung 2: Aufbau des STAT5-Moleküls
- Abbildung 3: Molekulare Optionen der STAT5-Aktivierung
- Abbildung 4: Konstitutionelle STAT5-Aktivierung unter der Flt3-ITD-Mutation des Rezeptors
- Abbildung 5: Blockierung der Transkription bei AML1/ETO durch Rekrutierung von Histondeacetylasen
- Abbildung 6: Häufigkeitsverteilungen der Flt3-ITD-Mutation in Patienten mit AML
- Abbildung 7: Verhältnis der relativen Häufigkeiten der Flt3-Mutationen zum Wildtyp-Rezeptor
- Abbildung 8: Wachstumsinhibition von Flt3-ITD-positiven Zellen in Kotransfektion mit AML1-ETO
- Abbildung 9: Aminosäuresequenz von AML1/ETO
- Abbildung 10: Unabhängigkeit des inhibierten Koloniewachstums von der AML1/ETO-DNA-Bindungsdomäne
- Abbildung 11: Spezifische Repression der STAT5-Phosphorylierung durch AML1/ETO in Flt3-ITD positiven Zellen
- Abbildung 12: EMSA-Darstellung der AML1/ETO-abhängigen Repression der STAT5-Bindung an sein DNA-Oligopeptid
- Abbildung 13: Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Dokumentation charakteristischer Verteilungsmuster von fluoreszierendem GFP-STAT5, reguliert durch Flt3-ITD und AML1/ETO in Cos7-Zellen
- Abbildung 14: AML1/ETO-induzierte PIM-2-Expression auf mRNA-Niveau in Flt3-ITD positiven Zellen
- Abbildung 15: AML1/ETO reprimiert das Expressionsniveau STAT5-abhängiger Gene in Flt3-ITD positiven Zellen
- Abbildung 16: AML1/ETO-induzierte Repression der CIS-1-Expression in Flt-ITD positiven Zellen

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie¹

Einführung

Als Leukämien werden bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems bezeichnet. Die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland beläuft sich auf ca. 3/100.000, wobei die Anzahl mit steigendem Alter zunimmt. In der Liste der Krebstodesursachen stehen die Leukämien bei den Männern an 10. Stelle und bei den Frauen an 8. Stelle.

Der Begriff, der einst von Virchow anhand der Blutprobe eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie erstmals beschrieben wurde, bedeutet aus dem Griechischen übersetzt „weißes Blut“. Er beschreibt das Vorhandensein einer verbreiterten Leukozytenmanschette nach Zentrifugation des Blutes von Patienten mit erhöhter Anzahl weißer Blutzellen. Myeloisch ist ein cytologischer Terminus technicus, der diese Leukämieform von den lymphatischen Formen abgrenzt. Es handelt sich also um Zellen, die sich von Vorläuferzellen der im Knochenmark entstehenden Blutzellen ableiten. Diese Vorläuferzellen, Blasten genannt, entwickeln sich im gesunden Knochenmark durch Teilung und Reifung weiter in die unterschiedlichen, speziellen Zelltypen Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten. Danach erst werden diese ausdifferenzierten Zellen in der Regel in den Blutkreislauf freigegeben. Aus diesem Grunde finden sich beim Gesunden keine Blasten im peripheren Blut. Im Falle der leukämogenen Entartung, die durch einen Reifungsstopp sowie unkontrollierte Teilung der leukämischen Blasten gekennzeichnet ist, kommt es zur Infiltration des gesunden Knochenmarks und konsekutiv zur Beeinträchtigung der normalen Blutbildung (Hämatopoese). Dies resultiert in Thrombozytopenie, Anämie und Granulozytopenie. Klinisch äußert sich diese zunehmende Knochenmarkinsuffizienz mitunter in einer erhöhten Infektanfälligkeit mit gesteigerter Suszeptibilität für opportunistische Erkrankungen, Blutungsneigung sowie Kurzatmigkeit, Abgeschlagenheit und Konzentrationsstörungen.

¹ Im folgenden AML genannt

Pathogenese

Malignes Wachstum ist das Ergebnis eines dynamischen Prozesses genetischer Veränderungen (Mutationen) in einer Zelle, die im Verlauf zu einem immer aggressiveren Phänotyp und damit zu einem Selektionsvorteil der diese Mutationen tragenden Zellen führt. Diese Hypothese wurde erstmals von Knudson an der Pathogenese des Retinoblastoms aufgestellt (54) und später von Vogelstein et al. an der schrittweisen Pathogenese des Kolonkarzinoms eindrucksvoll belegt (106, 107). Die Mutationen können Folge gestörter Reparaturmechanismen der DNA in der Zelle, des Einflusses äußerer mutagener Stoffe und von zufälligen Replikationsfehlern der DNA sein. In „Hallmarks of cancer“ wurden die wichtigsten veränderten Eigenschaften von Tumorzellen subsummiert. Dazu zählt die Fähigkeit zur Gefäßneubildung (Angiogenese) und Invasion in umstehendes Gewebe (Metastasierung), das Umgehen des programmierten Zelltodes (Anti-Apoptose), Resistenz gegenüber hemmenden Wachstumssignalen und, was für den Rahmen dieser Arbeit besonders relevant ist, die von äußeren Wachstumsfaktoren unabhängige, unbegrenzte Teilungsfähigkeit (40). Die Komplexität der unterschiedlichen Krebserkrankungen resultiert zum einen aus der Vielzahl der unterschiedlichen Gewebe- und damit Zelltypen des Körpers zum anderen auf molekularer Ebene auf der noch nicht abschätzbaren Anzahl potentieller krebsfördernder und -hemmender Moleküle. Auch für die AML konnten in den letzten Jahren zahlreiche pathogenetische Faktoren aufgedeckt werden (38, 98). Im Gegensatz zu epithelialen, soliden Krebsformen, finden sich in der AML häufig wiederkehrende balancierte Rekombinationen der Chromosomen (Translokationen). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum ist das Auftreten von Mutationen in wachstumsregulierenden Genen. So haben als Konsequenz leukämische Blasten durch genetische Abberationen in ihrer gemeinsamen Ursprungszelle die feinen und genau abgestimmten Mechanismen zur Differenzierung in reife und damit funktionsfähige, hämatopoetische Zellen verloren dagegen aber ihre Teilungs- und Proliferationsfähigkeit behalten (siehe auch Kapitel 2.1, Molekulare Pathogenese der AML).

Diagnose

Die Einteilung der AML wird zytomorphologisch und -chemisch anhand der French-American-British (FAB)-Klassifikation vorgenommen, die insgesamt neun Subklassen

definiert (s. Tabelle 1). Der Fortschritt der letzten Jahre hinsichtlich der molekularen Pathogenese dieser Erkrankung und ihre Assoziation mit rekurrenten diagnostischen und prognostischen Charakteristika mündete in der Etablierung einer neuen Klassifikation durch die WHO (s. Tabelle 2).

FAB-Klassifikation der AML							
FAB	Beschreibung	Häufigkeit	MPO	NBE	PAS	Assoziierte Translokationen	Beteiligte Gene
M0	Akute myeloische Leukämie, minimal differenziert	3%	-	-	-	Inv(3q26), t(3;3) (1%)	EVII
M1	Akute Myeloblastenleukämie		+/-	-	-		
M2	Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	25-30%	++	-	-	t(8;21) (40%) t(6;9) (1%)	AML1/ETO DEK/CAN
M3	Akute Promyelozytenleukämie	5-10%	+++	-	+/-	t(15;17) (98%) t(11;17) (1%) t(5;17) (1%)	PML/RARα PLZF/RARα NPM/RARα
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20%	+++	++	-	11q23 (20%) inv(3q26) t(3;3)(3%) t(6;9) (1%)	MLL EVII DEK/CAN
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormen Eosinophilen	5-10%	+++	++	-	inv(16), t(16;16) (80%)	CBFβ/MYH
M5	Akute Monozytenleukämie	2-9%	+/-	+++	+/-	11q23 (20%) t(8;16) (2%)	MLL MOZ/CBP
M6	Akute Erythroleukämie	3-5%	-	-	+++		
M7	Akute Megakaryozytenleukämie	3-12%	-	-	++	t(1;22) (5%)	unbekannt

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML; MPO=Myeloperoxidase; NBE=N-Butylacetatesterase (unspezifisch); PAS=Periodic-acid Schiff

Quantitative Voraussetzung für die Diagnose der AML ist die Identifizierung von mindestens 30% Blasten im Knochenmark gemäß der FAB-Klassifikation - oder nach der nun gültigen Klassifikation gemäß der WHO 20% Blasten - als Abgrenzung gegen die Differentialdiagnose des Myelodysplastischen Syndroms. Dabei trennt, die M6 und M7 ausgenommen, das Vorliegen der Myeloperoxidase (MPO) als granulozytärer und/oder der N-Butylacetatesterase (NBE) als monozytärer Marker die myeloische von der PAS-positiven akuten lymphatischen Leukämie. Gelingt dieser jeweilige

Enzymnachweis nicht, kann die immunphänotypische Untersuchung der Blasten mittels Durchflußzytometrie über die Verifizierung myeloischer (z. B. CD33) oder lymphatischer Oberflächenantigene die Diagnose erbringen. Mit der Identifizierung dieser Oberflächenantigene und AML-typischer Mutationen in leukämischen Blasten war es zudem möglich, neue Verfahren bei der Objektivierung der Remissionsqualität von Patienten während und nach Therapie zu etablieren. Eine der diesbezüglich herausstehenden Entwicklungen ist die Polymerase-Kettenreaktion (Abk.: PCR), die auch den Nachweis molekularer Veränderungen an kleinzahligen Zellpopulationen ermöglicht. Solche genetischen Aberrationen finden sich in circa $\frac{1}{3}$ aller AML-Blasten. Abhängig von der Art der molekularen Veränderung besteht eine Nachweisgrenze von einer Leukämiezelle auf 10^5 Zellen (41). Ein weiteres wichtiges, diagnostisches Verfahren ist die Mehrfarben-Immunfluoreszenz. Auch diese Methode ermöglicht das Aufdecken einer minimalen Resterkrankung (Abk.: MRD) von Patienten in zytomorphologischer Remission.

AML mit rekurrenten Translokationen	<p>AML mit t(8;21)(q22;q22), AML1/ETO</p> <p>Akute Promyelozytenleukämie (AML mit t(15;17)(q22;q11-22) und Varianten, PML/RARα)</p> <p>AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark (inv(16) (p13q22) oder t(16;16)(p13;q11), CBFβ/MYH11)</p> <p>AML mit 11q23 (MLL)-Abnormitäten</p>
AML mit Dysplasie in mehreren Linien	<p>Mit vorangegangenem MDS</p> <p>Ohne vorangegangenes MDS</p>
Therapieassoziierte AML und myelodysplastische Syndrome	<p>Alkylantien-induziert</p> <p>Epipodophyllotoxin-induziert</p> <p>Andere</p>
AML uncharakterisiert	<p>Minimal differenzierte AML</p> <p>AML ohne Reifungszeichen</p> <p>AML mit Ausreifung</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie</p> <p>Akute monozytäre Leukämie</p> <p>Akute erythroide Leukämie</p> <p>Akute megakaryozytäre Leukämie</p> <p>Akute Basophilenleukämie</p> <p>Akute Panmyelose mit Myelofibrose</p> <p>Akute biphänotypische Leukämie</p>

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML.

Prognosefaktoren

Maßgeblich beeinflusst durch die Weiterentwicklung dieser technischen Neuerungen konnten durch die Identifikation neuer molekularer Charakteristika auch weitere Parameter hinsichtlich der Prognose von AML-Patienten gefunden werden. Sie beeinflussen die Wahrscheinlichkeit, eine komplette Remission zu erreichen und die Dauer des krankheitsfreien Überlebens. Grundlegend sind zunächst klassische, klinische Parameter, bei denen ein Diagnosealter < 60 Jahre, eine LDH < 700 U/l und eine adäquate Blastenreduktion nach Induktionschemotherapie eine positive Prognose definieren. Dazu treten die als spezifische Mutationen charakterisierbaren, wichtigen molekular- und zytogenetischen Parameter. Büchner et al. kategorisierten 1999 zahlreiche Veränderungen des Karyotyps hinsichtlich ihres prognostischen Stellenwertes (s. Tab. 3, (13)).

1) Günstige Prognose	t(15; 17), t(8; 21), inv(16) oder molekulargenetische Hinweise auf diese Translokationen
2) Intermediäre Prognose	Weder 1) noch 3) zuzuordnen
3) Ungünstige Prognose	Verlust von eines Chromosoms 5 oder 7, del(5q), del(7q), Translokationen mit Beteiligung des langen Arms von Chromosom 3, 11q23-Mutationen oder mehr als zwei zytogenetische Abberationen

Tabelle 3: Klassifizierung charakteristischer Veränderungen des Karyotyps hinsichtlich ihrer Prognose (modifiziert nach Büchner et al., Blood, 1999 (13)).

Abseits dieser Einteilung beschreiben Daten über somatische Mutationen in AML-Blasten im Gen des Flt3-Rezeptors ebenfalls eine ungünstige Prognose (51). Eine prognostisch heterogene Gruppe bilden Fälle der AML, die Mutationen im Nucleophosmin-Gen (NPM) tragen. Diese sind mit einem normalen Karyotyp assoziiert, verlieren aber ihre eher prognostisch favorable Stellung beim gemeinsamen Auftreten mit Flt3-Mutationen. Unabdingbar ist es, neben diesen klinischen und paraklinischen Kriterien auch immer die jeweiligen Konsequenzen der Therapieauswahl in die Prognoseabschätzung eingehen zu lassen. Als klassisches Beispiel dient hier die AML vom FAB-Subtyp M3, deren Prognose bereits unter konventioneller Chemotherapie als günstig beschrieben wird, durch die Option der additiven ATRA-

Therapie sogar exzellente Heilungsraten aufweist. Byrd et al. beschrieben eine Steigerung der Effizienz der chemotherapeutischen Behandlung bei Patienten mit der AML1/ETO-Translokation, t(8;21), durch wiederholte Gabe von hochdosiertem ARA-C (16). Diese positiven Ergebnisse werden allerdings durch die mit 40-50% immer noch sehr hohe Mortalitätsrate bei Patienten mit günstigem Karyotyp getrübt. Eine per se schlechtere Prognose weisen darüber hinaus Patienten mit sekundärer AML auf, die aus einem MDS oder nach stattgehabter chemotherapeutischer Behandlung (insbesondere mit Alkylantien und/oder Topoisomerase-II-Inhibitoren) hervorgegangen ist.

Therapie

Akute Leukämien sind bei Erwachsenen in circa 20-40% und bei Kindern bei circa 70-80% heilbar. Dabei hat die AML im Vergleich zur akuten lymphatischen Leukämie (ALL) eine schlechtere Prognose. Grundlage in der Behandlung der AML ist die Chemotherapie. In den letzten Dekaden sind der Zusammensetzung der Polychemotherapie und ihrer zeitlichen Abfolge mit dem Ziel der weiteren Optimierung hohe Aufmerksamkeit gewidmet worden. Als feste Bestandteile haben sich Anthrazyklinderivate wie Daunorubicin oder Idarubicin und der Antimetabolit ARA-C (Cytosinarabinosid) etabliert. Im deutschsprachigen Raum existieren derzeit mehrere grosse Studiengruppen, die die Wirksamkeit unterschiedlicher Substanzkombinationen untersuchen (13). Alle Therapieprotokolle sind so hoch dosiert, dass zunächst eine komplette Aplasie des Knochenmarkes auftritt. Mit dieser sogenannten Induktionstherapie kann bei etwa 2/3 der Patienten die maligne Blastenpopulation zunächst eradiziert und die normale Hämatopoese wieder hergestellt werden (komplette Remission). Die sich daran anschließende Therapie zur Sicherung der kompletten Remission ist bei den allermeisten Formen der AML notwendig, wenn eine kurative Therapie angestrebt wird. Diese Therapie wird als Postremissionstherapie bezeichnet. Zu ihr zählen die Konsolidations- und die Erhaltungstherapie sowie die allogene und autologe Stammzelltransplantation.

Induktionstherapie: Primäres Ziel ist es, möglichst alle leukämischen Blasten zu vernichten und die normale Hämatopoese wieder herzustellen, was man als komplette Remission bezeichnet. Ledigliche Reduktion und keine Elimination der Leukämiezellen

wird als partielle Remission, ein Nichtansprechen auf die Therapie als Versagen bezeichnet. Durch prätherapeutische zyto- und molekulargenetische Untersuchungen können prädiktive Marker für Therapiesensitivität und Rezidivneigung nach der Induktionstherapie bestimmt werden.

Supportive Therapie: In der Regel am zehnten Tag der Induktionstherapie beginnt die Zeit der maximalen Knochenmarkdepression. Durch Blockade der Hämatopoese kommt es zur Panzytopenie mit den klinischen Symptomen der enormen Infektanfälligkeit, insbesondere für bakterielle und mykotische Infektionen, der Gefahr lebensbedrohlicher Blutungen sowie Schwächegefühl und Abgeschlagenheit. In dieser Phase der Aplasie bedarf es der Unterstützung des Patienten durch Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate und einer prophylaktischen und symptomatischen antimikrobiellen Therapie. Besonders Patienten mit der Promyelozytenleukämie sind neben der Thrombopenie auch durch plasmatische Gerinnungsstörungen blutungsgefährdet und müssen gegebenenfalls durch Substitution von Fresh-Frozen-Plasma- und AT-III-Konzentraten unterstützt werden.

Postremissionstherapie: Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie dienen nach Induktion der kompletten Remission dazu, mikroskopisch nicht mehr nachweisbare leukämische Blasten zu zerstören und auf diese Weise die Heilungschancen zu verbessern oder zumindest die Phase bis zum Auftreten des Rezidives hinauszuzögern. Auch hier ist die Suche nach der optimalen Variante, sei es in zyklischer oder kontinuierlicher Gabe der Zytostatika, Gegenstand aktueller Forschung.

Stammzelltransplantation: Für die Therapie der AML hat die allogene Stammzelltransplantation bei Patienten unter 60 Jahren in erster Remission sehr an Bedeutung gewonnen. Sie sichert ein rezidivfreies Überleben über mindestens fünf Jahre in der Hälfte aller Fälle. Da bei immer weniger Patienten mit Indikation ein HLA-kompatibler Familienspender zur Verfügung steht (kleinere Familien, ältere Patienten), wird auch zunehmend die allogene Fremdspendertransplantation eingesetzt, insbesondere bei Patienten mit ungünstigem Risikoprofil. Bei über 60-jährigen ist die allogene Fremdspendertransplantation in erster Remission noch experimentell und wird

vor allem bei Patienten mit sehr ungünstiger Prognosekonstellation angewandt. Im Rezidiv ist die allogene Stammzelltransplantation der einzige kurative Therapieansatz. Die Auswahl von Patienten in erster Remission für die allogene Transplantation ist Gegenstand intensiver klinischer Untersuchungen und muss sich an der individuellen Risiko-Konstellation der Patienten orientieren. So spricht ein hohes Rezidivrisiko auf Grund von anamnestischen oder molekularbiologischen Charakteristika der Erkrankung bei niedrigem Transplantationsrisiko (junger Patient, sehr guter, HLA-kompatibler Spender, günstige Virus-Infektionsanamnese) eher für eine allogene Transplantation, während umgekehrt ein niedriges individuelles Rezidivrisiko bei hohem Transplantationsrisiko für eine Postremissionstherapie durch Zytostatika spricht. Die Indikationsstellung ist hoch komplex und kann nur unter Einbeziehung des Patienten und seiner Familie erfolgen.

Von immer größerer Bedeutung und besonders zukunftsreich in der Therapie werden auf bestimmte charakteristische Mutationen der AML exakt zugeschnittene Hemmstoffe. Diese Entwicklung hat in der Hämatologie mit der Behandlung der Akuten Promyelozytenleukämie mit All-Trans-Retinoinsäure (ATRA) begonnen (22, 109). Während diese Therapie noch durch Zufall entdeckt wurde und erst im Nachhinein die molekularbiologische Rationale der Therapie charakterisiert werden konnte (Hemmung des für diese Erkrankung spezifischen Onkogens PML/RAR α), ist spätestens seit der erfolgreichen Therapie der Bcr/Abl-positiven CML mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib klar, dass auf Grund unseres Wissens um die Onkogenfunktion erfolgreich hoch wirksame neue Arzneimittel für maligne Erkrankungen entwickelt werden können. Neuere, spezielle Medikamente bei der AML umfassen den Farnesyl-Transferase-Inhibitor Tipifarnib zur Repression von Ras-Mutationen (48, 66), den CD-33-Antikörper Gemtuzumab (77, 83), den Proteasom-Inhibitor Bortezomib, Drug-Resistance-Modulatoren oder Tyrosinkinaseinhibitoren mit Aktivität gegenüber Flt3 (Midostaurin) und c-kit wie Sorafinib (46, 72). In *in-vitro* Experimenten konnten Steffen et al. nach Synthese eines rekombinanten Apoptose-Induktors selektiv das Wachstum AML1/ETO-positiver Zellen hemmen (99).

1.2 Molekulare Pathogenese der AML

1.2.1 Molekulare Grundlagen der gestörten Signaltransduktion

Die Entwicklung und das Überleben von jeder Zelle wird durch genetisch fixierte Programme reguliert, die in ihrer Funktionsweise entscheidend durch ihr extrazelluläres Milieu beeinflusst werden. Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Interaktionen spielen hier eine wichtige Rolle. Insbesondere Wachstumsfaktoren bilden den adäquaten Anreiz, die Zellintegrität aufrecht zu erhalten, verhindern den programmierten Zelltod (Anti-Apoptose) und sorgen für die Integration der Zelle in den Gesamtkontext des Organs. Um diese äußeren Einflüsse korrekt in den Zellkern weitergeben zu können (Signaltransduktion), benötigen die Empfängerzellen molekulare Strukturen zum spezifischen Signalempfang (Rezeptoren), zu dessen Weiterleitung („second messenger“) und zur Modifikation des genetischen Programms im Zellkern (Transkriptionsfaktoren).

Flt3-ITD-Mutationen

Der Wachstumsfaktorrezeptor Flt3 (fms-like tyrosine kinase 3) gehört zusammen mit PDGFR α und β , c-kit, dem Rezeptor für den Stammzellefaktor SCF, und c-fms in die Gruppe der Klasse-III-Rezeptortyrosinkinase (86). Strukturell gemein sind dieser Familie fünf Immunglobulin-ähnliche, extrazelluläre Domänen, zwei Sequenzen mit Tyrosinkinaseaktivität, die durch eine „Insert-Kinase-Domäne“ getrennt werden sowie eine homologe intrazelluläre Domäne. Rosnet et al. beschrieben und charakterisierten 1991 erstmals diesen Rezeptor und fanden das zugehörige Gen auf Chromosom 13q12, das ca. 3000bp groß ist (65, 87). Das Gen besitzt 24 Exons, von denen Exon 14 und 15 die juxtamembranäre Sequenz und Exon 20 die distale Tyrosinkinaseeinheit kodieren (1). Dieser Rezeptor wird neben dem hämatologischen Gewebe auch von der Plazenta, Hoden, dem Gehirn und lymphatischen Geweben wie Lymphknoten und Thymus exprimiert (65). In hämatopoetischen Zellen findet er sich auf frühen multipotenten Vorläuferzellen, jedoch nicht auf primitiven Stammzellen. Mit Beginn der Expression von Flt3 verlieren frühe Vorläuferzellen im Mausmodell die Fähigkeit zur Repopulation myeloischer Zellen, behalten aber im Gegensatz dazu die Möglichkeit, in lymphatische

Zellen auszudifferenzieren (3). Der Ligand des Flt3 Rezeptors, FL (Flt3 Ligand), ist ein 20kDa großes Protein, das entweder in transmembranärer oder löslicher, homodimerer Form vorliegen kann. Die lösliche Form entsteht entweder durch alternatives Splicing von Exon 6 oder durch Abspalten der membrangebundenen Form (64). Humane, myeloische Mesenchymzellen sind in der Lage, mRNA für die lösliche und für die transmembranöse Form von FL zu produzieren (63). Neben solchen Mark-Fibroblasten wird FL auch von anderen Zellen, wie beispielsweise der myeloischen oder der lymphatischen Linie gebildet. Das Andocken von FL führt zur Dimerisierung des Flt3-Rezeptors, wodurch seine Tyrosinkinase-Domänen aktiviert werden. Dies bewirkt nachfolgend eine Autophosphorylierung der intrazellulären Domänen des Rezeptors. Die Signalweitergabe erfolgt durch direkte Bindung von Second-messenger-Molekülen oder durch Phosphorylierung weiter downstream gelegener Signalmoleküle (89). Nakao und Mitarbeiter entdeckten 1996, dass die Flt3-PCR-Amplifikate der juxtamembranären Region des Rezeptors bei einer Reihe von Patienten um einige Nukleotide größer waren als in normalen Zellen. Sie hatten so eine Mutation des Rezeptors gefunden, die durch eine variable, wiederholende Verlängerung von 4-50 Aminosäuren in der juxtamembranären Region gekennzeichnet ist, die als interne Tandemduplikationen (ITD) bezeichnet werden (76). Dieser Region des Rezeptors wird eine repressive Funktion hinsichtlich der Rezeptoraktivierung zugeschrieben, die durch die ITD-Mutation aufgehoben wird (113). Durch zahlreiche Studien an AML-Patientenproben wurde eine durchschnittliche Häufigkeit dieser ITD-Mutation von etwa 25% festgestellt (98). Ihr Auftreten korreliert mit bestimmten FAB-Subgruppen und spezifischen Karyotypen; so sind sie in der M2, der M6 und in komplexen Karyotypveränderungen weit weniger zu finden (1, 51, 91, 101, 117) als in der M3 und bei normalem Karyotyp (47, 52, 91). Die meisten Studien zeigen für ITD-positive Leukämien eine Verkürzung der krankheitsfreien und der Gesamtüberlebenszeit (2, 35, 47, 51, 56, 91, 101, 112). Obwohl die ITD-Mutation die zahlenmäßig häufigste genetische Veränderung der AML ist, kann sie durch ihr inkonstantes Auftreten im konkreten Einzelfall nur eingeschränkt zum Monitoring einer minimalen residualen Krankheit herangezogen werden, da sie im Verlauf der Erkrankung verloren gehen kann (45, 57, 75, 96). Funktionell führt die Mutation zur dauerhaften Autoaktivierung des Rezeptors durch Phosphorylierung. Diese Daueraktivität führt zu Wachstumsfaktor unabhängigem Überleben und

Wachstum, Resistenz gegenüber radioaktiver Strahlung und zu klonaler Proliferation (31, 45, 57, 71, 75, 96). Kelly et al. erbrachten aber den wichtigen Nachweis, dass die ITD-Mutation zwar ein myeloproliferatives Syndrom herbeiführen kann, aber alleine für die Induktion einer AML nicht ausreicht (50). Unter Einfluss der ITD-Mutation ändert sich auch das intrazellulär aktivierte Spektrum Signal vermittelnder Moleküle. So zeigt der Transkriptionsfaktor STAT5 eine deutlich erhöhte und konstitutive Aktivierung gegenüber der Antwort auf die Aktivierung des Wildtyp-Flt3-Rezeptors (31, 42, 71, 103). Jüngeren Ergebnissen zufolge werden für die STAT5-Aktivierung unter der ITD-Mutation die Tyrosinresiduen an Position 589 und 591 verantwortlich gemacht (85). Neben dem STAT5-Signalweg zeigten Brandts et al., dass die Flt3-ITD-Rezeptoren auch über den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Weg mit konstitutiver Aktivierung von AKT ihre leukämogene Aktivität vermitteln (10). Dabei konnten Schmidt-Arras et al. 2005 nachweisen, dass die ITD-Mutation dem Flt3-Rezeptor nicht nur Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation und Überleben verleiht, sondern es auch zu einem fehlgeleiteten Reifungsprozess des Rezeptors kommt. Dies führt zu einem verlängerten Aufenthalt und Aktivierung im Golgi-Apparat sowie im endoplasmatischen Retikulum (90). Diese Ergebnisse wurden 2009 von Choudary bestätigt und erstmalig ein unterschiedliches Autophosphorylierungsprofil der Flt3-ITD-Mutation beschrieben, je nachdem ob diese mutierte Rezeptorversion an die Zytoplasmamembran oder an den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum gebunden war. Diese unterschiedliche Form der vom Zellkompartiment abhängigen Aktivierung des Rezeptors führte zu einer ebenfalls selektiven intrazellulären Signalweitergabe. Dabei zeigte sich bei der Zytoplasmamembran assoziierten Variante eine Signaltransduktion, die über die Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-Kinase und AKT vermittelt wurde. Die STAT5-Signaltransduktion erforderte jedoch die anhaltende Bindung an die Membran des Golgi-Apparates/endoplasmatischen Retikulums (19).

Durch Suppression myeloischer Transkriptionsfaktoren wie *c/EBP α* und *PU.1* gewinnen die ITD-Mutationen neben dem Effekt auf Überleben und Wachstum auch Einfluss auf die spezielle Differenzierung myeloischer Zellen (121). Ein zweiter Angriffspunkt zur Induktion des beobachteten myeloischen Differenzierungsblockes in Flt3-ITD-positiven Zellen besteht in der Repression von *RGS2*, einer Relaisstation aus dem G-Protein gekoppelten Signalweg. Eine Reetablierung der *RGS2*-Funktion resultierte in Reduktion

der konstitutiven AKT-Aktivierung und in Reinduktion der *c/EBP α* -Expression und der granulozytären Differenzierung (93). Neben den ITD-Mutationen des Flt3-Rezeptors existieren auch Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors (TKD-Mutationen); diese führen ebenfalls zur dauerhaften Aktivierung von AKT, nutzen aber im Gegensatz zu den ITD-Mutationen nicht die Signaltransduktionswege über STAT5 noch reprimieren sie *c/EBP α* und PU.1 (20).

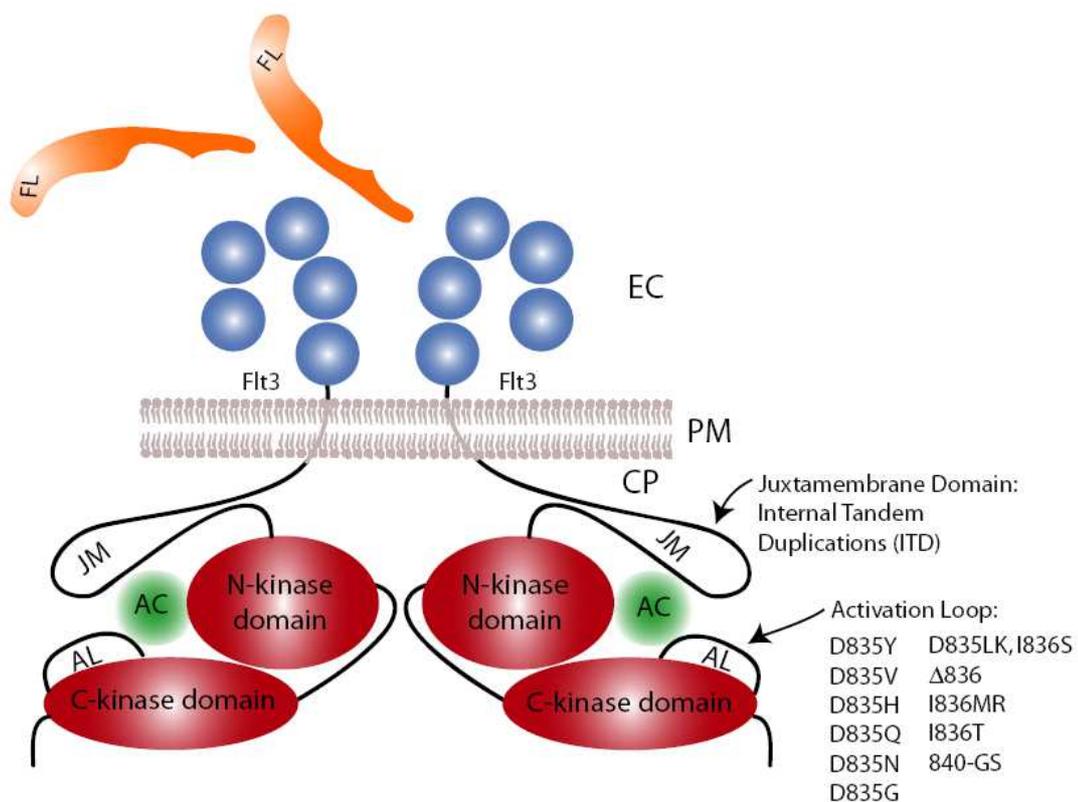


Abbildung 1: Darstellung des Flt3-Homodimers, seiner funktionellen Substruktur und den Mutationslokalisationen. Nach Aktivierung des Rezeptors durch den Flt3-Ligand (FL) kommt es zur Homodimerisierung sowie zur Aufnahme der Phosphorylierungsaktivität an den Kinasedomänen. Die mitdargestellten Mutationen wie die Interne Tandemduplikation (ITD) oder Punktmutationen in der Aktivierungsschleife verleihen den entsprechenden Zellen Wachstumsfaktor unabhängiges Überleben.

STAT-5

Das STAT5-Protein gehört in die Familie der „Signal Transducers and Activators of Transcription“. Dieser gehören darüber hinaus die Proteine STAT1, 2, 3, 4 und 6 an.

Erstmals beschrieben wurden sie anhand von Untersuchungen, die die Änderung des genetischen Expressionsmusters unter Einfluß von Zytokinen analysierten (18, 33, 59). Aufgrund des schnellen Nachweises der STAT-Moleküle im Nucleus nur einige Minuten nach Gabe von INF wurde eine sehr kurze Aktivierungskaskade vermutet (115). Die Mitglieder der STAT-Protein-Familie gleichen sich in ihrem strukturellen Aufbau und damit verbundener Funktion. Sie tragen an ihrem N-terminalen Ende die sogenannte „oligomerisation site“, die für die Stabilisierung der Interaktion mit anderen STAT-Proteinen wichtig ist (s. Abb. 2). Die folgende DNA-Bindungsdomäne verleiht den STATs ihre jeweilige Spezifität für die Transkription unterschiedlicher Gene. Die folgende Src-homology-2-Domäne (SH2) ist eine bei Signalmolekülen gut bekannte, strukturelle Einheit, die Protein-Protein-Interaktionen durch direkte Bindung über phosphorylierte Tyrosinreste ermöglicht. Die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste direkt unterhalb der SH2-Domäne stellt den aktivierenden Schritt von STAT-Molekülen dar. Die so entstehenden Phosphotyrosyl-Reste dienen als Bindungsstellen für die SH2-Region eines zweiten STAT-Proteins. Nur im homodimerisierten Zustand können STAT-Proteine in den Zellkern übertreten und dort ihre transkriptionellen Aufgaben wahrnehmen (94). Am C-terminalen Ende enthalten einige STATs, darunter STAT5, eine Transaktivierungszone mit Serinresten. Die Phosphorylierung an diesen Serinen steigert zusätzlich ihre Aktivität als Transkriptionsfaktor (110). Bisher konnten an die hundert STAT-abhängige Gene entdeckt werden (24, 27). Die Expression dieser Gene wird durch extrazelluläre Signale induziert, die die STAT-Aktivierung nach sich ziehen. Dazu gehören u.a. solche von Zytokin-, Tyrosinkinase- (RTK) und Nicht-Tyrosinkinase- (nRTK)-Rezeptoren (s. Abb. 3). Die biologische Funktion von STAT5 wurde in Mäusen mit rekombinanter Deletion von STAT5 untersucht. STAT5A-Knockout-Mäuse zeigten eine defekte Brustdrüsenentwicklung während der Tragzeit, während sich in STAT5B-Knockout-Mäusen eine dimorphe Leberenzymexpression fand (104). Zudem bewies Teglund eine wichtige Rolle von STAT5 in der adäquaten Entwicklung des Immunsystems (100). Konstitutive Aktivierung insbesondere von STAT3 und STAT5 spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von soliden Tumoren, Leukämien und Lymphomen (9). Während die Aktivierung von STAT5A unter dem Einfluß der Rezeptortyrosinkinase Flt3 nur dezent war – STAT5B wurde überhaupt nicht aktiviert - (119), und keine konsekutive DNA-Bindung nachweisbar war,

bestätigten Mizuki et al. sowie weitere Gruppen konstitutive STAT5-Aktivierung in AML-Blasten durch die oben beschriebene Flt3-ITD-Mutation (8, 71, 78, 97; siehe Abb. 4).

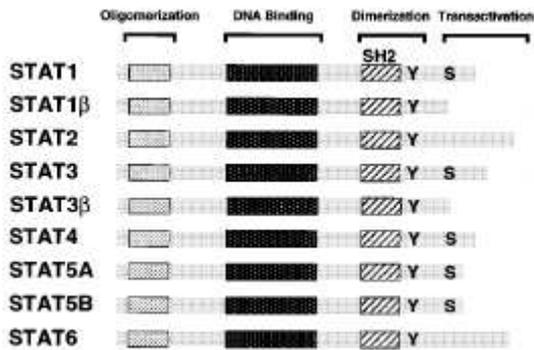


Abbildung 2: Aufbau der STAT-Moleküle (entnommen aus Bowman et al., *STATs in Oncogenesis*, *Oncogene*, 2000 (9)).

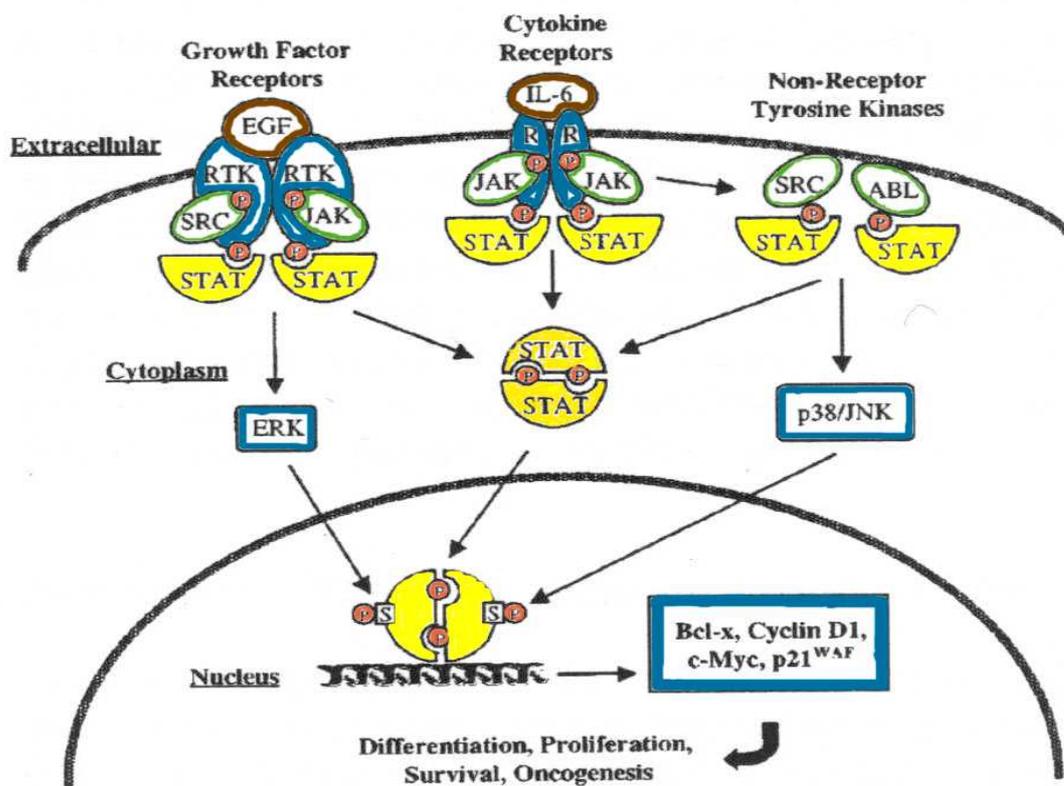


Abbildung 3: Molekulare Optionen der STAT5-Aktivierung (modifiziert nach Bowman et al., *STATs in oncogenesis*, *Oncogene*, 2000 (9)).

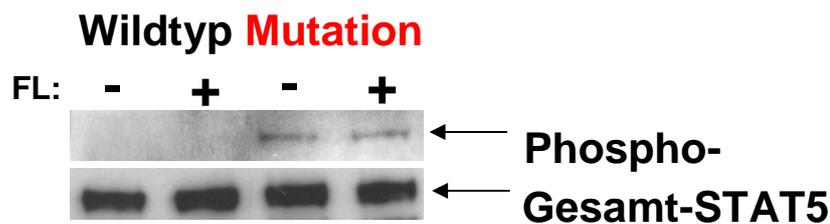


Abbildung 4: Konstitutionelle STAT5-Aktivierung unter der Flt3-ITD-Mutation des Rezeptors. Während unter dem Wildtyp-Flt3-Rezeptor auch unter Stimulation durch seinen Liganden FL zu keinerlei Aktivierung von STAT5 kommt, erfolgt unter dem Einfluss der Längenmutation die Wachstumsfaktor unabhängige Rekrutierung und Aktivierung durch Phosphorylierung von STAT5 (Phosphowesternblot entnommen aus Mizuki et al., Bood, 2000 (71)).

Die konstitutive STAT5-Aktivierung ermöglicht den Flt3-ITD-tragenden Zellen von IL-3 unabhängiges Überleben und Proliferation (31, 71). Choudhary et al. konnten aufzeigen, dass jedoch nur die ITD-Mutation des Flt3-Rezeptors zu einer aberranten Aktivierung des STAT5-Signalweges führt und dies nicht für die Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne gilt (20). Dies wurde durch die Arbeit von Grundler et al. auch in einem Knochenmark-Transplantationsmodell an der Maus bestätigt (39). Diese STAT5-Aktivierung ist auch durch RGS2, einen wichtigen Mediator der myeloischen Differenzierung, nicht zu reprimieren (93). Eine konstitutive Serinphosphorylierung von STAT5 in AML-Blasten konnte ebenfalls aufgezeigt werden (92).

Insgesamt wird aber nach Sichtung des gegenwärtigen Forschungsstandes zu den STAT-Proteinen deutlich, dass viele kooperierende und inhibierende Bindungspartner der STATs noch zu charakterisieren sind. Die zentrale Stellung dieser Mediatoren in vielen Fällen maligner Transformation erscheint jedoch offensichtlich.

1.2.2 Molekulare Grundlagen der gestörten Genregulation am Beispiel AML1/ETO

Es ist wie bereits beschrieben von essentieller Bedeutung für die korrekte Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, dass durch ein ausgefeiltes

Gleichgewicht von allgemeinen und zelllinienspezifischen Transkriptionsfaktoren die angemessenen Expressionsprofile der hierfür relevanten Gene sequenziell abgerufen werden. Die Suppression dieses fein abgestimmten Ablaufplanes ist eine der wichtigsten Veränderungen in der Genese der AML. Bereits Gilliland et al. konnten zeigen, dass diese Schritte durch Fusionsproteine, die myeloische Transkriptionsfaktoren einschließen, behindert werden können (38). Zu diesen allgemeinen, linienunspezifischen Transkriptionsfaktoren gehört auch AML1, das zunächst die ersten Schritte der gesamten Hämatopoese kontrolliert. Konsequenterweise leiden AML1^{-/-}-Knockout Mäuse in der Fetalzeit unter ausgefallener hepatischer Hämatopoese und Blutungen in das zentrale Nervensystem und sterben am 11,5-12,5 Tag in der Embryonalperiode (80, 108). AML1, auch bekannt als CBF α , kodiert auf dem Genlocus 21q22, bildet mit CBF β , Genlocus 16q22, den so genannten „Core Binding Factor Complex“, wobei AML1 die DNA-Bindungskapazität beinhaltet. Dieser Komplex rekrutiert im nativen Zustand Histonacetyltransferasen (HAT) und führen so über eine Acetylierung der Histone zu einer Lockerung der Chromatinstruktur, die die DNA für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich macht. Dieser essentielle Transkriptionsfaktorkomplex wird durch verschiedene, in unterschiedlichen Typen der AML vorkommende, balancierte Translokationen außer Kraft gesetzt. Dazu gehören die Translokationen t(8;21) und t(16;16) sowie die inv(16) und werden zusammengenommen in 25% von AML-Fällen gefunden (58). Dabei ist die t(8;21) mit 10-15% die am häufigsten auftretende Translokation (25). Dies führt zur Anbindung des transkriptionellen Repressors ETO an das C-terminale Ende des transkriptionellen Aktivators AML1 und resultiert in dem Fusionsprotein AML1/ETO (61, 69). ETO rekrutiert nun Korepressoren wie NcoR, SMRT und mSin3, die die Bindung von Histondeacetylasen (HDACs) nach sich ziehen, so dass die Chromatinstruktur geschlossen wird und AML1-abhängige Gene in ihrer Expression unterdrückt werden ((5, 36); siehe Abb. 5).

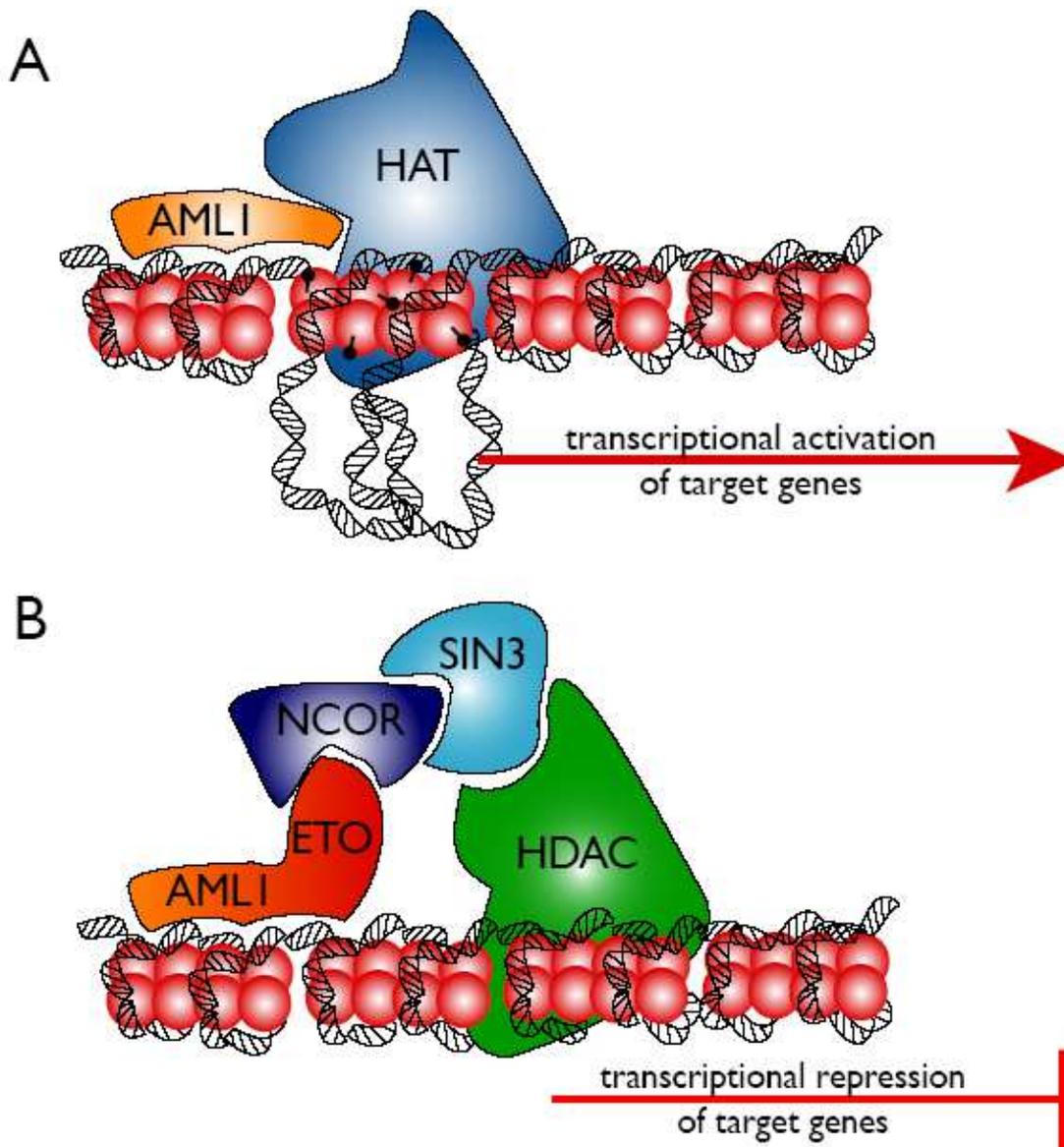


Abbildung 5: Blockierung der Transkription bei AML1/ETO durch Rekrutierung von Histondeacetylasen. A) Im nativen Zustand rekrutiert AML1 Histonacetyltransferasen, welche durch Acetylierung der Histone den Abstand zur DNA vergrößern und so dem Transkriptionskomplex zugänglich machen. B) Die t(8;21) führt über Korepressoren wie NcoR und SIN3 zur Bindung von Histondeacetylasen und Umkehrung des physiologischen Ablaufs. (mit freundl. Genehmigung modif. nach B.Steffen)

Kohzaki konnte zeigen, dass diese Zellen in ihrer Differenzierung blockiert werden, wenn sie AML1/ETO überexprimieren (55). Darüberhinaus konnte in mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden, dass eine negative Interaktion von AML1/ETO und c/EBP α , ein essentieller Regulator der granulozytären Differenzierung, ebenfalls zum

Differenzierungsblock beiträgt (11, 32, 33, 82). Die transformierende Eigenschaft von AML1/ETO ist auf der einen Seite so stark, dass sie in heterozygoten Tieren das normale AML1-Allel in seiner Funktion dominant negativ inhibiert (79, 80), auf der anderen Seite aber nicht in der Lage ist, als alleinige Mutation eine Leukämie hervorzurufen (79, 84, 116). Bei *in vivo* Experimenten konnte zudem AML1/ETO als wichtiger Regulator von Apoptose und Stammzellproliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen charakterisiert werden (12, 43). Interessanterweise zeigen AML1/ETO tragende Zellen – je nach ihrem genetischen Hintergrund – unterschiedliche Phänotypen und Eigenschaften; ein Phänomen bei Fusionsproteinen, das bereits von den aus der CML bekannten bcr-abl-Isoformen berichtet worden ist. So konnte die Gruppe um Mulloy nachweisen, dass AML1/ETO in der Lage ist, in hämatopoetischen Stammzellen gesteigerte Wachstumsraten mit Überlebensvorteil zu erzeugen, während weiter in der Differenzierung fortgeschrittene hämatopoetische Progenitorzellen trotz AML1/ETO-Transduktion einen solchen Effekt vermissen ließen (74). In das Problem des aktuell aktivierten genetischen Programms läßt sich auch das Untersuchungsergebnis von Bäsecke einordnen, der nach Transduktion von AML1/ETO in CD34+-Zellen keinen Differenzierungsblock, sondern linienspezifische Marker für die myeloische, B-lymphatische und NK-Zell-Differenzierung detektierte (7).

Zusammenfassend lassen sich also die Funktionen von AML1/ETO nicht auf die (ent-)differenzierende Wirkung beschränken, sondern muss sich nach *in vivo* Versuchen auch auf Konsequenzen bezüglich Apoptose, Stammzellerneuerung und –proliferation ausdehnen lassen.

1.3 Grundidee und analytische Ziele dieser Arbeit

Grundidee

In letzter Zeit wurde immer deutlicher, dass die ursprünglich angenommene, kaskadenartige und strikt Zellkern-gerichtete Signaltransduktion nicht ausreichend zutreffend ist, sondern vielmehr eine Vielzahl verschiedener Signalmoleküle jeweils mit mehreren Signalkaskaden interagiert und so ein komplexes Netz von Rezeptoren,

Signaltransduktoren, „second-messenger“-Molekülen und Transkriptionsfaktoren bilden, das die Modifikation von Signalen auf verschiedenen Ebenen ermöglicht, (siehe dazu auch (38)). So ist es von großer Bedeutung, dass wir diese funktionellen Überschneidungen und Interaktionen unter den unterschiedlichen Klassen von Transformation fördernden Molekülen im Detail mit dem Ziel analysieren, bestimmte Moleküle an essentiellen Kreuzungsstationen zu identifizieren und damit neue Ansätze für alternative, maßgeschneiderte Therapien zu entwickeln. Insbesondere in der aktuellen Literatur mehren sich die Veröffentlichungen über Interaktionen zwischen Molekülen und Strukturen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, und solchen aus der Genregulation. Tickenbrock et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass sowohl AML1/ETO als auch Flt3-ITD Einfluss auf den Wnt-Signalweg haben (102). Die Fusionsprotein-bedingte Einflußnahme auf den Wnt-Signalweg über Plakoglobin wurde darüberhinaus von Müller-Tidow beschrieben (73). Auch in dieser Arbeit geht es darum, ein weiteres funktionelles Zusammenspiel zwischen unterschiedlichen, aber für die AML charakteristischen Mutationen aus diesen beiden Klassen genetischer Veränderungen näher zu untersuchen. Dabei geht es zum einen um die Interne Tandemduplikation (ITD) im Gen der Rezeptortyrosinkinase Flt3, zum anderen um die Translokation t(8;21) mit dem Fusionsprotein AML1/ETO als Produkt. Die ITD-Mutation ist nicht nur mit 23% Vorkommen eine der häufigsten in allen AML-Fällen (s. Abb. 6, (91)), sondern geht auch mit einer prognostisch ungünstigeren, höheren Rezidivrate einher (51, 91), während die AML1/ETO-Mutation in die günstige Prognosegruppe einsortiert wird (s. Abschnitt „Prognosefaktoren“).

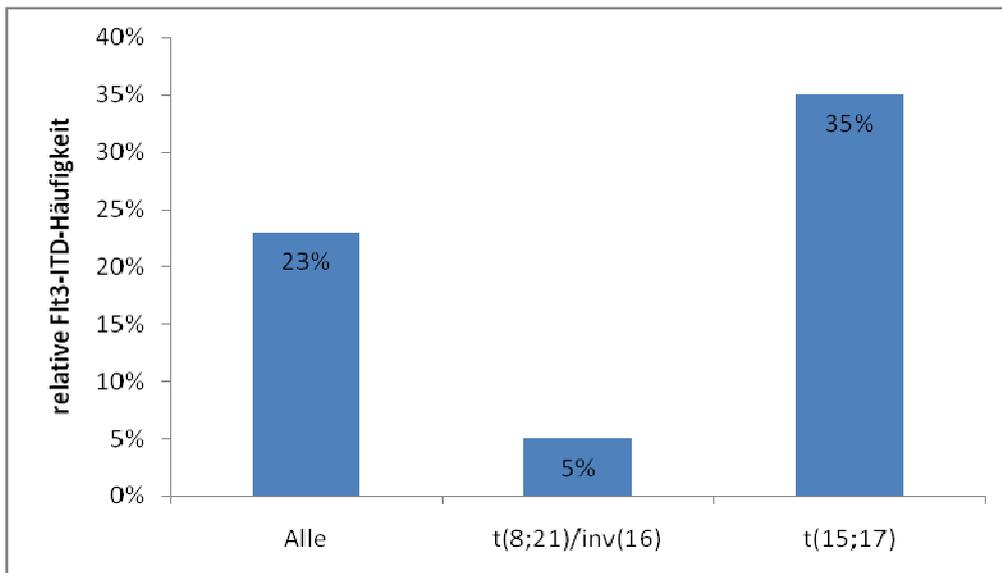


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der Flt3-ITD-Mutation in Patienten mit AML. Interne Tandemduplikationen (ITD) kommen insgesamt bei ca. 23% aller Fälle von Leukämie vor. Bei zytogenetischen Abberationen wie der t(8;21) oder der inv(16) sinkt dessen Häufigkeit auf 5%. Nur bei Patienten mit t(15;17)-positiven Leukämien sind die ITD-Mutationen überdurchschnittlich häufig vertreten und machen 35% aus (Daten aus Schnittger et al., Blood, 2002 (91)).

Interessanterweise zeigen Daten aus derselben Arbeit, dass ITD-Mutationen signifikant häufiger bei Patienten mit normalem Karyotyp auftreten (s. Abb. 7), als bei denen, die zytogenetische Abberationen aufweisen (s. Abb. 6 und 7). Dies betrifft insbesondere die Koexistenz von ITD und AML1/ETO. Das entgegengesetzte Bild präsentiert sich bei solchen Veränderungen des Genoms, die die t(15;17) enthalten (s. Abb. 6).

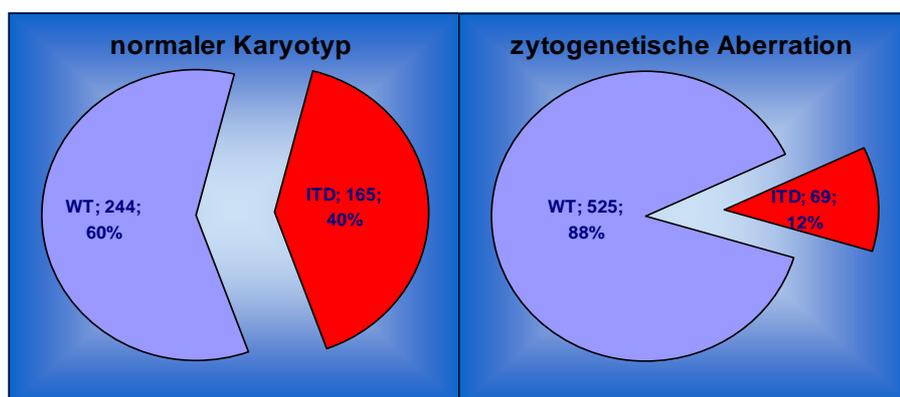


Abbildung 7: Verhältnis der relativen Häufigkeiten von Flt3-ITD-Mutation zum Wildtyp-Rezeptor (WT).

Auch in Arbeiten von Kiyoi und Kainz konnten Häufigkeitsunterschiede der ITD-Mutationen in den unterschiedlichen FAB-Sybtypen mit niedrigem Vorkommen in der M2 und der M6 und einem hohen Anteil in der M3 herausgearbeitet werden (47, 52). Le Beau und Kelly konnten nachweisen, dass die ITD-Mutation die Ausbildung einer Promyelozytenleukämie (FAB M3) bei vorbestehender t(15;17) verstärkt (49, 60). Dies war eine erste Bestätigung der Kooperation und Vernetzung dieser zwei Klassen von Mutationen.

Diese Arbeit beschäftigt sich im Folgenden mit den möglichen Ursachen des geringen gemeinsamen Auftretens von ITD- und AML1/ETO-Mutationen in akuten myeloischen Leukämien. Dabei werden unter der Arbeitshypothese einer gegenseitig (un-)mittelbaren Interaktion auf dem Niveau der intrazellulären Signalkaskade funktionelle Konsequenzen hinsichtlich Zellwachstum, DNA-Bindung und Expressionsaktivität von Zielgenen analysiert. Darüber hinaus geht es darum, zentrale Moleküle zu identifizieren, die als potentieller Angriffspunkt beider Mutationen eine zentrale Rolle einnehmen.

Ziele dieser Arbeit

1. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von AML1/ETO⁺/Flt3-ITD⁺-Zellen
2. Untersuchung dieses Wachstumsverhaltens in Abhängigkeit von der Aktivität der AML1/ETO-DNA-Bindungsdomäne in AML1/ETO⁺/Flt3-ITD⁺-Zellen
3. Nachweis von STAT5 als kritisches Molekül der Signaltransduktion von Flt3-ITD durch dessen Phosphorylierungsbeeinträchtigung durch AML1/ETO
4. Analyse der Dosisabhängigkeit der STAT5-DNA-Bindung durch AML1/ETO
5. Analyse der transkriptionellen Regulation STAT5-abhängiger Gene durch AML1/ETO
6. Analyse der Syntheserate STAT5-abhängiger Proteine unter AML1/ETO

2 Ergebnisse

2.1 AML1/ETO und Flt3-ITD-Mutationen antagonisieren sich gegenseitig in der Induktion von Koloniewachstum in 32D-Zellen

Ausgehend von der Hypothese, dass AML1/ETO aufgrund der Verursachung redundanter/konkurrierender Signalkaskaden in nur weniger als 5% der Fälle Flt3-ITD-positiver Leukämien auftritt (91) und damit eine leukämogene Wirkung benachteiligt, bestand zunächst das Interesse zu analysieren, welche funktionellen Auswirkungen beide Mutationen zusammen auf das Verhalten der Zelle haben. Aus diesem Grunde wurde zunächst das Wachstumsverhalten als ein in Leukämien aberrantes und gleichzeitig klinisches, für die Prognose relevantes Merkmal in der murinen myeloischen Zelllinie 32D untersucht. Das Wachstum transfizierter Zellen wurde über den so genannten Colonie-Assay quantifiziert. Im ersten Teilexperiment untersuchte ich die Fähigkeit von 32D-Zellen, die den Flt3-Wildtyprezeptor trugen, in Abhängigkeit von AML1 bzw. dessen pathologischem Translokationsprodukt AML1/ETO Kolonien zu bilden (s. Abbildung 8A). Dabei steigerte sich die Koloniezahl von AML1/ETO⁻ gegenüber AML1⁺-Zellen um ca. 50% (47,18%). Dieser proliferative Effekt ließ sich möglicherweise auf die anti-apoptotische Wirkung von AML1/ETO durch direkte Repression von p14^{ARF} (62) oder durch Induktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (6, 53) zurückführen. Wurden im zweiten Teilexperiment Flt3-ITD⁺-Zellen mit AML1 transfiziert, steigerte sich die Koloniezahl im Vergleich zur Wildtyp-Transfektion um $\frac{1}{3}$ (33,1%), vermutlich durch den proliferationsfördernden und überlebenssteigernden Einfluss der Rezeptormutation. Der gleiche Zelltyp mit dem Translokationsprodukt AML1/ETO transfiziert zeigte eine deutliche Wachstumsrepression auf ca. 1% der Koloniezahl der Flt3-ITD⁺/AML1⁺-Zellen (s. Abb. 8A). Zur Bestätigung dieser Wachstumsinhibition wurde eine zweite Versuchsreihe mit dreimaliger Repetition angesetzt (s. Abb. 8B). Anstatt AML1 wurde nun der Leervektor pcDNA_{3.1} als Kontrolltransfektion eingesetzt. Auch in dieser Versuchsreihe konnte die zuvor aufgezeigte, induzierte Wachstumsrepression der Flt-3-ITD⁺/AML1/ETO⁺ Zellen auf ca. 10% nachvollzogen werden.

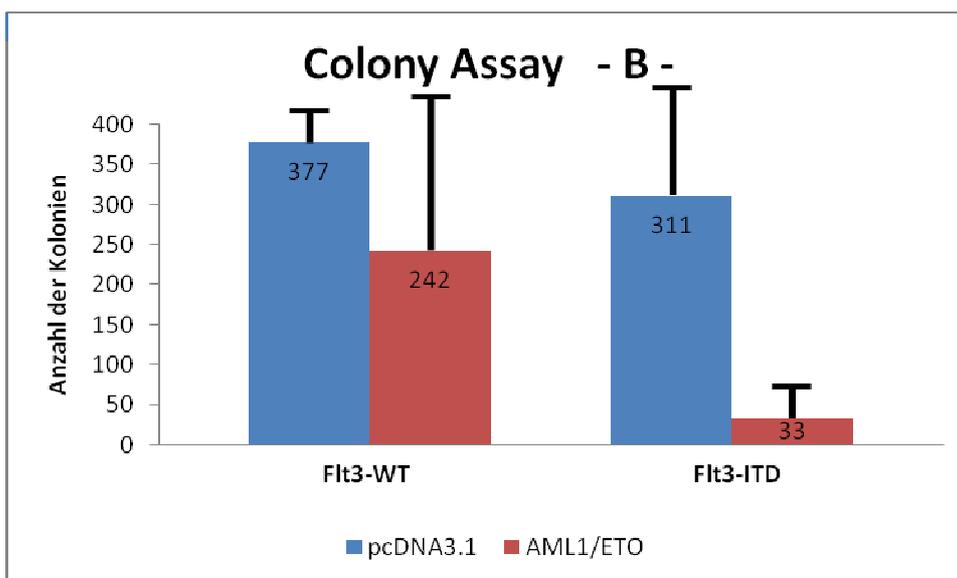
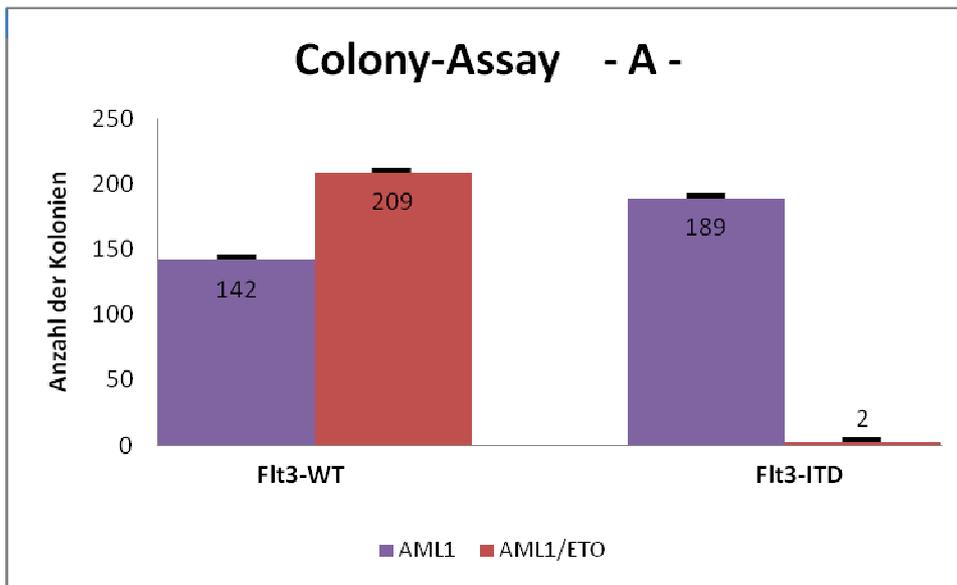


Abbildung 8A und B: Wachstumsinhibition von Flt3-ITD-positiven Zellen bei Kotransfektion mit AML1/ETO. **A** Im ersten Telexperiment mit dem Wildtyprezeptor zeigt sich im Vergleich zur AML1-Transfektion ein Wachstumsvorteil für AML1/ETO mit einer Steigerung der Kolonieanzahl; in der Kombination Flt3-ITD und AML1/ETO dann Darstellung einer deutlichen Inhibition der Koloniebildung (Einzelexperiment) **B** Im zweiten Experiment erneuter Vergleich zwischen 32D-Zellen mit Wildtyprezeptor und ITD-Mutation und deren Koloniebildung in Abhängigkeit von AML1/ETO und dem Leervektor pcDNA3.1 als Kontrolle. Bestätigung der Wachstumsinhibition in AML1/ETO/Flt3-ITD doppelten positiven Zellen (Mittelwerte und Standardabweichungen in **A** aus einem Experiment mit je drei Transfektionen, in **B** aus drei unabhängigen Versuchsansätzen mit je drei Transfektionen; schwarze Balken repräsentieren die Höhe der Standardabweichung).

Dieses erste Resultat wird auch zusätzlich durch den frustranen Versuch zur Etablierung einer stabilen Zelllinie, die AML1/ETO und Flt3-ITD exprimiert, mangels einer hinreichenden Proliferationsaktivität der doppelt transfizierten Zellen bestätigt.

2.2 Hemmung des Koloniewachstums in 32D-Zellen ist unabhängig von der AML1-DNA-Bindungsdomäne

Da im vorangegangenen Experiment eine funktionell relevante Interaktion der beiden Mutationen mit proliferationsmodulierenden Ereignissen gezeigt werden konnte, sollten im Anschluss mögliche Stationen dieser gegenseitigen Beeinflussung untersucht werden. Von der Überlegung ausgehend, dass das Translokationsprodukt t(8;21) mit AML1 einen DNA-bindungsfähigen Transkriptionsfaktor und mit ETO einen funktionsfähigen Repressor miteinbezog, richtete sich zuerst das Augenmerk auf Veränderungen dieser transkriptionsregulierenden Fähigkeiten von AML1/ETO durch die ITD-Mutation und/oder ihrer Signalmoleküle. So sollte sich, wenn solche DNA-bindende, transkriptionsregulierende Veränderungen an dem beeinträchtigten Wachstum bei Koexistenz von AML1/ETO und Flt3-ITD beteiligt waren, die resultierende Wachstumsrepression durch Aufhebung der DNA-Bindungsfähigkeit von AML1/ETO wieder aufheben lassen. So führte ich weitere Colony-Assays durch, in denen 32D-Zellen mit Flt3-ITD und dann jeweils mit dem Leervektor pcDNA_{3.1} in der Kontrolle und einer Deletionsmutante, Δ AML1/ETO, die die spezifische DNA-Bindungsdomäne des AML1-Anteiles (Abb. 9) nicht mehr enthielt, transfiziert wurden.

```

1 mpdspvdvkt qsrltpptmp pppttqgapr tssftpttlt ngtshsptal
  ngapsppngf
61 sngpssssss slanqqppa cgarqlsklk rflttlqqfg ndispeiger
  vrtlvlglvn
121 stltieefhs klqeatnfpl rpfvipflka nlpllqrell hcarlakqnp
  aqydaqheql
181 lldasttspv dssellldvn engkrtrpdr tkengfdrep lhsehpskrp
  ctispgqrys
241 pnnnglsyqpn glphptpppp qhyrlddmai ahhyrdsyrh pshrdlrdn
  rpmglhgtrq
301 eemidhrltd rewaeewkhl dhllncimdm vektrrsltv lrrcqeadre
  elnywirrys
361 daedlkkggg sssshsrqqs pvnrdpvald ahreflhrpa sgyvpeeiwk
  kaeavnevk
421 rqantelqka vseaerkahd mitterakme rtvaeakrqa aedalaving
  qedssescwn
481 cgrkasetcs gcntarycgs fcqhkdwekh hhicgqtlqa qqqgdtpavs
  ssvtpnsgag
541 spmdtppaat prsttpgtps tiettpr

```

Abbildung 9: Aminosäuresequenz von AML1/ETO (entnommen aus Era et al., Genes Chromosomes Cancer, 1995 (28)).

Entgegen der Hypothese kam es zur erneuten Repression des Koloniewachstums dieser Zellen. Ihre Anzahl war auf 3,1% gegenüber dem Ausgangswert der Kontrollprobe verringert (s. Abb. 10). Die Wirkung von AML1/ETO in ITD-positiven Zellen verhielt sich somit unabhängig von der AML1/ETO-DNA-Bindungsdomäne. Die Abbildungen verdeutlichen die Werte eines Einzelexperimentes (- A -) sowie die Durchschnittswerte dreier unabhängiger Experimente (- B -).

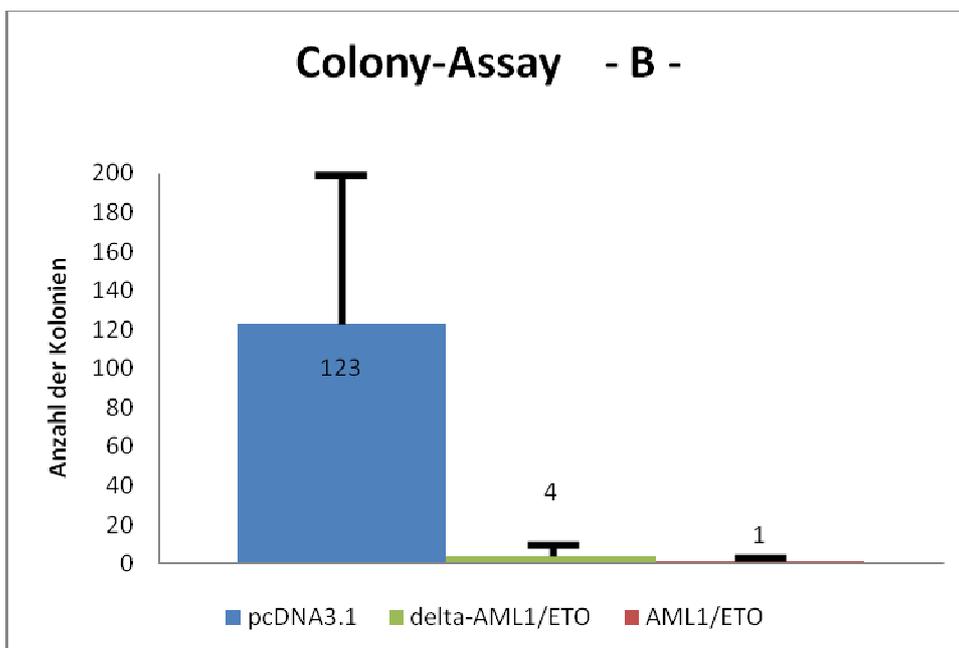
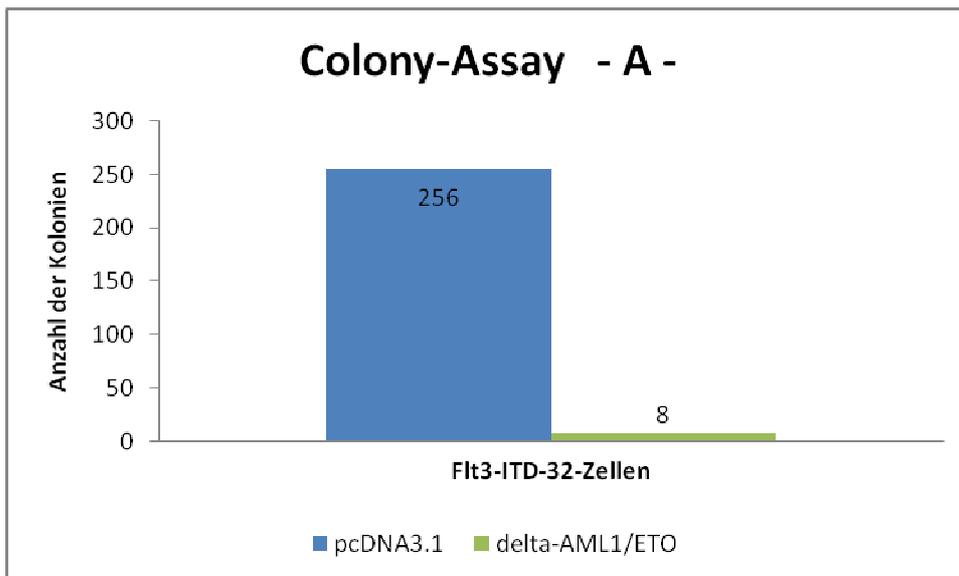


Abbildung 10 A und B: Unabhängigkeit des inhibierten Koloniewachstums von der AML1-DNA-Bindungsdomäne in Flt3-ITD-positiven 32D-Zellen. Ergebnis der mikroskopischen Auszählung des Colony-Assays nach Transfektion der Zellen mit einem Leervektor (pcDNA_{3.1}, blaue Säule) und Δ AML1/ETO (delta-AML1/ETO, grüne Säule). Auch nach Entfernung der DNA-Bindungsdomäne im AML1-Anteil von AML1/ETO weiter bestehende Wachstumsrepression in AML1/ETO-Flt3-ITD doppelt positiven Zellen.

2.3 AML1/ETO inhibiert die Phosphorylierung von STAT5 in 32D-Flt3-ITD-Zellen

Anhand der beiden vorangegangenen Experimente hatte kein Hinweis auf eine Aufhebung oder ein Abschalten von durch die ITD-Mutation initiierten *transkriptionellen Programmen* durch AML1/ETO mit Hilfe seiner Repressorkapazität bestanden, so dass also auf diese Weise das Wachstum der Zellen nicht entscheidend beeinflusst worden war. Im Folgenden sollte daher die mögliche Interaktion des AML1/ETO-Proteins auf die durch die ITD-Mutation *aktivierten Signalkaskaden* analysiert werden. Dabei erschienen, durch die Ergebnisse in 2.1 und 2.2 angedeutet, insbesondere solche Signaltransduktionswege als richtungsweisend und geeignet für weitere Untersuchungen, die ausschließlich oder gesteigert durch die mutierte Form des Rezeptors aktiviert wurden.

Wie bereits ausführlich unter 1.2.1 beschrieben, stellt die Rekrutierung und Aktivierung von STAT5-Signalmolekülen ein Charakteristikum interner Tandemduplikationen des Flt3-Rezeptors dar. Durch Konzentration zweier elementarer Funktionen von cytosolisch-nukleoplasmatischer Signalweitergabe und Transkriptionskontrolle auf ein einziges Molekül stellt die STAT-Aktivierung eine wichtige Relaisstation dar, die daher als Ausgangs- und Angriffspunkt konkurrierender Signalkaskaden prädestiniert. Zentraler Schritt der STAT5-Aktivierung ist dessen Phosphorylierung durch den Flt3-ITD-Rezeptor (s. Abschnitt 1.2.1), die erst Dimerisierung, Translokation in den Nukleus und Transkriptionsregulation ermöglicht.

Um die Auswirkungen der Koexpression von Flt3-ITD und AML1/ETO auf der Stufe der STAT5-Aktivierung zu untersuchen, wurden aus unterschiedlich transient transfizierten 32D-ITD-Zellen Proteinlysate gewonnen, durch Immunpräzipitation mit einem Anti-STAT5-Antikörper aufgereinigt und der Einfluss der AML1/ETO-Expression auf den STAT5-Phosphorylierungsstatus im Western-Blot getestet. Zur Bestätigung des Transfektionserfolgs wurde GFP kotransfiziert. Das phosphorylierte STAT5 wurde mit einem spezifischen Anti-Phospho-STAT5-Antikörper detektiert. Das Verhältnis der oberen (phosphoryliertes STAT5) und unteren Bande (Gesamt-STAT5-Menge) in Spur 2 stellte Eich- und Bezugswert der STAT5-Phosphorylierung ausschließlich unter Flt3-ITD-Einfluss dar (s. Abb. 11). In Spur 1 war keine Bande zu

sehen, da GFP eine schnellere Laufgeschwindigkeit aufwies als GFP-gebundenes STAT5 und daher nicht auf der gleichen Höhe detektiert werden konnte. Dieses Experiment verdeutlichte, dass AML1/ETO den Phosphorylierungsgrad von STAT5 in Flt3-ITD-positiven Zellen beeinträchtigte (Spur 4, obere Bande), insbesondere angesichts einer größeren Gesamt-STAT5-Menge (Spur 4, untere Bande) als in den übrigen drei Transfektionen. Der Vergleich von Spur 4 mit Spur 3, die den Phosphorylierungsstatus bei Koexistenz von Flt3-ITD und AML1 widerspiegelte, zeigte die Spezifität der Interferenz durch AML1/ETO. Insgesamt stellte die Transfektion in Spur 3 den natürlichen Zustand mit nicht mutiertem AML1 dar.

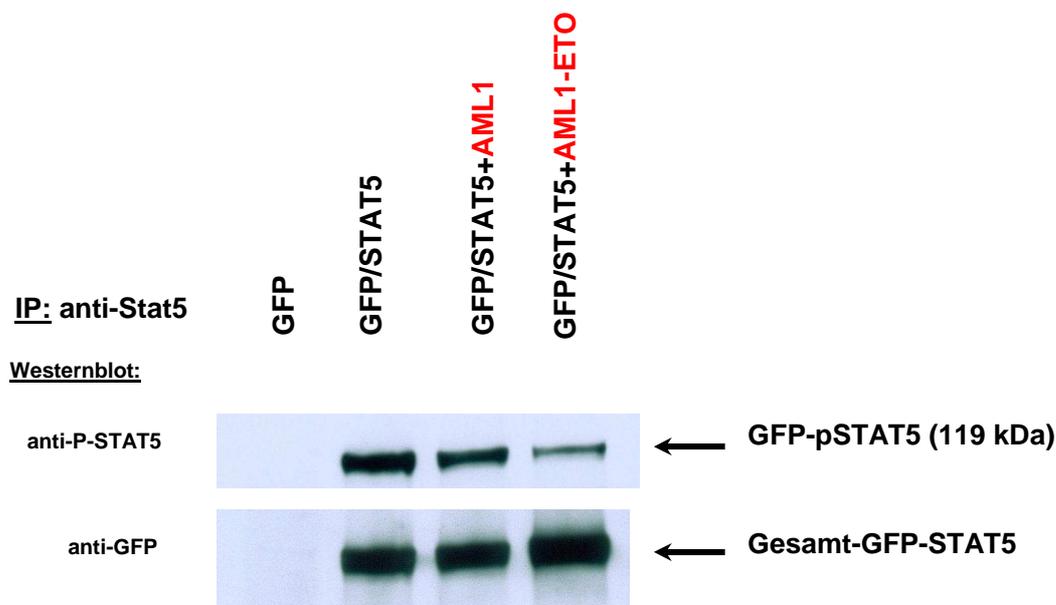


Abbildung 11: Spezifische Repression der STAT5-Phosphorylierung durch AML1/ETO in Flt3-ITD-positiven Zellen. Western-Blot Analyse von Proteinlysaten nach Transfektion von 32D-Flt3-ITD-Zellen mit o.g. Plasmiden, Immunpräzipitation mit anti-STAT5-Antikörper und Detektion mit Anti-P(hospho)-STAT5-Antikörper (obere Banden) und mit Anti-GFP-Antikörper (untere Banden).

2.4 AML1/ETO induziert ein spezifisches Verteilungsmuster von STAT5 in Flt3-ITD positiven Zellen

Mittels des vorangehenden Experimentes konnte die Beeinträchtigung der STAT5-Phosphorylierung durch AML1/ETO messbar gemacht werden. Entsprechend der Funktion von STAT5, nach Aktivierung zu dimerisieren und vom Zytoplasma in den Nukleus überzutreten, um dort seine transkriptionellen Aufgaben wahrzunehmen, sollten sich unterschiedliche Verteilungsmuster – je nach dem Aktivierungsgrad von STAT5 – in den Zellen nachweisen lassen. Um dieses Phänomen auch optisch objektivieren zu können, wurde das STAT5-Gen hinter die Sequenz des „Grün Fluoreszierenden Proteins“ (GFP) kloniert. Das somit entstandene Protein GFP-STAT5 konnte in blauem Fluoreszenzlicht im Konfokalmikroskop visualisiert werden. Es stellten sich charakteristische Verteilungsmuster unter unterschiedlichen Transfektionsbedingungen dar (Abb. 12). Das Pictogramm links oben zeigt eine einzelne Affennierenzelle (Cos7-Zellen), welche als additives genetisches Material Flt3-ITD und GFP enthielt. Das fluoreszierende Protein lagerte sich überwiegend cytoplasmatisch konzentriert an und Zellkern und andere Organellen wurden größtenteils ausgespart. Das Pictogramm rechts oben zeigt dann ein charakterisches Detail von Cos7-Zellen, in welche Flt3-ITD und GFP-STAT5 transfiziert wurden; dabei präsentierte sich bereits ein – auf die komplette Fläche der Zelle bezogen – homogeneres Verteilungsmuster. Dies korrelierte mit der physiologischen Funktion, da das STAT5-Protein als Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit von seinem prozentualen Aktivierungsgrad durch Flt3-ITD in den Nukleus übertreten musste. So ließ sich in diesem Fall ein durchschnittlicher Aktivierungsgrad vermuten.

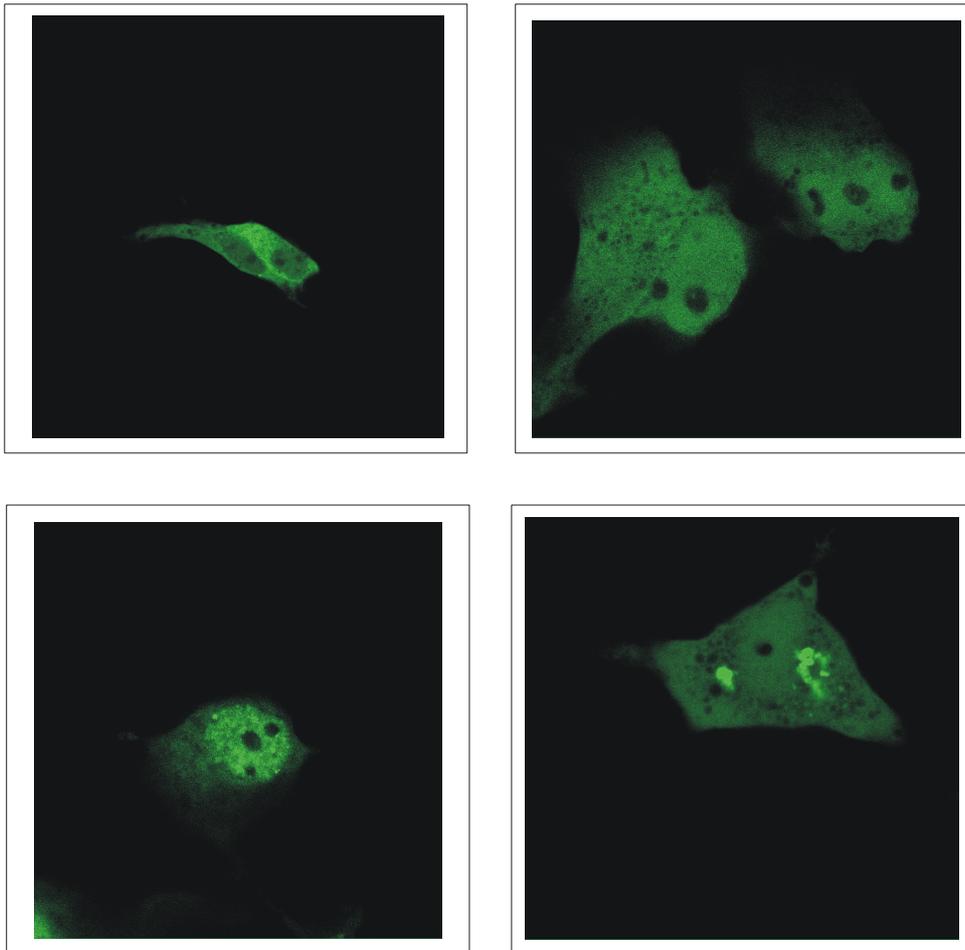


Abbildung 12: Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Dokumentation charakteristischer Verteilungsmuster von fluoreszierendem GFP-STAT5 reguliert durch Flt3-ITD und AML1/ETO in Cos7-Zellen. *Oben links:* Flt3-ITD plus GFP; *oben rechts:* Flt3-ITD plus GFP-STAT5; *unten links:* Flt3-ITD plus GFP-STAT5 plus AML1; *unten rechts:* Flt3-ITD plus GFP-STAT5 plus AML1/ETO.

Der Grad der Aktivierung erhöhte sich interessanterweise deutlich durch den Einfluss von AML1, da mehr STAT5-Moleküle rekrutiert und phosphoryliert wurden und dann dimerisieren konnten. Die Ergänzung der Transfektion um AML1 sollte einen regelhaften Zustand einer Flt3-ITD-Längenmutation ohne Translokation t(8;21) imitieren. Bei Kotransfektion von AML1 mit Flt3-ITD und GFP-STAT5 wurde der Transkriptionsfaktor als Zeichen der maximalen Aktivierung beinahe vollständig in den Nukleus verlagert (s. Abb. 12, Pictogramm links unten) und die fluoreszierende Dichte des GFP-STAT5-Komplexes war im Zytoplasma vermindert. In der vierten Transfektion sollte dann der ungewöhnliche Zustand konstruiert werden, in dem eine

Flt3-ITD-Längenmutation mit der Translokation t(8;21) – also AML1/ETO – zusammentraf. Da Cos7-Zellen kein STAT5 exprimieren, wurde auch hier wieder als Substrat für die Kinaseaktivität von Flt3-ITD GFP-STAT5 kotransfiziert. Verglichen mit dem vorausgegangenen Telexperiment zeigte sich nun eine weitgehende Aufhebung der gesteigerten Aktivierung und nukleären Lokalisation von STAT5 unter Flt3-ITD-Einfluss (s. Abb. 12, Pictogramm rechts unten), welcher sich im dritten Telexperiment (s. Abb. 12, Pictogramm links unten) und aus vorbekannten Daten (71) mittels anderer Methoden dargestellt hatte. Diese Veränderungen im Aktivierungsgrad von STAT5 und dem konsekutiven Übersetzen in den Nukleus mussten in diesem Fall auf die Koexistenz von AML1/ETO zurückgeführt werden und bestätigten damit auch optisch die bisherigen Ergebnisse aus den Colony-Assays und Phospho-Westernblots. Ein weiteres, typisches Verteilungsmuster der Cos7-Zellen, welche beide AML-typischen Mutationen gemeinsam enthielten, bestand in stark fluoreszierenden Konglomeraten in unmittelbarer Zellkernnähe.

2.5 AML1/ETO inhibiert dosisabhängig die DNA-Bindung von STAT5

Gemäß der physiologischen Funktion von STAT5, nach Aktivierung an STAT5-abhängige Promotoren von Genen zur Transkriptionskontrolle zu binden, sollte umgekehrt diese spezifische DNA-Bindung von STAT5 in AML1/ETO⁺-Flt3-ITD⁺-Zellen beeinträchtigt sein. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSAs) an Kernextrakten aus transient transfizierten COS7-Zellen durchgeführt. Anschließend wurde die Bindung von STAT5-Molekülen an ein radioaktiv markiertes STAT5-consensus Oligonukleotid überprüft. Wenn STAT5-Proteine an Oligonukleotide banden, durchwanderten diese Komplexe das Gel im elektrischen Feld langsamer und konnten an höher gelegenen Stellen im Gel wie in Abbildung 13 nachgewiesen werden. Nicht gebundene Oligonukleotide liefen schneller und wurden nicht abgebildet. Dieses Experiment bestätigte, dass STAT5 an sein DNA-Oligonukleotid gebunden hatte (Spuren 2-8). Da in Spur 1 COS7-Zellen nur mit der

Flt3-ITD-Mutation transfiziert wurden und diese Zellen selbst kein STAT5 exprimierten, zeigte sich hier keine radioaktive Aktivität. In Spur 3 erhöht sich das Signal STAT5-gebundener Oligonukleotide durch forcierte Aktivierung von STAT5 in dieser Zellpopulation durch Flt3-ITD. In Spur 4 schien die Bindung von STAT5 an das Oligonukleotid durch die Koexpression von AML1 abzunehmen; dieser Effekt war aber als nicht signifikant einzustufen. Ab Spur 5 zeigte sich nicht nur eine signifikante Reduktion der Interaktion des STAT5-Proteins mit seinem Oligonukleotid, sondern in den darauf folgenden Spuren 6 bis 8, dass diese Inhibition der STAT5-DNA-Bindung von der AML1/ETO-Dosis abhängig weiter forciert werden konnte.

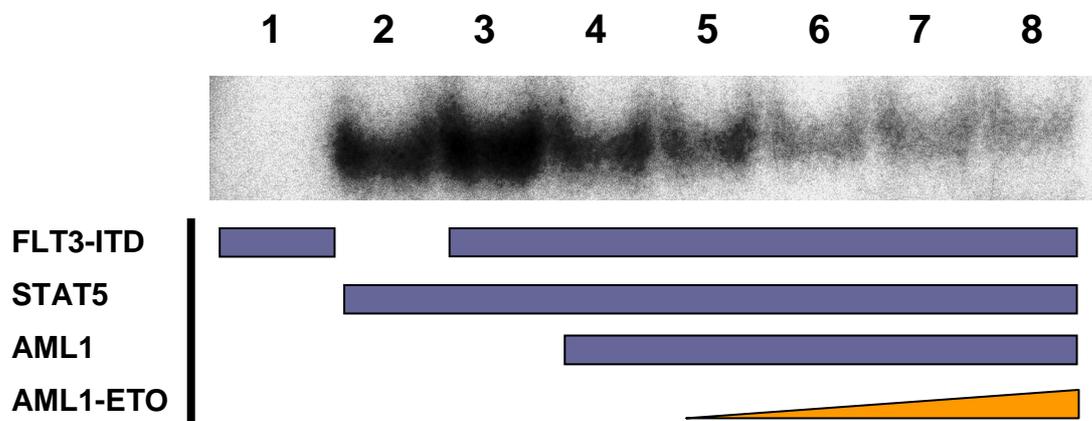


Abbildung 13: Electromobility shift assay (EMSA): Darstellung der AML1/ETO-abhängigen Repression der STAT5-Bindung an sein DNA-Oligonukleotid. Spur 1 zeigt kein Bindungssignal, da als Negativkontrolle kein STAT5 transfiziert wurde. Spur 2 entspricht der Positivkontrolle ohne und Spur 3 der Positivkontrolle mit Flt3-ITD-Aktivierungsverstärkung. Ab Spur 5 titrierbare Suppression der STAT5-DNA-Bindung durch AML1/ETO.

2.6 AML1-ETO reprimiert die Expression STAT5-abhängiger Zielgene auf mRNA und Proteinniveau

Unserer Modellvorstellung nach sollte die Beeinträchtigung der Phosphorylierung von STAT5 und die damit verbundene Reduktion seiner DNA-Bindung unter dem Einfluss von AML1/ETO zu einer verringerten Expression der Gene führen, die von der

transkriptionellen Aktivität der STAT5-Bindung abhängig waren. Durch CHIP- und Reverse-Transkriptase-PCR-Analysen konnten in der letzten Zeit zahlreiche Gene identifiziert werden, die unter der ITD-Variante des Flt3-Rezeptors induziert oder reprimiert werden. In der Gruppe der induzierten Gene fanden sich mit Pim-1, Pim-2, SOCS-2, SOCS-3, Cyclin D1, TCRgamma, Bcl-X_L und CIS-1 mehrere Gene, deren Regulationsmechanismus durch STAT5-Aktivität unter Flt3-ITD bestimmt wurde.

2.6.1 Repression von PIM-2 auf mRNA-Niveau

Pim-2 gehört mit Pim-1 und Pim-3 in eine Familie von Kinasen (29, 95, 105). Das Pim-2-Gen kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase, deren Transkription durch verschiedene hämatopoetische Cytokine reguliert wird (4, 26, 29, 105). Darüber hinaus konnte es als häufiger retroviraler Insertionsort in experimentell erzeugten Lymphomen identifiziert werden (105). Die Gruppe um Bin Yan konnte 2003 Pim-2 als Apoptose supprimierendes Onkogen charakterisieren (114). Aus diesen Gründen erschien Pim-2 exemplarisch als geeignet, die Konsequenzen der STAT5-Inhibition für die transkriptionelle Regulation auf der Ebene der mRNA-Synthese weiter zu untersuchen. Dazu wurden 32D-Zellen, die den Flt3-Wildtyp-Rezeptor (Flt3-WT) trugen, und 32D-Zellen mit der ITD-Mutation des Rezeptors mit AML1 und AML1/ETO transfiziert. Ebenso wurden alle Zellen mit GFP kotransfiziert, um im anschließenden FACS-Sorting die positiv-transfizierten Zellen selektionieren zu können. Aus den Lysaten der positiven sortierten Zellen wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels Real-Time-PCR wurden Pim-2 als „gene of interest“ sowie als Standardisierung ein „house-keeping-gene“, in diesem Fall GAPDH, gemessen. Da es sich hierbei um eine semiquantitative Methode handelte, mussten die ermittelten Probenwerte auf einen Referenzwert bezogen werden – so geschehen bei dem jeweiligen Zelltyp, der lediglich mit GFP transfiziert worden war (s. Abb. 14, hellblaue Säulen). Das Experiment belegt eine deutliche Reduktion der Pim-2 Expression in 32D-Flt3-ITD-positiven Zellen, die mit GFP und AML1/ETO transfiziert worden waren und bestätigte damit, dass sich die Interferenz von AML1/ETO in die STAT5-Phosphorylierung bis auf die Transkriptionsebene der STAT-abhängigen Gene auswirkte. Alle übrigen Transfektionen waren nicht signifikant moduliert.

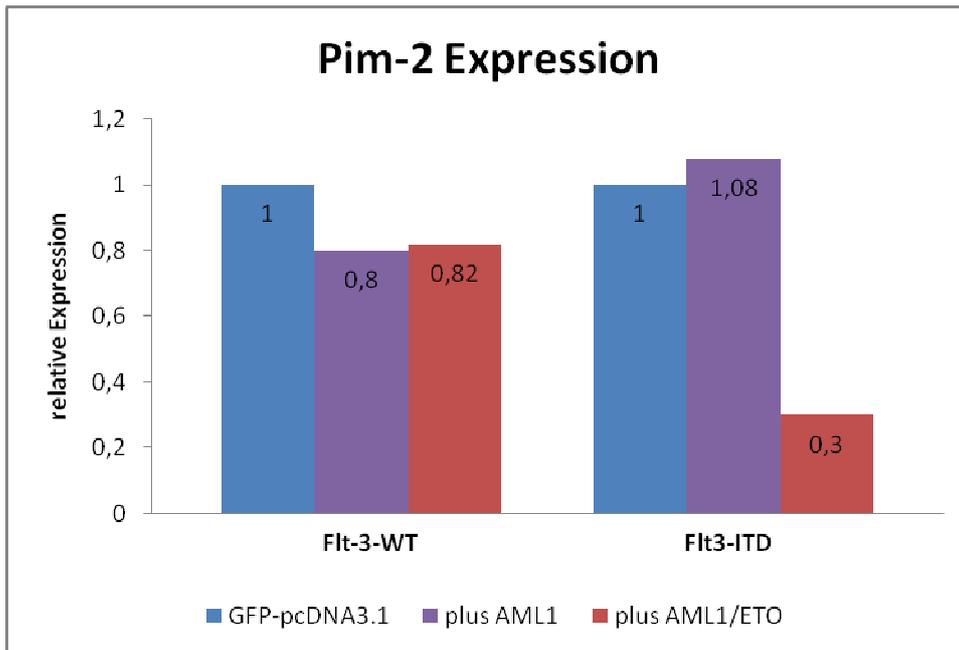


Abbildung 14: AML1/ETO-induzierte Pim-2 Repression auf mRNA-Ebene in Flt3-ITD-positiven Zellen.

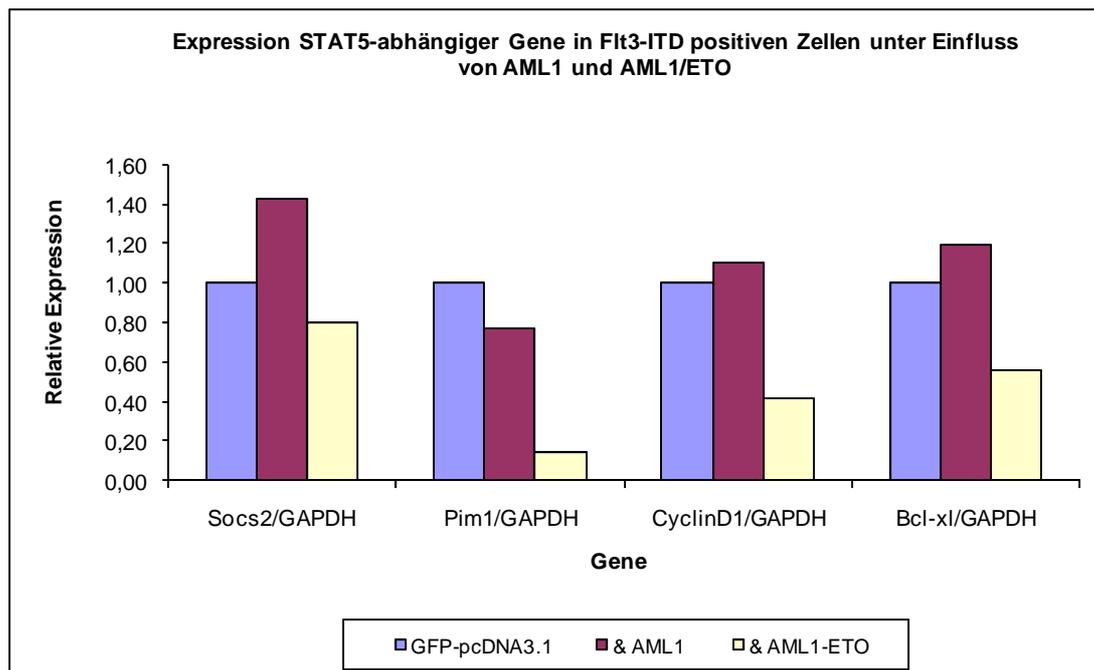
Relative Expressionswerte aus Real-Time-PCR-Versuchen, in denen isolierte mRNA von transfizierten 32D-Flt3-WT- und 32D-Flt3-ITD-Zellen mit GFP, GFP+AML1 und GFP+AML1/ETO amplifiziert worden sind. Die Expression in GFP-transfizierten Zellen wurde als Referenz der Wert 1 zugeordnet und die übrigen Resultate dazu in Beziehung gesetzt.

2.6.2 Repression weiterer STAT5-abhängiger Gene unter AML1/ETO

Nachdem für das Pim-2-Gen eine offenkundige negative Regulation unter AML1/ETO im unter Flt3-ITD aktivierten Zustand gegenüber der Wildtypform nachgewiesen werden konnte, wurden die übrigen erwähnten Gene, sowie ein weiteres Mal Pim-2, mittels Real-Time PCR lediglich in den die Rezeptormutation tragenden Zellen untersucht. Die Abbildungen 15 A und B geben die auf GAPDH-adjustierten relativen Expressionshöhen der jeweiligen Primärtranskripte wider. Ein unbeeinflusster Referenzwert der jeweiligen Genexpression wird durch die Transfektion mit GFP als „Leervektor“ repräsentiert. Anhand beider Graphiken ließ sich erneut konstatieren, dass die Koexistenz von AML1/ETO und Flt3-ITD eine Interaktion mit transkriptioneller Repression STAT5-abhängiger Sequenzen bewirkte. In dieser Konstellation des transfizierten genetischen Materials waren die Expressionsgrade der entsprechenden STAT5-abhängigen Gene auf die Hälfte bis zu einem Zehntel des Referenzwertes (GFP-Transfektion, hellblaue Säulen) reduziert. Zudem wurde die relative Expression dieser Gene unter AML1 nicht reguliert. Die um den Referenzwert pendelnden Genexpressionsdaten in den AML1-Subgruppen waren am ehesten der Darstellung einer semiquantitativen Methode geschuldet. Eine Ausnahmeposition nahm jedoch die Probe um das SOCS-3-Gen ein, in der sich die Expression in Gegenwart von AML1 um das fast vierfache steigern ließ.

Mit Hilfe dieses Experimentes war es nun in dieser Modellreihe zum ersten Mal gelungen aufzuzeigen, dass sich die funktionelle Beeinträchtigung der STAT5-Aktivität bis in die transkriptionelle Phase fortsetzte.

A



B

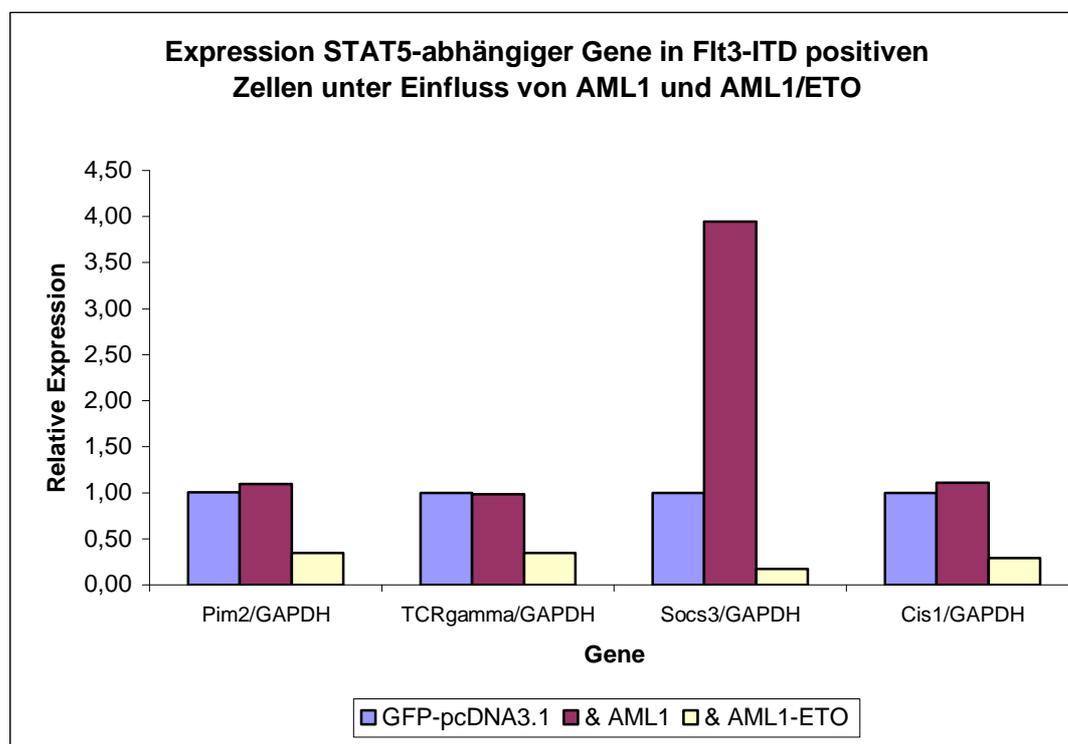


Abbildung 15 (A und B): AML1/ETO reprimiert das Expressionsniveau STAT5-abhängiger Gene in Flt3-ITD positiven Zellen. Darstellung gemittelter Ergebnisse jeweils dreier unabhängiger Experimente und Erfassung relativer Expressionsniveaus in Beziehung zum Housekeeping-Gen GAPDH.

2.6.3 Repression von CIS-1 auf Protein-Niveau

Der nächste Schritt, weitere Konsequenzen der Beeinträchtigung der transkriptionellen STAT5-Funktion durch AML1/ETO aufzuzeigen, bestand im Nachweis von Veränderungen auf Proteinebene der STAT5-regulierten Gene. Wie unter 2.5 beschrieben gehörte auch das CIS-1 Gen in diese Gruppe. CIS-1 gehört in die Familie der durch Cytokine induzierbaren, eine SH₂-Domäne enthaltenden Proteine und ist ein *downstream-target* des bekannten JAK/STAT-Signalweges (23). Ich untersuchte das Expressionsverhalten von CIS-1 in 32D-Flt3-ITD-Zellen unter dem Einfluss von unterschiedlichen transfizierten Genen, darunter pcDNA_{3.1} als Leer- und Kontrollvektor, AML1 und AML1/ETO. Auch diese Transfektionen enthielten zusätzlich das GFP-Plasmid, um im FACS-Sorter eine Selektion der positiv transfizierten Zellen zu ermöglichen. Ausschließlich aus diesen Zellen wurden Lysate hergestellt, diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine im Western-Immunoblot detektiert. Abbildung 16 zeigt den erheblichen Rückgang der CIS-1-Expression bei Koexistenz von Flt3-ITD und AML1/ETO, während die Gesamtmenge der exprimierten Proteine in allen drei Spuren, durch die gleiche Verteilung des Housekeeping-Gens Aktin angezeigt, vergleichbar hoch war. Dieser Versuch verdeutlichte, dass die Auswirkungen der Koexistenz von Flt3-ITD und AML1/ETO sich bis auf das schlussendliche Proteinniveau STAT5-abhängiger Gene weiterverfolgen ließen, und unterstrich damit die funktionell zentrale Stellung des STAT5-Moleküls in der wachstumshemmenden Wirkung bei Koexpression von Flt3-ITD und AML1/ETO.

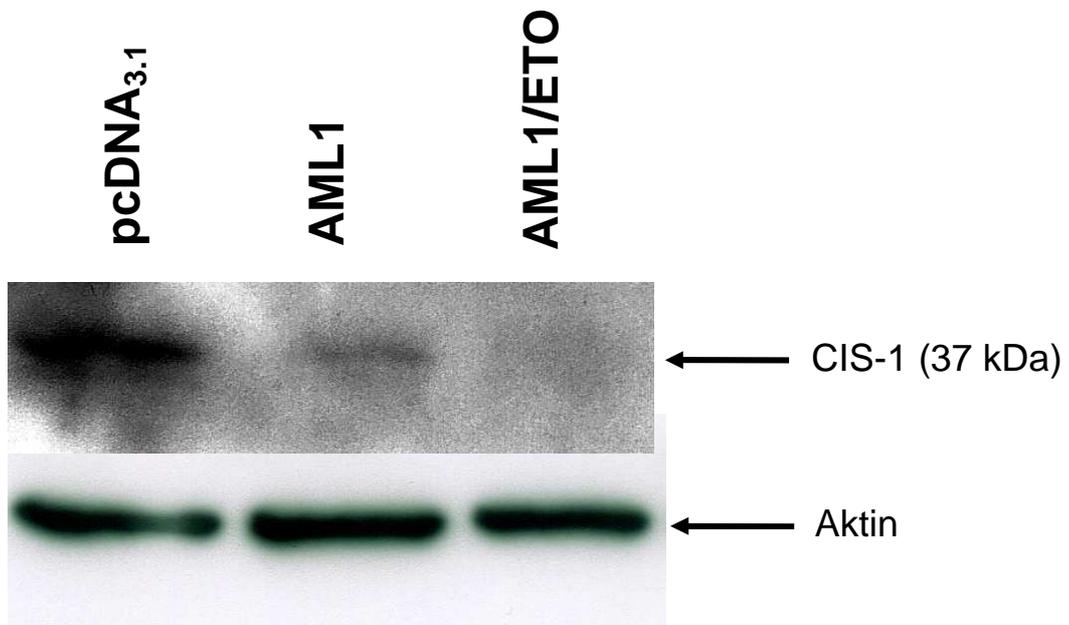


Abbildung 16: AML1/ETO-induzierte Repression der CIS-1-Expression in Flt3-ITD-Zellen. Proteinlysate von transfizierten 32D-Flt3-ITD-Zellen nach oben dargestellter Transfektion mit GFP, AML1 und AML1/ETO, FACS-Sorting und Dedektion im Immunoblot durch Anti-CIS-1-Antikörper.

3 Diskussion

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten veröffentlichte Daten über die Häufigkeit von Mutationen in der akuten myeloischen Leukämie (91). In dieser Auswertung wurde deutlich, dass die beiden häufigsten genetischen Abberationen, die Translokation t(8;21) und die ITD-Längenmutationen des Flt3-Wachstumsfaktorrezeptors, nur in den wenigsten Fällen gemeinsam auftreten. Dagegen war eine andere Translokation, die charakteristische Aberration der akuten Promyelozytenleukämie, t(15;17) mit dem Genprodukt PML-RAR α , deutlich häufiger mit der ITD-Mutation vergesellschaftet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten erstmalig, welche biochemischen und molekulargenetischen Mechanismen diesem klinisch beobachteten verminderten gemeinsamen Auftreten von AML1/ETO und Flt3-ITD zugrunde liegen.

Dabei waren biochemisch zwei theoretische Ansatzpunkte *a priori* denkbar. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass die eine Mutation während der Leukämogenese eine „protektive“ Wirkung auf die Zelle vor dem Erwerb der anderen Mutation entfaltete. Zum anderen könnte das reduzierte gemeinsame Vorkommen eben dieser beiden Mutationen durch eine Interferenz der intrazellulären Signalkaskaden hervorgerufen werden.

Innerhalb der letzten Jahre formierte sich in der Leukämieforschung immer deutlicher die Erkenntnis, dass die früher so strikten Grenzen der Zuordnungen – von Wachstumsfaktorrezeptormutationen zu Änderungen der Proliferationseigenschaften und von Translokationen mit Transkriptionsfaktoren zu Differenzierungsblockaden der malignen Zellen – bereits viele funktionelle Überlappungen zeigten. Darüber hinaus mehrten sich die Hinweise, dass wir den strukturellen Gedanken von linearen Signaltransduktionswegen zugunsten einer interaktiven Verzahnung mit der Ausbildung komplexer Netzwerke der unterschiedlichen Mutationsklassen verlassen mussten. Dies konnte zum Beispiel für AML1/ETO und Flt3-ITD und ihre Einflussnahme auf den Wnt-Signalweg bereits gezeigt werden ((102); weitere Details s.Abschnitt 1.3). Aus diesen Gründen untersuchte ich zunächst die Hypothese einer gegenseitig negativen intrazellulären Interaktion von AML1/ETO und Flt3-ITD.

Im ersten Teil der Arbeit konnte ich mittels Colony Assays nachweisen, dass AML1/ETO/Flt3-ITD-doppelt positive Zellen einen deutlichen Wachstumsrückstand

aufwiesen und in signifikanter Weise weniger Kolonien bildeten. Zellen, die mit dem Wildtyprezeptor Flt3 und AML1/ETO kotransfiziert worden waren, zeigten hingegen eine begünstigte Wachstumsrate, deren Erklärung möglicherweise in der AML1/ETO induzierten Repression von p14^{ARF} (62) oder Aktivierung von Bcl-2 (6, 53) zu finden war und damit durch verringerte Apoptose zum leukämogenen Potenzial der Translokation t(8;21) beitrug. Dieses Experiment verdeutlichte darüber hinaus, dass der mögliche toxische *in vitro* Effekt von AML1/ETO hier weniger von Bedeutung war (15). Weiterhin existierten Daten, welche die Entstehung einer einem myeloproliferativen Syndrom ähnelnden Erkrankung durch AML1/ETO beschrieben (30). An dieser Stelle muss ebenfalls erwähnt werden, dass der mehrmalige Versuch, eine stabile Zelllinie, welche AML1/ETO und Flt3-ITD exprimiert, zu etablieren, aufgrund raschen Zellunterganges scheiterte. So bleibt zu diskutieren, ob die Zellen der dokumentierten zwei Kolonien, welche in unserem Experiment verzeichnet worden waren (s. Abb. 8A), schlussendlich überhaupt beide transfizierten Plasmide inkorporiert hatten oder sie überhaupt exprimierten. Eine Untersuchung der Zellen dieser zwei Kolonien zum Beispiel mittels Western-Immunoblot auf eine wirkliche Doppelexpression beider Plasmide in diesen Zellen war aufgrund der Unmöglichkeit der Etablierung einer stabilen Zelllinie nicht möglich. Der gleiche experimentelle Ansatz mit einer Deletionsmutante von AML1/ETO, der die DNA-Bindungsdomäne fehlte, bestätigte die Unabhängigkeit der Wachstumsrepression von der AML1/ETO-Funktion als Transkriptionsfaktor. Dieser Unabhängigkeitsnachweis von der transkriptionellen Fähigkeit implizierte zugleich eine andersartige, physikalische Interaktion von AML1/ETO mit der Wirkung von Flt3-ITD (siehe weiter unten).

Wie bereits veröffentlichte Daten zeigten, bestand ein wesentlicher Unterschied der intrazellulären Signaltransduktion in Zellen der ITD-Längenmutation innerhalb des Flt3-Rezeptorgenes im Vergleich zu Zellen, die den Wildtyprezeptor trugen, in der deutlich gesteigerten Aktivierung von STAT5 durch Phosphorylierung ((19, 71); s. auch Abschnitt 1.2.1). In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den Colony-Assays musste dieser differentiellen STAT5-Aktivierung unter ITD-Einfluss eine zentrale Regulationsstellung und damit verbunden eine Interaktionsposition mit erheblichen Konsequenzen eingeräumt werden (70, 71). In Western-Immunoblotanalysen mit einem

Antikörper, der die phosphorylierten Tyrosinreste erkannte, war es gelungen, mit STAT5 ein zentrales Molekül des Flt3-ITD-Signaltransduktionsweges zu identifizieren, dessen Aktivierungsgrad und damit die zu vermittelnde proliferative Wirkung durch die Beeinträchtigung seines Phosphorylierungsstatus unter Einfluss der AML1/ETO-Translokation reduziert wurde (siehe Abschnitt 2.3, Abb. 12, Spur 4). Auch konnte durch den Vergleich mit der Kotransfektion Flt3-ITD/AML1 dieses Ergebnis als ein spezifisch durch AML1/ETO ausgelöstes Phänomen dargestellt werden. Nachdem transkriptionelle Regelmechanismen nach den vorangegangenen Ergebnissen in den Colony Assays, welche die Unabhängigkeit der Wachstumsrepression von der DNA-Bindung mittels der AML1/ETO-Deletionsmutante dargestellt hatten, unwahrscheinlich waren, stellte sich an diesem Punkt die Frage nach den Möglichkeiten der Beeinflussung der Phosphorylierung. Eine physikalische Interaktion von AML1/ETO mit STAT5 wäre hierbei auf einem direkten und einem indirekten biochemischen Wege möglich gewesen. Die Literatur beschrieb bereits beobachtete direkte physikalische Interaktionen von AML1/ETO mit c/EBPa (11, 32, 82). Die durch die Colony-Assays aufgezeigte Selektivität der Wachstumsinhibition für AML1/ETO – im Gegensatz zu AML1 – musste die Überlegung auch auf den translozierten ETO-Anteil des Translokationsproduktes lenken. Dabei war an neue Bindungs- und Interaktionsmöglichkeiten durch ETO selbst, die Änderung der Konformation von AML1 durch ETO oder das Fusionsprodukt als solches zu denken. Auf dem indirekten Wege hätte es sicherlich mehrere Optionen gegeben, am Ende einen reduzierten Tyrosin-Phosphorylierungsstatus von STAT5 zu erreichen. Angesichts der multipel im Cytoplasma vorhandenen Phosphatasen, Kinasen und dem enzymatisch aktiven Flt3-Rezeptor selbst, waren koenzymähnliche oder allosterische Regulationsmechanismen dieser Biokatalysatoren durch AML1/ETO denkbar. Diese Kinasen schlossen nicht nur die Tyrosin- sondern auch die Serinkinasen mit ein, da 1997 Chung et al. hatten beweisen können, dass die Tyrosinphosphorylierung von STAT-Proteinen durch eine negative Beeinträchtigung der Serinphosphorylierung verhindert werden konnte (21). Diese Vielzahl von Optionen wurde ebenfalls durch ETO und die damit verbundenen Rekrutierungsmöglichkeiten weiterer Faktoren wie Sin3 und NcoR und intrazellulärer Katalysatoren ergänzt.

Zur Austestung einer direkten Interaktion wurden mehrmals Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) zwischen AML1/ETO und STAT5 und anschließende Westernblotanalysen durchgeführt, die jedoch aufgrund von verfahrenstechnischen Problemen keine richtungsweisenden Ergebnisse lieferten. Zur Beurteilung indirekter Interaktionen wären alternative Experimente wie Phosphatase-Assays oder Co-IPs zwischen AML1/ETO und den erwähnten Kinasen und Phosphatasen zu erwägen. Ziel der Co-IPs sollte die Identifikation von möglichen Bindungspartnern von AML1/ETO sein, die in der Folge den geminderten STAT5-Phosphorylierungsstatus bewirkten. Ein Phosphatase-Assay wird eine Antwort auf die Frage geben, ob es sich bei dem Resultat einer verminderten Aktivierung von STAT5 um eine Induktion von Phosphatasen oder um eine reduzierte Kinaseleistung handelte.

Interessanterweise fanden Matsuno et al. in einer kleineren Studie an AML M0-Patienten heraus, dass inaktivierende Mutationen im AML1-Gen die Empfänglichkeit zum Erwerb einer sekundären Flt3-Mutation erhöhen (68). Jedoch konnten bei diesen Patienten lediglich Fälle von Punktmutationen mit Frameshift aber nicht ein Fall einer Beteiligung von AML1 im Sinne einer Translokation t(8;21) beschrieben werden. So ließ sich für AML1/ETO in Zusammenschau mit den *in-vitro*-Ergebnissen der Colony-Assays durch den oben geschilderten Mechanismus des verminderten Phosphorylierungsstatus von STAT5 eine hinsichtlich der Leukämogenese sogar protektive Funktion postulieren, die das sekundär leukämogene Potential einer inaktivierenden AML1-Mutation überkompensierte. Denn erstens erhöhte AML1/ETO offenbar nicht das Risiko eines sekundären Erwerbs einer Flt3-Längenmutation – trotz bekanntermaßen inaktivierter AML1-Funktion. Und zweitens zeigte sich aufgrund der messbaren Wachstumsinhibition von AML1/ETO-Flt3-ITD doppelt positiven Zellen, dass der positive Wachstumsvorteil einer alleinigen Flt3-ITD-Mutation durch die negative Beeinflussung ihres down-stream-Signaltransduktionsweges nicht nur aufgehoben sondern sogar umgekehrt wurde.

In den sich anschließenden Experimenten wurden die funktionellen Konsequenzen der reduzierten STAT5-Aktivierung untersucht. Die Phosphorylierung der STAT-Proteine ist die Grundvoraussetzung für deren Dimerisierung und Übertritt in den Nucleus, wo sie ihre transkriptionelle Aktivität entfalten können. In Lokalisationsexperimenten mittels Konfokalmikroskopie, in denen das intrazelluläre Lokalisationsverhalten von

STAT5 unter Koexpression von Flt3-ITD, AML1 und AML1/ETO untersucht wurde, konnte ich erste morphologische Hinweise für eine Bestätigung der verringerten STAT5-Aktivierung dokumentieren. Während sich unter Anwesenheit von Flt3-ITD und AML1 der relativ größere Teil von fluoreszierendem, GFP-markiertem STAT5 intranukleär befand, zeigte sich in Kombination mit AML1/ETO anstatt AML1 eine extranukleäre oder cytoplasmatische Konglomeratbildung von STAT5-Molekülen. Diese jeweiligen morphologischen Eigenarten boten sich keineswegs ubiquitär, jedoch zumindest im Vergleich mit den jeweils übrigen Transfektionen als charakteristisch unterschiedlich dar, so dass hier auch bei geringen Quantitätsunterschieden die qualitativen Charakteristika als richtungsweisende Befunde angesehen werden konnten. Hinsichtlich der beobachteten Konglomerate um den Nukleus bei Koexistenz der Mutationen und GFP-STAT5 konnte auch hier erneut die Frage einer physikalischen Interaktion von GFP-STAT5 und AML1/ETO aufgeworfen werden. In einem weiteren Experimenttyp konnte diese verminderte nukleäre DNA-Bindung von STAT5 unter AML1/ETO-Einfluss im Electrophoretic Mobility Shift Assay bestätigt werden. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt durch die eingesetzte AML1/ETO-Menge titrieren; es bestand somit ein klares Dosis-Wirkungsprinzip, das die Vorstellung einer möglichen physikalischen Interaktion mit STAT5 weiter untermauerte. Die ebenfalls unter AML1 scheinbar reduzierte DNA-Bindung von STAT5 war angesichts der Genauigkeit der Methode als noch nicht signifikant zu bezeichnen. Eine wirkliche Einflussnahme von AML1, die nach Hinzuziehen der Ergebnisse aus den restlichen Experimenten eher unwahrscheinlich war, könnte durch einen Versuch mit Titration der AML1-Mengen ausgeschlossen werden.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den molekulargenetischen Auswirkungen der nachgewiesenen Interferenz von AML1/ETO auf die STAT5-vermittelte Flt3-ITD-Funktion, welche zu den funktionellen Resultaten regredienter Proliferationsraten bis zur Wachstumsinhibition führten. Die Ergebnisse dieses Teils belegten die alterierte, STAT5-abhängige, genetische Regulation. Dabei richtete sich zunächst das Augenmerk auf die unmittelbare transkriptionelle Wirkung von STAT5 unter den beschriebenen molekularen Beeinflussungen. Mit Hilfe der RT-PCR wurden bekannte, von der transkriptionellen Aktivität von STAT5 abhängige Gene hinsichtlich ihrer Expression in

32D-Flt3-ITD positiven Zellen in Reaktion auf AML1 und AML1/ETO untersucht. Als erstes wurde exemplarisch die Expression des Apoptose supprimierenden Onkogens Pim-2 analysiert. Während sich in Zellen mit der Wildtyprezeptorvariante keine regulativen Veränderungen zeigen ließen – am ehesten da erst gar keine höhergradige STAT5-Rekrutierung erfolgte –, konnten nach Expression der Flt3-ITD-Variante die Folgen der STAT5-Inhibition auf transkriptioneller Ebene weiter nachvollzogen werden. Die Pim-2-Expression wurde unter dem Einfluss von AML1/ETO auf 30% der Referenzaktivität reduziert. Im Weiteren wurden Analysen sieben weiterer STAT5-abhängiger Gene in Flt3-ITD-Zellen durchgeführt. In allen Fällen wurde eine deutlich verminderte Expression gemessen, die zwischen einem Zehntel und der Hälfte der Grundaktivität betrug. Interessanterweise fanden sich unter den STAT5-abhängigen Genen vor allem solche, welche regulatorische Komponenten im Zellzyklus (z. B. Cyclin D1), der Verhinderung der Apoptoseaktivierung (z. B. Bcl-X_L, Pim-2) und der Proliferation von Zellen darstellten. Da deren Expression unter AML1/ETO deutlich supprimiert wurde, fand sich hier ein plausibler Ansatz zur Erklärung des Wachstumsrückstandes AML1/ETO-Flt3-ITD doppelt positiver Zellen im Colony-Assay und bot damit auch eine logische Grundlage zur Deutung der klinischen Daten um Schnittger et al., die nur Einzelfälle doppelt positiver Leukämien beschrieben. An dieser Stelle wäre sicherlich die Kenntnis weiterer Details interessant gewesen, zum Beispiel ob diese Leukämien mit geringer oder gar keiner Leukozytose einher gingen oder auch ob sie über diese sich neutralisierende Doppelmutation hinaus weitere genetische Aberrationen aufwiesen, welche die Leukämogenese wieder vorantrieben.

Die Konsequenz herunterregulierter STAT5-abhängiger Gene unter AML1/ETO ließ sich auf der Stufe des synthetisierten Proteins nachvollziehen. Dabei waren insbesondere die durch die RT-PCR-Analysen untersuchten Gene von besonderer Bedeutung, um zu prüfen, ob eine verminderte Menge der transkribierten mRNA auch in einer verminderten Bildung des entsprechenden Proteins resultierte oder die Zellen versuchten, durch gesteigerte translationelle Mechanismen der mRNA die eigentliche Proteinmenge beizubehalten. Eine Bestätigung, dass die verringerte Transkription des jeweiligen Gens auch zu einer quantitativen Reduktion der Proteinmenge führte, gelang im Falle des CIS-1-Proteins mittels Western-Blot-Analyse, wobei die Blots aus apparativ-technischen Gründen nur sehr schwierig anzufertigen waren. Möglicherweise

hing dies mit der letztlich nur sehr geringen Anzahl sowohl positiv transfizierter und die Elektroporation überlebender Zellen zusammen, welche zuvor durch FACS-Sorting selektiert worden waren. Darüber hinaus mussten nach Transfektion bis zur Lyse längere Inkubationszeiten gewählt werden, um wirklich eine Umstellung des transkriptionellen und translationellen Regelungsprogrammes unter AML1/ETO und Flt3-ITD nachweisen zu können. So ließ sich die verminderte Bandenbreite der CIS-1-Fraktion unter AML1-Kotransfektion als Folge vermehrten Zellunterganges nach Elektroporation erklären. Später vorgenommene Untersuchungsreihen mit diesem Anti-CIS-1-Antikörper zeigten zudem eine nur mäßige Antikörperbindungsfunktion. Auch verglichen mit den Resultaten der RT-PCR der CIS-1-mRNA-Level wäre eine signifikant verminderte Proteinkonzentration unter AML1 inkongruent gewesen. Ein weiterer theoretischer Ansatz für eine Erklärung ergab sich aus den Daten von Matsumoto, der eine Induktion von CIS durch STAT5 beschrieb, was jedoch zu einer verstärkten Inaktivierung von STAT5 und damit zur rückwirkenden reduzierten Aktivierung von CIS führte (67). In jedem Falle signifikant war die deutliche Verminderung des CIS-1-Proteingehaltes in Kotransfektion mit AML1/ETO bei verglichen äquivalenter Aktinmenge.

Zur Bestätigung, dass solche regulativen Vorgänge auch für die übrigen STAT5-abhängigen Gene galten, wurden auch Versuche von Westernblotanalysen mit Antikörpern gegen Pim-2, SOCS-3 und Bcl-X_L unternommen. Aus technischen Gründen konnten hier trotz mehrmaliger Versuchsansetzung keine verwertbaren Daten erhoben werden. Bezüglich des Pim-2-Proteins bildeten am ehesten unspezifische Bindungen von Antigenen mit dem von uns verwendeten Antikörper die Grundlage der technischen Schwierigkeiten. Es fanden sich jedoch veröffentlichte Daten über äquivalent korrelierende mRNA-Level mit der Bandenbreite im Westernblot von der Gruppe der Pim-2-Beschreiber um Bin Yan (114), so dass auch hier nach den Ergebnissen aus den PCR-Versuchen mit Pim-2-mRNA auch kongruente Verläufe im Westernblot zu erwarten gewesen wären.

2005 veröffentlichte die Münchner Leukämie-Forschungsgruppe um Prof. Hiddemann konträre Ergebnisse zu AML1/ETO-Flt3-ITD doppelt positiven Zellen. Sie zeigten eine synergistische Wirkung in der Leukämogenese bei ca. 8% der Fälle (88). *In vitro* hatten

diese Zellen einen 6,5-fachen Wachstumsvorteil, die AML1/ETO-Monotransfektion zeigte das erwartete myeloproliferative Syndrom, während die Flt3-ITD einfach transfizierten Zellen – im Kontrast zu den Kelly-Daten (s.o., (50)) – keinen Wachstumsvorteil boten. In der Doppeltransfektionsgruppe war im Gegensatz zu unseren Ergebnissen die Proliferationsaktivität gleichermaßen von der DNA-Bindungsdomäne von AML1/ETO und der ITD-Kinasekapazität abhängig. Zudem bestand kein Anhalt einer Interferenz beider Mutationen. Diese doppelt transfizierten Zellen wurden in Mäuse in ein *in vivo*-Modell überführt. Es bildeten sich nach ca. neun Monaten Latenz allesamt akute, jedoch immunphänotypisch zu fast gleichen Anteilen, myeloische, lymphatische und biphänotypische Leukämien aus. Auch Yuan et al. beschrieben eine myeloische und eine lymphatische Leukämie-Entwicklung bei AML1/ETO positiven Mäusen nach Behandlung mit Nitrosourea (118).

Drei Gründe ließen sich für diese entgegengesetzten Resultate im Vergleich zu unseren Daten bei Verwendung der gleichen Mutationen nennen: Erstens erfolgte in der Arbeit von Schessl die Transfektion mittels Retroviren, der sich eine ^{137}Cs γ -Bestrahlung mit 40 Gy anschloss. Zweitens bestand eine lange Latenzphase zwischen Transplantation und klinischer Ausprägung der Leukämien. Beide Punkte bargen nach Instabilisierung des Genoms durch die genannten Maßnahmen das hohe Risiko, weitere leukämogene Aberrationen zu erwerben. Drittens, und dies war der wichtigste Aspekt, wurden Zellen unterschiedlicher Reifungsstufen und Differenzierungsmöglichkeiten verwendet, im speziellen eine myeloisch vordifferenzierte Zelllinie (32-D) und primäre, hämatopoetische Progenitorzellen mit größerer Pluripotenz.

In diesem Zusammenhang schien der genetische Background einer Zelle, gleichzusetzen mit dem aktivierten genetischen Programm, zum Zeitpunkt des Erwerbs von leukämogenen Aberrationen von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies bestätigten für die Flt3-ITD-Mutation und der Induktion eines möglichen myeloproliferativen Syndroms die Arbeiten von Kelly und Ono (50, 81). Bezogen auf AML1/ETO dokumentierten zahlreiche Arbeiten ein breites phänotypisches Spektrum dieser Mutation, welches bei einem myeloischen Differenzierungsblock begann (11, 17, 32, 82) und sich über letale Verläufe *in vivo* durch vollständige Aplasie des blutbildenden Knochenmarkes bis hin zur normalen Hämatopoese und zu den myeloproliferativen Syndromen erstreckte (43, 118). Untermauert wurde die Wichtigkeit des jeweiligen

genetischen Hintergrundes in einer aktuellen Arbeit über die JAK2-Mutation (JAK2-V617F) bei den myeloproliferativen Erkrankungen. Hier konnten Wernig und Gilliland von der Mayo-Klinik an unterschiedlichen Mausstämmen zeigen, dass die immer gleiche eingesetzte JAK2-Mutation zu unterschiedlichen Phänotypen eines myeloproliferativen Syndroms im Sinne der bekannten Qualitäten (PV, IMF, ET) führen konnte (111).

So lässt sich resümierend sagen, dass in dieser Arbeit erstmalig Daten erhoben werden konnten, die eine plausible Erklärungsgrundlage für die klinische Gegebenheit eines nur sehr geringen Aufkommens von AML1/ETO-Flt3-ITD doppelt positiven Leukämien liefern. Mit der Entdeckung eines zunehmend dephosphorylierten STAT5-Status in artifiziell geschaffenen myeloischen Zellen – als Träger beider Mutationen – stellt STAT5 einen weiteren Vernetzungsbaustein zweier gänzlich differenter, intrazellulärer Mechanismen dar. Die Ergebnisse heben auch – gemessen an dem erheblichen Wachstumsrückstand bei Doppelmutation – die Rolle von STAT5 als elementarer Konduktor des Überlebenssignals Flt3-ITD positiver 32D-Zellen hervor. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die unmittelbaren Konsequenzen der STAT5-Dephosphorylierung von einem geringeren Übersetzen in den Nukleus, das auch optisch dargestellt werden konnte, und einer geringeren Bindung an die entsprechende DNA-Promotorsequenz über eine reduzierte transkriptionelle Aktivität bis zur entsprechenden Verminderung der Expression abhängiger, die Proliferation fördernder Gene erstrecken. Dieses Phänomen wird hochwahrscheinlich durch einen physikalischen Interaktionsmechanismus von AML1/ETO initiiert. In Zukunft offenbart sich nach konkreter Aufklärung dieses biophysikalischen Vorganges, in Anlehnung an die AML1/ETO-Funktion in diesem Szenario mit STAT5, die Option auf einen neuen medikamentösen Angriffspunkt in Flt3-ITD positiven Leukämien. Darüber hinaus zeigt die Interpretation der Experimente, dass, obwohl AML1/ETO und Flt3-ITD für sich genommen jeweils anti-apoptotische Zellprogramme initialisieren, deren gleichzeitige Präsenz antiproliferative Mechanismen in Gang bringt. Die nach den oben dargestellten Experimenten hierfür ursächliche Repression Zellzyklus-regulierender Proteine und die Hemmung anti-apoptotischer Mechanismen zeigt erneut die Komplexität der intrazellulären Aussteuerung der Apoptose. Die genaue Aufdeckung der hierarchischen

Gliederung dieses komplexen Netzwerkes von jeweiligen Induktoren und Repressoren der Apoptose beinhaltet nicht nur akademische sondern vor allem noch ungeahnte therapeutische Möglichkeiten. Darüber hinaus deutet die Interpretation der erhobenen Daten in Abgleich mit dem gegenwärtigen Stand der Literatur darauf hin, dass die Beachtung des genetischen Hintergrundes, in das neue Mutationen – *in vitro* wie *in vivo* – eingebettet werden, ebenso wie die Reihenfolge ihrer Entstehung ein elementarer Bestandteil bei der zukünftigen Planung und Deutung von Experimenten sein sollte.

4 Material und Methoden

4.1 Plasmide

AML1-ETO wurde mit freundlicher Genehmigung von S. Hiebert, Vanderbilt University, Nashville, TN zur Verfügung gestellt; Δ AML1-ETO wurde durch C. Müller-Tidow kloniert und war in unserem Labor vorhanden. Die Gensequenzen wurden in pcDNA_{3.1}-Vektoren von invitrogen®, Groningen, kloniert und enthalten als Selektionsmechanismus Antibiotikaresistenzen gegenüber Ampicillin und Neomycin (Amp./Neo). In den gleichen Grundvektor mit Amp./Neo-Resistenz wurden die genetischen Sequenzen von AML1 und GFP-STAT5 integriert sowie von GFP, das kommerziell von Clontech®, Palo Alto, USA, erworben wurde. Als Transduktionsvektor für STAT5 wurde pxM mit Resistenz gegenüber Ampicillin ausgewählt. Die Gene des Wachstumsfaktorrezeptors Flt3 wurden in Wildtypform (Flt3-WT, als Restriktionsenzyme wurden BamH1 und Pst1 verwendet) und mit Längenmutation (Flt3-ITD, Restriktionsenzyme Xho1 und Spe1) im paL-Vektor mit freundlicher Genehmigung von Masao Mizuki zur Verfügung gestellt.

4.2 Kulturmedien und Puffer

Angaben nachfolgend gemäß den standartisierten Laborvorgaben:

DMEM

Von Gibco BRL.

Iscove`s Modifiziertes Dulbecco`s Medium (IMDM)

(Life technologies, Grand Island, NY), STEMPro 2,3% Methylcellulose/ IMDM (Gibco BRL).

Fetales Kälber Serum (FCS)

Bei 56 °C für 30 min. hitzeinaktiviert.

Von Biochrom AG, Berlin.

G418 (Neomycin)

Für Selektion von transfizierten Zellen dem Medium zugeben. Pulver zu 5 g von Calbiochem mit 100 ml ddH₂O vermischt und zu 5 ml Aliquots (50 mg/ml) bei -20 °C eingefroren.

Lyse Puffer

50mM Hepes, pH 7,4, 10% Glycerol, 150mM NaCl, 1% Triton-X100, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 50µM ZnCl₂, 25mM NaF

Vor Lysieren der Zellen hinzuzugeben: Complete Protease Inhibitor [1.000x CPI wird hergestellt aus: 50mg/ml STI (Soja-Trypsininhibitor), 12,5mg/ml Leupeptin, 12,5mg/ml Aprotinin, 1mM NaV₂O₄ (Phosphataseinhibitor), 1µM Pepstatin, 1mM PMSF].

Penicillin/Streptomycin

Konzentration: 10.000 U/10 mg/ml.

RPMI 1640 Medium

Hinzugefügt wurden zusätzlich: FCS(Gibco BRL), L-Glutamin (Gibco BRL), 20mM HEPES (Biochrom), Natriumpyruvat 100mM (Biochrom) und WEHI (s.u.).

Special Blotto Buffer

Bestehend aus: 0,075M NaCl, 0,01M Tris-Hydrochlorid, 0,1% Tween u. 0,013M EDTA in 1l Aqua dest. gelöst und dann mit HCl auf pH = 7,4 eingestellt.

Spezialblockierungspuffer für Anti-Phosphotyrosin-Blot

Rinderserumalbumin (1%), Special Blotto Buffer (s.o.)und Hühnereialbumin (2%).

Standardblockierungspuffer

Bestehend aus: 5% Magermilchpulver in PBS/Tween (0,1%).

Stripping Puffer

pH = 8,0, 62,5mM Tris SDS (2%) und 0,1M β-Mercaptoethanol sowie H₂O.

Von PAA Laboratories GmbH, aus Linz, Österreich.

Transferpuffer

Bestehend aus: 192mM Glycin, 25mM Tris Base und 20mM Methanol sowie H₂O.

WEHI

Aus Zellüberstand der IL-3 produzierenden WEHI 3B-Zelllinie. Zur Kultivierung der Zelllinie IMDM Medium mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und β -Mercaptoethanol ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M) versetzt. Zellen bei 400 G abzentrifugiert, Überstand steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

4.3 Chemikalien

Agarose Ultra Pure von	Gibco Life Technologies, Gaithersburg
Agarose Sea Plaque GTG von	Biozym
Blasticidin von	Invitrogen life technologies
DMSO von	Sigma, St.Louis, USA
DTT von	Sigma, St.Louis, USA
ECL von	Amersham Life Science, Braunschweig
EDTA von	Sigma, St.Louis, USA
EGTA von	Sigma, St.Louis, USA
Ethanol von	Sigma, St.Louis, USA
Gene clean Kit von	Bio 101
Glycin von	Merck KgaA, Darmstadt
G418: Neomycin von	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
HEPES von	Biochrom
Hühnereialbumin von	Sigma, St.Louis, USA
Lauryl-Sulfat von	Sigma, St.Louis, USA
L-Glutamin von	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Luria Broth Base von	Gibco Life Technologies, Gaithersburg
Magnesiumchlorid-Hexahydrat von	Merck KgaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol von	Sigma, St.Louis, USA
Mini/Midiprep Kit von	Qiagen

MMLV-RT 5x Reaction Buffer von	Promega, Madison, USA
MMLV-RT 200 von	Promega, Madison, USA
Natriumchlorid von	Reide-de-Haen
Natriumhydrogencarbonat von	Merck KgaA, Darmstadt
Oligo-d(T)-Primer von	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
PBS Dulbecco`s von	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
PMSF von	Sigma, St.Louis, USA
Rinderserum Albumin von	Sigma, St.Louis, USA
RNase OUT Ribonuklease Inhibitor von	Invitrogen life technologies
SuperFect-Reagenz	Quiagen
TaqMan PCR Mastermix von	PE Applied Biosystems, USA
TaqMan Sonden und Primer von	PE Applied Biosystems, USA
Tris von	Sigma, St.Louis, USA
Trizma-Hydrochlorid von	Sigma, St.Louis, USA
Trizol Reagent, ultra pur von	Gibco Life Technologies, Gaithersburg
Universal PCR Master Mix von	PE Applied Biosystems, USA
Quicklyser QLY-200 von	Sysmex

Weitere Chemikalien speziell bei den Versuchsbeschreibungen genannt.

4.4 Verbrauchsmaterial

96-well reaction plate, Micro Amp Optical, PE Applied Biosystems; Röhrchen: Greiner; TC, 35x10 mm, und Petrischalen: 145x20 mm, beides Greiner Labortechnik; sterile Einwegspritzen, 2, 5 und 10ml, Amefa; 6-, 12-, 24- und 96-well plate, Nunclon™ Surface, NUNC Brand Products; Elektroporationscuvetten, 4mm Weite und 800 µl Volumen; Eppendorf, Hamburg; Einmal-Kanüle, 2x20 mm, Ehrhardt Söhne GmbH; Microrotations Tube, RNase free, Costar; Ready Gels, Polyacrylamide Electrophoresis, Bio Rad., Optische Caps, PE Applied Biosystems; Kulturflaschen: Nunclon™ Surface 50 ml, NUNC Brand Products. Weitere Materialien werden bei den Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

4.5 Geräte

ABI Prism 7700 Sequence Detector, PE Biosystems, Foster City, USA
 Biodancer, New Brunswick Scientific, USA; Vortex, Janke&Kunkel, IKA Labortechnik
 Blockthermostat BT200, Kleinfeld, Labortechnik
 FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, USA; PC-Programm: Cell Quest
 Heater, RCT basic, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik
 Heidolph Rotator, REAX2
 Macintosh Power 4400
 Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg
 Microbeta 1450 Scinillationszähler; Heat Sealer; Harvester-Inotech 1295-012, Wallac
 Microcellcounter F-300, Auto Dilutor AD-260, Sysmex, Deutschland
 Mikroskope: Olympus IMT-2 (Zählkammer: Neubauer improved), LSM Pascal Zeiss
 pH-Meter MP225, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz
 Primer Express Software, PE Biosystems, Foster City, USA
 Spectrophotometer UV-1202, Shimadzu
 Sterile Werkbank: Inkubationsschrank Cytoperm, Heraeus Sepatech, Deutschland
 TransBlot Semi-DryTransfer Cell; Ready Gel Cell; E.coli Pulser; GelDoc1000, Bio Rad
 Vacu Gene Pump, Pharmacia LKB
 Zentrifugen: Cryofuge M7000, Heraeus, Sepatech (Hanau)
 Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg
 Sorvall MC 12V, Du Pont
 Sorvall Super T21, Kühlzentrifuge

Weitere Geräte werden unter den einzelnen Versuchsbeschreibungen deklariert.

4.6 Zelllinien und Transfektionen

Grundlage der Versuche war die Zelllinie mit der Bezeichnung 32Dcl3. Sie stellt eine murine, myeloisch-vordifferenzierte Progenitor-Zelllinie dar, die den Wachstumsfaktor IL-3 zum Überleben benötigt. Sie sind jedoch nicht an das Vorhandensein extrazellulärer Matrix gebunden und ihre Kultivierung kann daher auch in flüssigen Medien vorgenommen werden. Optimale Bedingungen erhalten sie in dem Medium RPMI 1640, das in unserem Labor dazu verwendet wurde, sowie unter

Inkubatorbedingungen bei 37°C und 5%-igem CO₂-Anteil an der Luft. Als notwendige IL-3-Quelle wurde WEHI 10% verwendet. Dies ist bei den ebenfalls eingesetzten 32D-ITD-Zellen entbehrlich, sie wachsen wachstumsfaktorunabhängig. Zusätzlich werden Na-Pyruvat, 10%-iges FCS und ein kalkuliertes Antibiotikagemisch aus Streptomycin und Penicillin zum Erhalt bakterienfreier Kulturen appliziert. Unter IL-3 reifen die Zellen nicht aus, proliferieren jedoch. IL-3-Entzug führt zum Stagnieren des Zellzyklus, anhaltender Entzug zum Tod der Zellen. Granulozyten-spezifische Wachstumsfaktoren sind in der Lage eine Ausreifung in Granulozyten herzustellen. Die Affennieren-Zelllinie COS7 wurde in DMEM Medium ebenfalls mit 10% FCS, 1% L-Glutamin sowie mit Antibiotika (Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 10 µg/ml) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die 32D- und die 32D-ITD-Zelllinien wurden durch Elektroporation mit je 20µg Gesamt-Plasmidmenge DNA bei 280V und 975µF transfiziert. Die COS7-Zellen wurden mit Hilfe des SuperFect®-Reagenz (Qiagen®) mit 20µg Gesamt-Plasmidmenge DNA transfiziert.

4.7 Colony-Assay

32D-ITD Zellen wurden transient mit einer Gesamt-DNA-Plasmidmenge von 20µg der Expressionsvektoren für pcDNA_{3.1}, AML1, AML1-ETO und ΔAML1-ETO per Elektroporation transfiziert. Um das klonale Wachstum zu untersuchen, wurden je 1x10⁵ Zellen am Tag nach der Transfektion pro 35mm-Zellkulturschale in 1ml eines Kulturmixes ausgesiedelt. Dieser Mix bestand aus „Isocove modified Dulbecco medium“ (IMDM, Gibco®) mit 1%iger Methylcellulose, 20%iges FCS und als Selektionssubstanz G418 (Neomycin) mit einer Endkonzentration von 0,6 mg/ml. Anschließend erfolgte die Inkubation über 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂. Die Kolonien wurden dann unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Einer Kolonie entsprachen >50 Zellen. Jeder Ansatz wurde dreifach angesetzt aus den drei unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

4.8 Anti-Phospho-STAT5 Western-Blot

Die Protein-Lysate wurden aus 32D-ITD-Zellen gewonnen, die zuvor per Elektroporation mit GFP, GFP-STAT5, AML1 und AML1-ETO in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert worden waren (siehe Abschnitt Ergebnisse 2.3). Jedes Sample wurde jeweils einer präelektrophoretischen Immunpräzipitation mit Anti-STAT5b-Antikörper (Upstate®) und mit dem ebenfalls vom Hasen stammenden aber unspezifischen IgG-Antikörper (Santa Cruz®) als Kontrolle unterzogen. Protein A/G Agarose Beads (Santa Cruz Biotechnology®) banden an die Ag-Ak-Komplexe und ließen sich so nach Zentrifugation weiter selektiv aufarbeiten.

Nach Erhitzen und damit thermischer Denaturierung wurden die Eiweiße in einem Polyacrylamid-Gradientengel (4-15% Tris-HCL) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde für 20 Min. bei 80 Volt und für 80 Min. bei 100 Volt durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine in einem „feuchten Transfer“ auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die STAT5-Proteine wurden nun mit der ersten Antikörperkombination aus dem murinen Anti-Phospho-STAT5a/b-Antikörper (Upstate®) und IgG-Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Goat-Anti-Mouse-Antikörper (Jackson ImmunoResearch®) auf einem Röntgenfilm nach Reaktion mit dem Luminol®-Reagenz (Santa Cruz Biotechnology®) sichtbar gemacht. Nach chemischer Loslösung der gebundenen Antikörper mittels einer Mischung aus Tris-Puffer (1mol/l, pH=8,0), doppelt destilliertem Wasser, Natriumdodecylsulfat (SDS, 10%) und β -Mercaptoethanol wurde die zweite Antikörperkombination aus dem murinen Anti-GFP (Green Fluorescent Proteine, Clontech®) Antikörper und dem wiederum Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper gegen Mäuse IgG (Jackson ImmunoResearch®) aufgetragen und dedektiert.

4.9 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Cos7-Zellen wurden in 25mm single-well-plates ausgesiedelt, mit GFP, GFP-STAT5, GFP-STAT5 + AML1 und GFP-STAT + AML1/ETO sowie zusätzlich zu jeder Transfektionprobe auch mit Flt3-ITD per SuperFect®-Reagenz (Qiagen®) transfiziert und anschließend in DMEM Medium für 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte

die in-vivo Betrachtung der intrazellulären Lokalisation des GFP markierten STAT5 unter dem LSM Pascal der Firma Zeiss, einem Biofluoreszenz-fähigem Laser-Scanning-Mikroskop mit konfokaler Blende zur Visualisierung submembranärer Strukturen. Der Zu- und Umgang mit diesem Mikroskop wurde uns zur Durchführung dieser Untersuchungsreihe durch das Institut für Medizinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. Volker Gerke) aus dem Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) der Universität Münster ermöglicht. Es wurde von jeder Transfektion zunächst ein visueller Übersichtsbefund erstellt und in einem zweiten Schritt ein realer 3-D-Datensatz von den für den jeweiligen Transfektionstyp charakteristischen Verteilungsmuster von GFP-STAT5 erhoben und auf einem digitalem Medium gespeichert. Durch die konfokale Blende ist mittels Doppel-Lasertechnik eine Erhebung von fluoreszierenden Signalen unterhalb der Zellmembran möglich, die digitale Aufarbeitung dieser Datensätze erzeugt – ähnlich der Kernspintomographie – dann ein 2-D-Bild ein jegweder gedachten Schnittebene der Zelle.

4.10 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Cos7-Zellen wurden mit ITD, STAT5, pcDNA_{3.1}, AML1 und AML1-ETO in verschiedenen Kombinationen transfiziert und Kernextrakte der transfizierten Zellen hergestellt. Für die Gelelektrophorese wurden ³²P-markierte Doppelstrangoligonucleotide, die eine STAT5-Bindungsstelle enthalten, für 20 Minuten auf Eis mit den Kernextrakten inkubiert. Dabei hatte der Gesamtreaktionsansatz die folgenden Stoffmengen und -konzentrationen: Tris-HCL (10mmol/l, pH=7,5), Glycerol (5%), MgCl₂ (1mmol/l), EDTA (0,5mmol/l), Dithiorhreitol (0,5mmol/l), NaCl (100mmol/l) und 0,4µg poly (dl-dC)·poly (dl-dC). Die gesamten Reaktionsansätze wurden dann auf ein 0,5xTris-Borat-EDTA/6%iges, nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Das Gel lief eine Stunde bei 100 Volt vor (pre-run gel) und anschließend drei bis dreieinhalb Stunden bei 120 Volt. Anschließend wurden die Gele getrocknet und ein Röntgenfilm belichtet.

4.11 FACS-Analyse und Sorting

Der Begriff der Durchflusszytometrie beschreibt ein Meßverfahren, bei dem z.B. Blutzellen in einer extrem dünnlumigen Kapillare einzeln an bestimmten Meßelementen (elektrisches Feld, Farblaser etc.) vorbeigeführt werden. Neben typischen Grundcharakteristika dieser Zellen wie z.B. Größe, Granulierung und Transparenz können mittels Farbstoffen, die in die Zellen eingebracht werden oder mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die an Oberflächenmoleküle binden, gezielt einzelne typische Expressionsprofile erstellt werden. Ein FACS (fluorescence activated cell sorting) kann darüber hinaus diese Zellen nach den gewählten Kriterien auftrennen und sortieren.

Die Zellen wurden im Durchflusszytometer auf die Expression des intrazellulären Fluorochroms GFP untersucht und die Zellen entsprechend als für GFP positiv oder negativ sortiert. Im Anschluss mußten die sortierten Zellen von residuellen Mediumbestandteilen mit PBS gereinigt werden und standen dann in separaten Eppendorf Tubes für die weiteren Analysen zur Verfügung.

4.12 RT-PCR

Der erste Schritt dieser Methode beinhaltet die Isolierung von mRNA, also die Transkriptionsprodukte der gewünschten aktivierten Gene. Dabei korreliert der Aktivierungsgrad eines Gens in der Regel mit der Menge der sich intrazellulär befindlichen mRNA. Um aussagekräftige Mengen an mRNA gewinnen zu können, werden ca. 7.000.000 Zellen in RPMI 1640 Medium inklusive FCS suspendiert. Diese werden anschließend mit Guanidinisocyanatpuffer lysiert und daraufhin wieder in eine gleichmäßige Suspension gebracht und mit hochprozentigem Äthylalkohol versetzt (70%). Über spezialisierte mRNA-bindende Membranen erfolgt unter Anwendung von RNase-depletiertem H₂O die Aufreinigung. Der Grad der Aufreinigung kann mittels Photometer bestimmt werden. Von der Kenntnis ausgehend, dass gewöhnliche RNA ein Extinktionsmaximum bei 260nm aufweist, können über einfache Division mit einem zusätzlich bestimmten Extinktionswert bei 280nm Hinweise auf eine mögliche

Verunreinigung durch Proteinbestandteile gewonnen werden. Dieser Verdacht muss bei Relativwerten von kleiner/gleich 1,8 geäußert werden; Werte von größer/gleich 2,0 sprechen für eine zureichende Aufreinigung der RNA. Wird bei 260nm eine Extinktion mit einem Wert von 1,0 bestimmt, so wird hier eine RNA-Konzentration von 4mg/dl angenommen. Auf diese Weise kann über die Photometrie die Konzentration ermittelt werden.

Der zweite Schritt beinhaltet die Herstellung von cDNA aus mRNA und wird als „reverse Transkription“ bezeichnet. Hierbei wird – um im weiteren Verlauf eine Amplifikation überhaupt zu ermöglichen – die Einzelstrang-RNA in eine angepaßte doppelsträngige sogenannte cDNA „umgeschrieben“. Dies geschieht unter Zuhilfenahme eines Enzymes, das seiner Funktion nach als Reverse Transkriptase bezeichnet wird und biochemisch betrachtet eine RNA-dependente DNA-Polymerase ist. Diese synthetisiert nach Applikation von aktivierten DNA-typischen Nukleosidtriphosphaten (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin) und Magnesium-Ionen die cDNA. Zur selektiven reversen Transkription von messenger-RNA enthält der entsprechende Primer für die PCR eine zum Poly-Adenin-Cap der mRNA passende Poly-Thyminsequenz. So wird die Amplifikation von ribosomaler und transfer-RNA vermieden.

Für die RT-PCR wurden die folgenden Proben angefertigt: 8µl MMLV-5x-Buffer (250 mM Tris-HCL, 375mM KCL, 15mM MgCl, 50mM DTT), 2µl oligodT (random hexamer), 26µl RNA(2µg) + H₂O. Diese Proben wurden für 10 Min. auf 70°C erhitzt, dann für drei Min. auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend wurden 2µl dNTP (2 mM), 1µl RNase Inhibitor und 1µl MMLVirus- Reverse Transkriptase zugegeben. Diese Proben wurden für 1Std. auf 42°C und für 10 Minuten auf 75°C erwärmt. Die so hergestellte cDNA wurde dann mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200µl diluiert.

Eine semi-quantitative Analyse der Genexpression STAT5-abhängiger Gene in den 32D-Zellen wurde mittels *Real-Time*-PCR durchgeführt.

Die Basis des Prinzips ist eine Probe. Sie ist definiert als ein Oligonukleotid, das in der Lage ist, eine bestimmte Gensequenz spezifisch zu binden, welche sich wiederum zwischen den beiden üblichen PCR-Primern für das *gene of interest* befindet. An dieser

Probe sind ein sog. Reporter und ein sog. Quencher („Auslöscher“) befestigt. Dies sind zwei zur Fluoreszenz befähigte Farbstoffe. Sie können durch Licht einer definierten Wellenlänge – hierbei wird in diesem Falle ein Argon-Laser verwendet – zur Fluoreszenz aktiviert werden. Solange jedoch Reporter und Quencher gleichzeitig an die Probe annektiert bleiben, eliminiert der Quencher das fluoreszierende Emissionssignal des Reporters. Der fluoreszierende Reporter heißt FAM (Abkürzung für: 6-Carboxy-Fluorescein) und haftet fest über eine echte kovalente Bindung an das 5`-Ende der Probe an. Der Quencher heißt TAMRA (Abkürzung für: 6-Carboxy-Tertamethylrhodamin) und ist über ein Bindungsarmnukleotid an das entgegengesetzte 3`-Ende der Probe gebunden. Das 3`-Ende der Probe kann in der PCR-Reaktion bewußt nicht fortgesetzt werden. Dies wird durch eine Phosphorylierung erreicht. Das 5`-Ende der Probe wird samt Reporter bei jeder Amplifikation des Stranges durch die DNA-Polymerase herausgeschnitten. Nun kann das nicht mehr „gequenschte“ Emissionssignal des Reporters mittels eines speziellen Sequenz-Detektors (in dieser Untersuchungsreihe: Abi Prism 7.700) registriert werden. Dieses Emissionssignal ist nicht nur spezifisch für das *gene of interest* sondern auch proportional zu seiner Amplifikationsmenge. Der Sequenz-Detektor registriert jedes neue Emissionssignal in Echtzeit („real time“). Er ermittelt über sog. *amplification curves* (Anzahl der Zyklen in Abhängigkeit zum Emissionssignal) eines jeden Gens den Ct-Wert (Abkürzung für: Threshold cycle), welcher die Anzahl an Zyklen beschreibt, bei der es zum Übergang vom linearen zum exponentiellen Wachstum der Intensität des Emissionssignals kommt. Da der Ct-Wert direkt abhängig von der verwendeten Basismenge an cDNA eines Gens ist, wird an dieser Stelle aus einem reinen Amplifikationsverfahren (PCR) eine Messmethode, die eine semi-quantitative Aussage über das Transkriptionsniveau eines Gens zuläßt.

Neben diesem spezifischen Dedektionsverfahren mittels der Probe ist es alternativ auch möglich, eine unspezifische Substanz zu verwenden. SYBR-green ist ebenfalls ein fluoreszierender Farbstoff, der bei Einlagerung in dsDNA fluoreszierendes Licht emittiert. In den u.g. Reaktionsansätzen fand jedoch durchgehend das spezifische Prinzip mittels Primer und Probe Anwendung.

Gemäß der vorgegebenen Untersuchungsvorschrift wurde für jedes *gene of interest* nachfolgender Reaktionsansatz angefertigt:

Forward primer: 0,225µl

Reverse primer: 0,225µl

Probe (10µM): 0,25µl

ddH₂O: 4,05µl

Master Mix: 12,5µl

Von der, wie oben beschrieben, gewonnenen cDNA wurde 1µl mit 6,75µl Wasser versetzt, anschließend wurden die unten genannten Reaktionsansätze zugegeben.

Folgende Forward- und Reverse-Primer mit ihren entsprechenden Sonden (Probes) wurden eingesetzt:

GAPDH forw.: 5'GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'
 GAPDH rev.: 5'GAA GAT GGT GAT CGG ATT TC 3'
 Probe: 5' FAM ATC CGG GAC GTG ATG CAG AAC CAC
 CTA C TAMRA 3'

CIS1 forw.: 5' AAG TTG CTA CAA CTT GCT GGC A 3'
 CIS1 rev.: 5' AGG CAG AGG TGC TCG TGA AC 3'
 Probe: 5' FAM ACG CAT CCT GGC CTT TCC GGA
 TAMRA 3'

TCRgamma forw: 5' AAG TTG CTA CAA CTT GCT GGC A 3'
 TCRgamma rev.: 5' AGG CAG AGG TGC TGA AC 5'
 Probe: 5' FAM TGT CAC AGG TAA GTA TCG GAA GAA
 TAC AAC ATT TCC TAMRA 3'

PIM1 forw.: 5' GTC TAC TCT GGC ATC CGC G 3'
 PIM1 rev.: 5' GAC TGT GTC CTT GAG CAG CG 3'

Probe: 5' FAM CGC CGA CAA CTT GCC GGT GG
TAMRA 3'

PIM2 forw.: 5' CGG AAC CGT GTG CTA GGC T 3'
PIM2 rev.: 5' AGC AGC GCA ACC TCA AGT G 3'
Probe: 5' FAM CCA CCG TGT CAG ACT CAG TCA CCT
GC TAMRA 3'

SOCS2 forw.: 5' CGC GTC TGG CGA AAG C 3'
SOCS2 rev.: 5' CAT TAA CAG TCA TAC TTC CCC AGT ACC 3'
Probe: 5' FAM CAG GTC CAG AAG CCC CCC GG
TAMRA 3'

SOCS-3 forw.: 5' TCT TAT CCG CGA CAG CTC G 3'
SOCS-3 rev.: 5' GTT CTT GGT CCC CGA CTG G 3'
Probe: 5' FAM CCA GCG CCA CTT CTT CAC GCT CA
TAMRA 3'

Cyclin D1 forw.: 5' CTG GCC ATG AAC TAC CTG GA 3'
Cyclin D1 rev.: 5' GGA AGT GCT CGA TGA AGT CG 3'
Probe: 5' FAM ACA TCT GTG GCA CAG AGG GCA ACG
TAMRA 3'

Bcl-x1 forw.: 5' AGG ATA CAG CTG GAG TCA G 3'
Bcl-x1 rev.: 5' TCT CCT TGT CTA CGC TTT CC 3'
Probe: 5' FAM ACA GTG CCC CGC CGA AGG AGA
TAMRA 3'

Um eine Aussagekraft eines solchen semi-quantitativen Verfahrens zu ermöglichen, ist der Vergleich mit regelhaft und ubiquitär in dem entsprechenden Gewebe oder Zellpopulation erstens vorhandenen und zweitens auf einem konstanten Niveau exprimierten Genen notwendig. Solche Voraussetzungen erfüllende Gene werden als „house keeping genes“ bezeichnet. Ein klassischer Vertreter ist das Gen des Enzyms GAPDH. Dieses wurde in den o.g. Untersuchungen eingesetzt. Zunächst wurden entsprechende Verdünnungsreihen angesetzt und für GAPDH und die *genes of interest* anhand ihres Expressionsniveaus Standardkurven erstellt. Anschließend konnten in Bezug auf die Referenzwerte Aussagen über das relative Expressionsniveau getroffen werden.

4.13 Anti-CIS Western Blot

Nach unterschiedlicher Transfektion der 32D-ITD-Zellen (siehe Ergebnisse Abs. 2.5.2) mittels Elektroporation wurde jede Transfektionsprobe nach 18h Inkubationszeit mit Hilfe eines FACS-Sorters gemäß der Positivität für GFP aufgetrennt. Unter der statistisch gerechtfertigten Annahme, dass bei GFP-Positivität die Zellen auch die anderen beigegebenen Plasmide inkorporiert haben, wurden die positiv gesorteten Zellen als positiv für alle in der Probe zu transfizierenden Plasmide angesehen. Die gesorteten Zellen wurden mit SDS-Puffer lysiert. Zunächst erfolgte dann nach thermischer Denaturierung der Proteine die Elektrophorese in einem Polyacrylamidgradientengel (4-15% Tris-HCL) und das Blotting der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit einem polyklonalem Goat-Anti-CIS-Antikörper (Santa Cruz®) gefolgt von einem IgG-Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper gegen Ziegen-IgG (Santa Cruz®) auf einem Röntgenfilm detektiert.

Zur Kontrolle auf dem Gel aufgetragenen, gleichen Proteinmengen wurde eine Detektion mit einer zweiten Antikörperkombination durchgeführt. Hierbei wurde zunächst der murine Anti-actin-Antikörper (Sigma®) eingesetzt, der wiederum mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper gegen Maus-IgG (Santa Cruz®) detektiert wurde und auf Röntgenfilmmaterial sichtbar gemacht wurde.

5 Literaturverzeichnis

1. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT.
Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis.
Br J Haematol. 2001 Jun;113(4):1076-7.
2. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Rees DC,
Vandenbergh EA, Winship PR, Reilly JT.
FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia
define a high-risk group.
Br J Haematol. 2000 Oct;111(1):190-5.
3. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I,
Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE.
Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+)
stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity.
Immunity. 2001 Oct;15(4):659-69.
4. Allen JD, Verhoeven E, Domen J, van der Valk M, Berns A.
Pim-2 transgene induces lymphoid tumors, exhibiting potent synergy with c-myc.
Oncogene. 1997 Sep 4;15(10):1133-41.
5. Amann JM, Nip J, Strom DK, Lutterbach B, Harada H, Lenny N, Downing JR,
Meyers S, Hiebert SW.
ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple
histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain.
Mol Cell Biol. 2001 Oct;21(19):6470-83.
6. Banker DE, Radich J, Becker A, Kerkof K, Norwood T, Willman C, Appelbaum
FR.
The t(8;21) translocation is not consistently associated with high Bcl-2 expression
in de novo acute myeloid leukemias of adults.
Clin Cancer Res. 1998 Dec;4(12):3051-62.

-
7. Bäsecke J, Schwieger M, Griesinger F, Schiedlmeier B, Wulf G, Trümper L, Stocking C.
AML1/ETO promotes the maintenance of early hematopoietic progenitors in NOD/SCID mice but does not abrogate their lineage specific differentiation.
Leuk Lymphoma. 2005 Feb;46(2):265-72.
8. Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, Kruijer W, Vellenga E.
Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts.
Leukemia. 2001 Dec;15(12):1923-31.
9. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R.
STATs in oncogenesis.
Oncogene. 2000 May 15;19(21):2474-88.
10. Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwäble J, Buerger H, Müller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H.
Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation.
Cancer Res. 2005 Nov 1;65(21):9643-50.
11. Britos-Bray M, Friedman AD.
Core binding factor cannot synergistically activate the myeloperoxidase proximal enhancer in immature myeloid cells without c-Myb.
Mol Cell Biol. 1997 Sep;17(9):5127-35.
12. Buchholz F, Refaeli Y, Trumpp A, Bishop JM.
Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse.
EMBO Rep. 2000 Aug;1(2):133-9.

13. Büchner T, Hiddemann W, Wormann B, Löffler H, Gassmann W, Haferlach T, Fonatsch C, Haase D, Schoch C, Hossfeld D, Lengfelder E, Aul C, Heyll A, Maschmeyer G, Ludwig WD, Sauerland MC, Heinecke A.

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. 1999 Jun 15;93(12):4116-24.

14. Büchner T.

Acute myeloid leukemia (AML)

Schweiz Rundsch Med Prax. 1999 Mar 4;88(10):421-30.

15. Burel, S. A., N. Harakawa, L. Zhou, T. Pabst, D. G. Tenen, and D. E. Zhang
Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation.

Mol Cell Biol 21:5577-90.

16. Byrd JC, Dodge RK, Carroll A, Baer MR, Edwards C, Stamberg J, Qumsiyeh M, Moore JO, Mayer RJ, Davey F, Schiffer CA, Bloomfield CD

Patients with t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered.

J Clin Oncol. 1999 Dec;17(12):3767-75

17. Cao W, Britos-Bray M, Claxton DF, Kelley CA, Speck NA, Liu PP, Friedman D.

CBF beta-SMMHC, expressed in M4Eo AML, reduced CBF DNA-binding and inhibited the G1 to S cell cycle transition at the restriction point in myeloid and lymphoid cells.

Oncogene. 1997 Sep;15(11):1315-27.

18. Chebath J, Benech P, Mory Y, Federman P, Berissi H, Gesang C, Forman J, Danovitch S, Lehrer R, Aloni N.

The human (2'-5') oligo A synthetase gene, structure of its two enzyme products and quick cell blot for clinical monitoring of its activation by interferons.

Prog Clin Biol Res. 1985;202:149-61.

19. Choudary C, Olsen JV, Brandts C, Cox J, Reddy PNG, Bohmer FD, Gerke V, Schmidt-Arras DE, Berdel WE, Muller-Tidow C, Mann M, Serve H.

Mislocalized activation of oncogenic RTKs switched downstream signaling outcomes.

Mol Cell 2009 Oct;36:326-339.

20. Choudary C, Schwable J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kinder T, Fischer T, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H.

AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations.

Blood 2005;106:265-279.

21. Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J.

STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation.

Mol Cell Biol. 1997 Nov;17(11):6508-16.

22. Cornic M, Guidez F, Delva L, Agadir A, Degos L, Chomienne C.

Mechanism of action of retinoids in a new therapeutic approach to acute promyelocytic leukemia.

Bull Cancer. 1992;79(7):697-704. Review. French.

23. Cwikel S, Silvian-Drachsler I, Prolov L, Hooghe-Peters EL, Merchav S.

Prolactin-induced expression of cytokine-inducible SH2 signaling inhibitors in human hematopoietic progenitors.

Exp Hematol. 2001 Aug;29(8):937-42.

24. Decker T, Meinke A

Jaks, Stats and the immune system.

Immunobiology. 1997 Dec;198(1-3):99-111.

25. Downing J.

The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia:

biology and clinical significance.

Br J Haematol. 1999 Aug;106(2):296-308. Review.

26. Eichmann A, Yuan L, Breant C, Alitalo K, Koskinen PJ.

Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system.

Oncogene. 2000 Feb 24;19(9):1215-24.

27. Eilers A, Decker T

Activity of Stat family transcription factors is developmentally controlled in cells of the macrophage lineage.

Immunobiology. 1995 Jul;193(2-4):328-33.

28. Era T, Asou N, Kunisada T, Yamasaki H, Asou H, Kamada N, Nishikawa S, Yamaguchi K, Takatsuki K.

Identification of two transcripts of AML1/ETO-fused gene in t(8;21) leukemic cells and expression of wild-type ETO gene in hematopoietic cells.

Genes Chromosomes Cancer. 1995 May;13(1):25-33.

29. Feldman JD, Vician L, Crispino M, Tocco G, Marcheselli VL, Bazan NG, Baudry M, Herschman HR.

Pim1 cooperates with E2a-Pbx1 to facilitate the progression of thymic lymphomas in transgenic mice.

Oncogene. 1997 Nov 27;15(22):2735-42.

30. Fenske TS, Pengue G, Mathews V, Hanson PT, Hamm SE, Riaz N, Graubert TA.

Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 19;101(42):15184-9. Epub 2004 Oct 11.

31. Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, Kienast J, Leo R, Schwartz S, Berdel WE, Serve H.

Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells.

Br J Haematol. 2000 Feb;108(2):322-30.

32. Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD.

The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B.

Oncogene. 1995 Dec 21;11(12):2667-74.

33. Friedman AD, Britos-Bray M, Suzow J.

The murine myeloperoxidase gene contains a bipartite distal enhancer, including a novel region regulated by PEBP2/CBF.

Leuk Res. 1996 Oct;20(10):809-15.

34. Friedman B, Frackelton AR Jr, Ross AH, Connors JM, Fujiki H, Sugimura T, Rosner MR.

Tumor promoters block tyrosine-specific phosphorylation of the epidermal growth factor receptor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 May;81(10):3034-8.

35. Frohling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K; AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia.

Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood. 2002 Dec 15;100(13):4372-80.

-
36. Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA.
Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO.
Mol Cell Biol. 1998 Dec;18(12):7185-91.
37. Gilliland DG, Griffin JD.
The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.
Blood. 2002 Sep 1;100(5):1532-42.
38. Gilliland DG.
Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy.
Semin Hematol. 2002 Oct;39(4 Suppl 3):6-11.
39. Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J.
FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model.
Blood. 2005 Jun 15;105(12):4792-9. Epub 2005 Feb 17.
40. Hannahan D, Weinberg WA
The hallmarks of cancer.
Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
41. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD.
The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997.
Ann Oncol. 1999 Dec;10(12):1419-32.
42. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H.
Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines.
Oncogene. 2000 Feb 3;19(5):624-31.

43. Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR.
Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia.
Cancer Cell. 2002 Feb;1(1):63-74.
44. Horiike S, Yokota S, Nakao M, Iwai T, Sasai Y, Kaneko H, Taniwaki M, Kashima K, Fujii H, Abe T, Misawa S.
Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia.
Leukemia. 1997 Sep;11(9):1442-6.
45. Hovland R, Gjertsen BT, Bruserud O
Acute myelogenous leukemia with internal tandem duplication of the Flt3 gene appearing or altering at the time of relapse: a report of two cases.
Leuk Lymphoma. 2002 Oct;43(10):2027-9.
46. Illmer T, Ehninger G.
FLT3 kinase inhibitors in the management of acute myeloid leukemia.
Clin Lymphoma Myeloma. 2007 Dec;8 Suppl 1:S24-34.
47. Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzinger I, Sperr W, Le T, Weltermann A, Fonatsch C, Haas OA, Mannhalter C, Lechner K, Jaeger U.
Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16).
Hematol J. 2002;3(6):283-9.
48. Karp JE, Flatten K, Feldman EJ, Greer JM, Loegering DA, Ricklis RM, Morris LE, Ritchie E, Smith BD, Ironside V, Talbott T, Roboz G, Le SB, Meng XW, Schneider PA, Dai NT, Adjei AA, Gore SD, Levis MJ, Wright JJ, Garrett-Mayer E, Kaufmann SH.
Active oral regimen for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenous leukemia: A preclinical and phase I trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777, Zarnestra) combined with etoposide. Blood. 2008 Dec 24.

49. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, Ley TJ, Gilliland DG.

PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 11;99(12):8283-8.

50. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG.

FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model.

Blood. 2002 Jan 1;99(1):310-8.

51. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R.

Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia.

Blood. 1999 May 1;93(9):3074-80.

52. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, Tamura J, Shimazaki C, Matsue K, Kobayashi H, Arima N, Suzuki R, Morishita H, Saito H, Ueda R, Ohno R. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho).

Leukemia. 1997 Sep;11(9):1447-52.

53. Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD.

The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 26;93(24):14059-64.

54. Knudson AG jr..

Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1971 April;68(4):820-823.

55. Kohzaki H, Ito K, Huang G, Wee HJ, Murakami Y, Ito Y.
Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO(MTG8) but not by highly expressed Bcl-2.
Oncogene. 1999 Jul 15;18(28):4055-62.
56. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC.
The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials.
Blood. 2001 Sep 15;98(6):1752-9.
57. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC.
Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2393-8.
58. Langabeer SE, Walter H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirski D, Goldstone AH, Linch DC.
Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party.
Br J Haematol. 1997 Dec;99(4):925-8.
59. Larner AC, Jonak G, Cheng YS, Korant B, Knight E, Darnell JE Jr.
Transcriptional induction of two genes in human cells by beta interferon.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Nov;81(21):6733-7.
60. Le Beau MM, Davis EM, Patel B, Phan VT, Sohal J, Kogan SC.
Recurring chromosomal abnormalities in leukemia in PML-RARA transgenic mice identify cooperating events and genetic pathways to acute promyelocytic leukemia.
Blood. 2003 Aug 1;102(3):1072-4.

61. Lenny N, Meyers S, Hiebert SW.

Functional domains of the t(8;21) fusion protein, AML-1/ETO.

Oncogene. 1995 Nov 2;11(9):1761-9.

62. Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel WE, van der Reijden B, Quelle DE, Rowley JD, Cleveland J, Jansen JH, Pandolfi PP, Hiebert SW.

The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia.

Nat Med. 2002 Jul;8(7):743-50.

63. Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, Lyman SD, Broxmeyer HE.

Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells.

Leukemia. 1996 Jun;10(6):1012-8.

64. Lyman SD, Williams DE.

Biology and potential clinical applications of flt3 ligand.

Curr Opin Hematol. 1995 May;2(3):177-81.

65. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, Marchetto S, Lavezzi C, Mannoni P, Birnbaum D, Dubreuil P.

Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase.

Oncogene. 1993 Apr;8(4):909-18.

66. Martinelli G, Iacobucci I, Paolini S, Ottaviani E.

Farnesyltransferase inhibition in hematologic malignancies: the clinical experience with tipifarnib.

Clin Adv Hematol Oncol. 2008 Apr;6(4):303-10.

67. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A.

CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation.

Blood. 1997 May 1;89(9):3148-54.

68. Matsuno N, Osato M, Yamashita N, Yanagida M, Nanri T, Fukushima T, Motoji T, Kusumoto S, Towatari M, Suzuki R, Naoe T, Nishii K, Shigesada K, Ohno R, Mitsuya H, Ito Y, Asou N.

Dual mutations in the AML1 and FLT3 genes are associated with leukemogenesis in acute myeloblastic leukemia of the M0 subtype.

Leukemia. 2003 Dec;17(12):2492-9.

69. Meyers S, Lenny N, Hiebert SW.

The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation.

Mol Cell Biol. 1995 Apr;15(4):1974-82.

70. Mizuki et al., 2003, Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations.

Blood. 2003 Apr 15;101(8):3164-73.

71. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H.

Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways.

Blood. 2000 Dec 1;96(12):3907-14.

72. Mori S, Cortes J, Kantarjian H, Zhang W, Andreef M, Ravandi F.

Potential role of sorafenib in the treatment of acute myeloid leukemia.

Leuk Lymphoma. 2008 Dec;49(12):2246-55.

73. Müller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, Tickenbrock L, Ji P, Diederichs S, Sargin B, Köhler G, Stelljes M, Puccetti E, Ruthardt M, deVos S, Hiebert SW, Koefler HP, Berdel WE, Serve H.

Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells.

Mol Cell Biol. 2004 Apr;24(7):2890-904.

74. Mulloy JC, Cammenga J, MacKenzie KL, Berguido FJ, Moore MA, Nimer SD.

The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells.

Blood. 2002 Jan 1;99(1):15-23.

75. Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, Asou N, Ohno R, Saito H, Naoe T

Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene.

Br J Haematol. 1999 Mar;104(4):659-64.

76. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S.

Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia.

Leukemia. 1996 Dec;10(12):1911-8.

77. Nand S, Godwin J, Smith S, Barton K, Michaelis L, Alkan S, Veerappan R, Rychlik K, Germano E, Stiff P.

Hydroxyurea, azacitidine and gemtuzumab ozogamicin therapy in patients with previously untreated non-M3 acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes in the elderly: results from a pilot trial.

Leuk Lymphoma. 2008 Nov;49(11):2141-7.

78. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ.

Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells.

Blood. 2001 Jun 1;97(11):3559-67.

79. Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR.

Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors.

Blood. 1998 May 1;91(9):3134-43.

80. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR.

AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis.

Cell. 1996 Jan 26;84(2):321-30.

81. Ono R, Nakajima H, Ozaki K, Kumagai H, Kawashima T, Taki T, Kitamura T, Hayashi Y, Nosaka T.

Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis.

J Clin Invest. 2005 Apr;115(4):919-29.

82. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG.

AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia.

Nat Med. 2001 Apr;7(4):444-51.

-
83. Ravandi F, Estey E, Jones D, Faderl S, O'Brien S, Fiorentino J, Pierce S, Blamble D, Estrov Z, Wierda W, Ferrajoli A, Verstovsek S, Garcia-Manero G, Cortes J, Kantarjian H.
Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin.
J Clin Oncol. 2009 Feb 1;27(4):504-10.
84. Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N, Yergeau DA, Zhou L, Liu LQ, Little MT, Tenen DG, Zhang DE.
Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model.
Blood. 2000 Sep 15;96(6):2108-15.
85. Rocnik JL, Okabe R, Yu JC, Lee BH, Giese N, Schenkein DP, Gilliland DG.
Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD.
Blood. 2006 Aug 15;108(4):1339-45.
86. Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D.
Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family.
Oncogene. 1991 Sep;6(9):1641-50.
87. Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D.
Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene.
Genomics. 1991 Feb;9(2):380-5.
88. Schessl C, Rawat VP, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, Spiekermann K, Humphries RK, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C.
The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice.
J Clin Invest. 2005 Aug;115(8):2159-68.

-
89. Schlessinger J.
Cell signaling by receptor tyrosine kinases.
Cell. 2000 Oct 13;103(2):211-25.
90. Schmidt-Arras DE, Bohmer A, Markova B, Choudary C, Serve H, Bohmer FD.
Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases.
Mol Cell 2005;25:3690-3703.
91. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W
Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease.
Blood. 2002 Jul 1;100(1):59-66.
92. Schuringa JJ, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E.
Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6.
Blood. 2000 Jun 15;95(12):3765-70.
93. Schwäble J, Choudhary C, Thiede C, Tickenbrock L, Sargin B, Steur C, Rehage M, Rudat A, Brandts C, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H.
RGS2 is an important target gene of Flt3-ITD mutations in AML and functions in myeloid differentiation and leukemic transformation.
Blood. 2005 Mar 1;105(5):2107-14. Epub 2004 Nov 9.
94. Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Darnell JE Jr, Stein RB, Rosen J
Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 28;92(7):3041-5.

95. Selten G, Cuypers HT, Boelens W, Robanus-Maandag E, Verbeek J, Domen J, van Beveren C, Berns A.

The primary structure of the putative oncogene pim-1 shows extensive homology with protein kinases.

Cell. 1986 Aug 15;46(4):603-11.

96. Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, Kuo MC, Lai CL, Hsu HC.

Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse.

Blood. 2002 Oct 1;100(7):2387-92.

97. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W.

Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells.

Clin Cancer Res. 2003 Jun;9(6):2140-50.

98. Steffen B, Muller-Tidow C, Schwable J, Berdel WE, Serve H.

The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia.

Crit Rev Oncol Hematol. 2005 Nov;56(2):195-221.

99. Steffen B, Serve H, Berdel WE, Agrawal S, Linggi B, Buchner T, Hiebert SW, Muller-Tidow C.

Specific protein redirection as a transcriptional therapy approach for t(8;21) leukemia.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8448-53.

100. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN.

Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses.

Cell. 1998 May 29;93(5):841-50.

101. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T.

Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis.

Blood. 2002 Jun 15;99(12):4326-35.

102. Tickenbrock L, Schwable J, Wiedehage M, Steffen B, Sargin B, Choudhary C, Brandts C, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H.

Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction.

Blood. 2005 May 1;105(9):3699-706.

103. Tse KF, Mukherjee G, Small D.

Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation.

Leukemia. 2000 Oct;14(10):1766-76.

104. Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ, Davey HW.

Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 8;94(14):7239-44.

105. van der Lugt NM, Domen J, Verhoeven E, Linders K, van der Gulden H, Allen J, Berns A.

Proviral tagging in E mu-myc transgenic mice lacking the Pim-1 proto-oncogene leads to compensatory activation of Pim-2.

EMBO J. 1995 Jun 1;14(11):2536-44.

106. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al.

Genetic alterations during colorectal-tumor development.

N Engl J Med 1988;319:525-32.

107. Vogelstein B, Kinzler KW.

The multistep nature of cancer.

Trends Genet 1993;9:138-41.

108. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA.

Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 16;93(8):3444-9.

109. Wang ZY, Chen Z, Huang W, Li XS, Lu JX, Huang LA, Zhang FQ, Gu LJ, Ouyang RR, Chen SJ.

Problems existing in differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia (APL) with all-trans retinoic acid (ATRA).

Blood Cells. 1993;19(3):633-41.

110. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr.

Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation.

Cell. 1995 Jul 28;82(2):241-50.

111. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG.

Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model.

Blood. 2006 Jun 1;107(11):4274-81.

112. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA.

Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study.

Cancer Res. 2001 Oct 1;61(19):7233-9.

113. Wybenga-Groot

Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region.

Cell. 2001 Sep 21;106(6):745-57.

114. Yan B, Zemskova M, Holder S, Chin V, Kraft A, Koskinen PJ, Lilly M.

The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death.

J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):45358-67.

115. Yarden Y, Ullrich A.

Molecular analysis of signal transduction by growth factors.

Biochemistry. 1988 May 3;27(9):3113-9.

116. Yergeau DA, Hetherington CJ, Wang Q, Zhang P, Sharpe AH, Binder M, Marin-Padilla M, Tenen DG, Speck NA, Zhang DE.

Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene.

Nat Genet. 1997 Mar;15(3):303-6.

117. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, Naoe T.

Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines.

Leukemia. 1997 Oct;11(10):1605-9.

118. Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE.

AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10398-403.

119. Zhang S, Fukuda S, Lee Y, Hangoc G, Cooper S, Spolski R, Leonard WJ, Broxmeyer HE.

Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling.

J Exp Med. 2000 Sep 4;192(5):719-28.

120. Zheng R, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG, Small D.

Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression.

Blood. 2004 Mar 1;103(5):1883-90.

121. Zheng R, Friedman AD, Small D.

Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations.

Blood. 2002 Dec 1;100(12):4154-61.

6 Danksagungen

Die vorliegende Dissertation wurde in der Medizinischen Klinik A – Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Leitung: Prof. Dr. Wolfgang E. Berdel – der Westfälischen Wilhelms Universität Münster angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die mich auf so vielfältige Art und Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben:

- a. Bei Herrn Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow und Herrn Prof. Dr. Hubert Serve für die Überlassung des Themas, für die notwendigen Mittel und Ressourcen und die gesamte Betreuung dieser Dissertation,
- b. bei Herrn Dr. Björn Steffen für das so große Engagement in der methodischen und bis zum Schluss auch redaktionellen Mitbetreuung,
- c. bei Herrn Dr. Bülent Sargin für die Unterstützung bei vielen Labortechniken und
- d. bei den Mitarbeitern des ICP-Labors.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mir erst die Möglichkeiten zum Studium und damit zu dieser Arbeit gegeben haben und ohne deren fortwährende Unterstützung und Fürsprache die Erstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.