

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

FLT3 Mutationen in akuter myeloischer Leukämie: Auswirkungen auf die Wirksamkeit von
spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Bastian Lorenz Schubert
aus Tübingen

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12.07.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Akute Myeloische Leukämie	3
2.2 FMS-Like Tyrosine Kinase 3.....	7
2.2.1 Aufbau.....	8
2.2.2 Funktionsweise der FLT3 Kinase	9
2.2.3 Interne Tandemduplikationen.....	9
2.2.4 Punktmutationen	10
2.3 Tyrosinkinaseinhibitoren	11
2.3.1 TKi der ersten Generation – Beispiel Midostaurin	12
2.3.2 Quizartinib (AC220).....	13
2.3.3 Resistenzmechanismen	13
2.3.4 Crenolanib.....	15
2.3.5 BS228 – der neue FLT3i	15
2.4 Ba/F3 Zellen und Interleukin-3.....	16
3 Material	17
3.1 Chemikalien.....	17
3.2 Puffer und Lösungen.....	18
3.2.1 Western Blot-Analyse.....	18
3.2.2 Durchflusszytometrie.....	19
3.3 Acrylamidgele	19
3.4 Inhibitoren	20
3.5 Medien und Medienzusätze	20
3.6 Zelllinie.....	20

3.7	Antikörper	21
3.7.1	Primäre Antikörper	21
3.7.2	Sekundäre Antikörper.....	21
3.8	Geräte und Apparaturen	22
3.9	Labormaterialien	23
3.10	Software.....	23
4	Methoden	24
4.1	Zellkultur	24
4.1.1	Kultivierung	24
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Ba/F3 Zellen.....	25
4.2	Vorbereitung und Behandlung mit Inhibitoren.....	26
4.2.1	Bestimmung der Zellkonzentration	26
4.2.2	Aussaat	26
4.2.3	Behandlung mit Inhibitoren.....	27
4.3	Herstellen von Gesamtzellextrakten	27
4.3.1	Ernte und Herstellen der Gesamtzellextrakte	27
4.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	28
4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	29
4.5	Western Blot	30
4.6	Durchflusszytometrie	31
4.6.1	Propidiumjodid Färbung	31
4.6.2	Annexin V-FITC/PI Färbung	32
5	Ergebnisse	34
5.1	IL-3 vermittelt Phosphorylierung von STAT5 in Ba/F3 WT Zellen	34
5.2	TKi reduzieren die Phosphorylierung von FLT3 Mutationen und STAT5	35
5.2.1	Vergleich verschiedener TKi nach 2-stündiger Behandlung.....	35
5.2.2	Vergleich verschiedener TKi nach 4-stündiger Behandlung.....	37
5.2.3	Direkter Vergleich von Mutanten mit ähnlicher Proteinausprägung nach Behandlung mit gesteigerter Dosis	39

5.2.4 Übersicht: Ergebnisse der Western Blot-Analysen.....	40
5.3 Einfluss der TKi auf den Zellzyklus	41
5.3.1 Langzeitbehandlung mit verschiedenen TKi über 24 h.....	41
5.3.2 Langzeitbehandlung mit verschiedenen TKi über 48 h.....	45
5.3.3 Langzeitbehandlung mit verschiedenen TKi über 72 h.....	48
5.3.4 Übersicht: Einfluss der TKi auf den Zellzyklus	51
5.4 Zelltod-Analyse nach Behandlung mit TKi über 48 h	52
6 Diskussion.....	56
6.1 Vor- und Nachteile des Versuchsaufbau.....	57
6.2 Einfluss von AC220, Crenolanib und BS228 auf den FLT3-Signalweg.....	58
6.3 BS228 blockiert den Zellzyklus	62
6.4 FLT3i vermittelte Zellzyklus-Blockade führt zum Zelltod	66
6.5 Fazit und Ausblick.....	67
7 Zusammenfassung.....	69
8 Literaturverzeichnis	71
9 Anhang.....	77
9.1 BS228 reduziert Phosphorylierung von FLT3 ITD und STAT5	77
Danksagung	78
Curriculum Vitae.....	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	10 ⁻⁶ Gramm, Mikrogramm
µL	10 ⁻⁶ Liter, Mikroliter
µM (µmol/L)	10 ⁻⁶ Mol/Liter, Mikromolar
Ad	Auffüllen auf
AKT	Proteinkinase B
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
AML	Akute Myeloische Leukämie
AML, NOS	AML, <i>Not Otherwise Specified</i>
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASXL1	<i>Additional sex combs-like 1</i>
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)
Bzw.	Beziehungsweise
C	Konzentration
Ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
D	Asparaginsäure
DFG-Motiv	Asparaginsäure-Phenylalanin-Glycin-Motiv
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Downstream Signal</i>	nachgeschaltetes Protein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>Event-Free Survival</i> (ereignisfreies Überleben)
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

Et al.	Und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	FLT3-Ligand
FLK1	<i>Fetal Liver Kinase 1</i>
FLK2	<i>Fetal Liver Kinase 2</i>
FLT3	<i>FMS-Like Tyrosine Kinase 3</i>
FLT3i	FLT3 Inhibitor
FLT3 WT	FLT3 Wildtyp
FMS	<i>Colony stimulating factor 1R</i> <i>≈ McDonough feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
Go	Gemtuzumab Ozogamicin
h	Stunde
H ₂ O _{bidest.}	Bidestilliertes Wasser
HCDM	<i>Human Cell Differentiation Molecules</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitorkonzentration
IL-3	Interleukin-3
ITD	Interne Tandemduplikation
JAK2	Janus Kinase 2
JM	Juxtamembrandomäne
K	Lysin
kDa	10 ³ Dalton, Kilodalton
KIT	<i>Steel factor receptor</i>
KMT2A	Lysin Methyltransferase 2A
LTK	<i>Leukocyte receptor Tyrosine Kinase</i>
mA	10 ⁻³ Ampere, Milliampere
MDS	Myelodysplastisches Syndrom

Abkürzungsverzeichnis

MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase</i>
mg	10 ⁻³ Gramm, Milligramm
mL	10 ⁻³ Liter, Milliliter
mM (mmol/L)	10 ⁻³ Mol/Liter, Millimolar
MPAL	<i>Mixed Phenotype Acute Leukemia</i>
MRC	<i>Myelodysplasia Related Changes</i>
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
nM (nmol/L)	10 ⁻⁹ Mol/Liter, Nanomolar
NP-40	Nonidet P-40
NPM1	Nucleophosmin 1
Oct-1	<i>Octamer-binding protein 1</i>
OS	<i>Overall Survival</i> (Gesamtüberleben)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer)
PDGFR α/β	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor α/β</i>
p-FLT3	Phosphorylierte FLT3
pH	<i>Pondus Hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumjodid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
p-STAT5	Phosphorylierter STAT5
RAS	<i>Rat Sarcoma</i> Protein
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> Protein
RET	<i>Rearrangement during Transfection</i>
RFS	<i>Relapse-Free Survival</i> (rezidivfreie Zeit)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

Abkürzungsverzeichnis

RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
RUNXT1	<i>RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
S. Kap.	Siehe Kapitel
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
STK-1	<i>Stem cell Tyrosine Kinase-1</i>
SYK	<i>Spleen Associated Tyrosine Kinase</i>
TAM	Transiente abnormale Myelopoese
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	TBS mit 0,05% Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TKD	Tyrosin Kinasedomäne
TKi	Tyrosinkinaseinhibitor
TP53	Tumor Protein p53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USA	<i>United States of America</i>
V	Volt, Volumen
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Y	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematischer Aufbau eines FLT3 Dimers.	8
Abbildung 2. Resistenzmechanismen gegen TKi.	15
Abbildung 3. Auswirkung von IL-3 auf p-STAT5.	34
Abbildung 4. Vergleich verschiedener TKi nach 2-stündiger Behandlung.	36
Abbildung 5. Vergleich verschiedener TKi nach 4-stündiger Behandlung.	38
Abbildung 6. Vergleich verschiedener TKi nach 2-stündiger Behandlung mit 20 nM.	40
Abbildung 7. Auswirkung auf den Zellzyklus nach 24 h.	42
Abbildung 8. SubG1-Fraktion nach 24-stündiger Behandlung.	43
Abbildung 9. Auswirkung auf den Zellzyklus nach 48 h.	46
Abbildung 10. SubG1-Fraktion nach 48-stündiger Behandlung.	47
Abbildung 11. Auswirkung auf den Zellzyklus nach 72 h.	49
Abbildung 12. SubG1-Fraktion nach 72-stündiger Behandlung.	50
Abbildung 13. Zelltod-Analyse nach 48 h.	54
Abbildung 14. Wirkung von BS228 gegen FLT3 ITD.	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Auszug aus der WHO Klassifikation der AML und verwandten Neoplasien.	5
Tabelle 2. Einteilung in Risikogruppen durch das European Leukemia Net.	6
Tabelle 3. Übersicht zur Induktionstherapie der AML.	7
Tabelle 4. Übersicht zu ausgewählten TKi.	12
Tabelle 5. Zusammensetzung der Nährmedien.	25
Tabelle 6. Erstellen einer Eichgeraden.	28
Tabelle 7. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus den Western Blot-Analysen.	41
Tabelle 8. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus den Durchflusszytometrischen-Analysen mit PI Färbungen.	52

1 Einleitung und Zielsetzung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine aggressive hämatopoetische Erkrankung, die aus unreifen myeloischen Progenitor- und Stammzellen des Knochenmarks hervorgeht. Die Prognose variiert je nach Alter und ist im hohen Lebensalter besonders ungünstig [1, 2].

Ungefähr ein Drittel der Patienten mit AML weisen genetische Veränderungen im *FLT3*-Gen (*FMS-like tyrosine kinase 3*) auf. Dieses kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase der Klasse III, die für die Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Zellen von Bedeutung ist. Der größte Teil dieser Mutationen sind Interne Tandemduplikationen (ITD), die in dem Bereich, der die Juxtamembrandomäne der FLT3 kodiert, vorliegen [3]. Sie gelten als besonders schlechter Prognose-Faktor für das Gesamtüberleben (OS) der Patienten [4-9]. Zudem haben sie als Treibermutation eine kausale Funktion in der Entstehung und dem Verlauf der AML [3, 10, 11]. Neben ITD sind regelmäßig Punktmutationen in der Tyrosin Kinasedomäne (TKD), seltener in der Juxtamembrandomäne, nachweisbar. In Kombination mit ITD verschlechtern sie die Prognose [12], wohingegen bei alleinigem Nachweis die prognostische Bedeutung nicht geklärt ist [3, 4, 12-14]. Allerdings können sie einen Resistenzmechanismus gegen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKi) darstellen [15, 16]. Beide Formen der Mutationen führen zu einer konstitutiv aktiven Kinase [3, 12]. In der Folge wird ein wichtiges nachgeschaltetes Protein (*Downstream Signal*) der FLT3 Kinase, der *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (STAT5), vermehrt aktiviert [3, 12].

Zudem wurden weitere Mutationen mit negativem oder positivem Einfluss beschrieben (Tabelle 1/2). Insgesamt ist die AML eine heterogene Erkrankung, deren Prognose durch verschiedene Mutationen und deren Zusammenwirken beeinflusst wird [4, 17]. Die Induktionstherapie „fitter“ Patienten beruht auf einer Kombinations-Chemotherapie (Tabelle 3), die je nach Subtyp mit weiteren Medikamenten ergänzt werden kann [18]. Angesichts der schlechten Prognose und dem zunehmenden Verständnis über die Pathogenese der AML, kommt der Entwicklung neuer Medikamente eine wichtige Rolle zu. Einen erfolgsversprechenden Ansatz bilden niedermolekulare FLT3 Inhibitoren (FLT3i). Sie bestehen aus kleinen Molekülen (*small molecules*), die direkt an die aktive (Typ 1 Inhibitoren) und/ oder die inaktive FLT3 Kinase (Typ 2 Inhibitoren) binden [3, 19]. Die erste Generation dieser Inhibitoren zeigte, aufgrund eingeschränkter Selektivität und Potenz, mäßige Erfolge. Eine Ausnahme stellt die

Kombination von Midostaurin mit Cytarabin/ Daunorubicin dar [3]. Mit der Entwicklung von FLT3i der zweiten Generation wird die FLT3 Kinase, bei gleichzeitiger geringerer Hemmung anderer Kinasen, potenter inhibiert. Ein Vertreter, Gilteritinib, wurde bereits in den USA zugelassen [20]. Weitere vielversprechende Inhibitoren sind Quizartinib (AC220), aus der Gruppe der Typ 2 Inhibitoren, und Crenolanib (CP-868,596), ein Typ 1 Inhibitor [3, 21]. Trotz guter Resultate wird die Wirkung auch solcher FLT3i durch Resistenzmechanismen, die im Verlauf der Behandlung auftreten, limitiert. Ein bekannter Mechanismus sind sekundäre Punktmutationen, die den Wirkungsverlust mitverursachen [19, 20].

Resistente Mutationen könnten durch die Entwicklung weiterer Wirkstoffe überwunden werden. Ergebnisse zu dem neuen Wirkstoff BS228 werden in dieser Arbeit präsentiert. Entwickelt wurde der Wirkstoff in der Arbeitsgruppe Mahboobi am Institut für Pharmazie der Universität Regensburg und als Marbotinib patentiert [22].

Ziel dieser Arbeit ist es BS228 in Bezug auf die Wirksamkeit gegen verschiedene FLT3 Mutationen zu testen. Als Maßstab dient ein Vergleich mit den FLT3i AC220 und Crenolanib. Als Modell wurden murine Ba/F3 Zellen mit einem FLT3 Wildtyp (FLT3 WT) und fünf verschiedenen FLT3 Mutationen verwendet. Darunter sind Punktmutationen und ITD. Konkret sollen drei Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche FLT3 Mutationen werden durch BS228 gehemmt? Führt deren Hemmung gleichzeitig zu einer verminderten Aktivierung des nachgeschalteten Proteins STAT5? Um dies zu untersuchen, werden Ba/F3 Zellen mit FLT3i behandelt und die Phosphorylierung der Proteine mit Hilfe von Western Blots dargestellt.
2. Welche Auswirkung hat BS228 auf den Zellzyklus? Dieser Frage wird mit einer Propidiumjodid Färbung (PI) und der anschließenden Analyse mittels Durchflusszytometrie nachgegangen.
3. Zuletzt soll eruiert werden, ob dem zu erwartenden Zellzyklus-Arrest der Übergang in den Zelltod folgt. Um dies zu ermitteln, werden die behandelten Ba/F3 Zellen mit Annexin V-FITC/PI gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht.

Den Arbeiten wurde ein Versuch zum Einfluss des Wachstumsfaktors Interleukin-3 (IL-3) auf die Phosphorylierung von STAT5 (p-STAT5) vorangestellt. Hintergrund ist, dass Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen zwar IL-3 unabhängig proliferieren, Zellen mit FLT3 WT diesen jedoch weiterhin benötigen [23, 24]. IL-3 aktiviert bekanntermaßen den STAT-Signalweg [25, 26]. Um diesen Zusammenhang für unser Zellmodell zu bestätigen, wurden Western Blots von Ba/F3 Zellen mit FLT3 WT mit und ohne Einfluss von IL-3 erstellt.

2 Literaturdiskussion

2.1 Akute Myeloische Leukämie

Die AML ist eine neoplastische Erkrankung myeloischer Zellen, die mit einer eingeschränkten Lebenserwartung einhergeht. Die 5-Jahres-Überlebensrate in der Gruppe der 55- bis 64-jährigen Patienten beträgt lediglich 23%. Patienten unter 30 Jahren haben hingegen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 60% [2, 18]. Erwähnenswert ist, dass die Erkrankung in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts vor der Entwicklung medikamentöser Therapien innerhalb eines Jahres tödlich verlief [2, 18, 27]. Eine Vielzahl neuer Medikamente, die in der Entwicklung sind, könnten dazu beitragen die Prognose weiter zu verbessern [28].

Die Inzidenz der AML liegt bei 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Mit steigendem Alter nimmt die Inzidenz deutlich zu. Das mediane Erkrankungsalter Erwachsener liegt bei 72 Jahren [18, 29]. Risikofaktoren stellen neben radioaktiver Strahlung, Benzole, Raucherstatus, Mineralöle, Farben, Ethylenoxide, Herbizide, Pestizide auch Zytostatika-Therapien in der Vorgeschichte und Vorerkrankungen wie das myelodysplastische Syndrom (MDS) dar [18, 30].

Pathophysiologisch kommt es zur überschießenden Proliferation eines oder mehrerer myeloischer Klone, die sich im Knochenmark ausbreiten und dadurch die physiologische Hämatopoese verhindern. Die Differenzierung dieser Zellen ist gehemmt, sodass sie nicht ausreifen. Die Klone können entweder aus Stammzellen (CD34+/CD38-) oder Progenitorzellen (CD34+/CD38+) hervorgehen [1, 18]. CD steht für *Cluster of Differentiation* und ist eine Charakterisierung von Oberflächenmarkern durch die Organisation *Human Cell Differentiation Molecules* (HCDM) mit Hilfe derer Zellen eingeteilt werden können [31, 32]. Im Verlauf der Erkrankung werden die unreifen Zellen (Blasten) in die Blutbahn ausgeschwemmt, wo sie bei besonders hohem Vorkommen eine Leukostase verursachen können. Wird ein Blasten-Anteil von mehr als 20% im peripheren Blut oder im Knochenmark festgestellt, ist ein Diagnosekriterium der AML erfüllt. AML spezifische Aberrationen gelten als weiteres Diagnosekriterium [1, 18].

Die Verdrängung der im Knochenmark physiologisch vorkommenden hämatopoetischen Stammzellen kann zu Granulozytopenie, Thrombozytopenie und Anämie führen und erklärt das klinische Erscheinungsbild der AML. Eine Granulozytopenie begünstigt Infektionen, die in einer lebensbedrohlichen Sepsis

resultieren können. Blutungen jeglicher Art können durch eine Thrombozytopenie verursacht werden. Diese kann klinisch in Form von Petechien, Ekchymosen und als Epistaxis auffallen. Symptome der Anämie können Leistungsminderung, Müdigkeit und Blässe bis hin zur Dyspnoe sein [18, 33].

Zyto- und molekulargenetisch präsentiert sich die AML sehr heterogen. Die Bandbreite der Mutationen wird aus der derzeitigen WHO Klassifikation, mit ihrer Gliederung in Subgruppen und Spezifikationen, ersichtlich (Tabelle 1) [34, 35]. Zudem konnten mit der Zeit einigen Mutationen ein positiver oder negativer Einfluss zugeordnet werden. Eine diesbezügliche Einteilung in drei Risikogruppen anhand genetischer Abweichungen kann dem *European Leukemia Net* (ELN) entnommen werden (Tabelle 2) [36]. Insbesondere Mutationen des *FLT3*-Gens spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AML. Dabei werden ITD von Punktmutationen unterschieden. ITD wurden als Treibermutation der AML identifiziert, wodurch sie die FLT3 Kinase als wichtigen Angriffspunkt für TKi verifizieren [10].

Die bisherige Induktionstherapie „fitter“ Patienten (Einteilung in „fitte“ und „unfitte“ Patienten entsprechend der Onkopedia Leitlinie [18]) basiert, im Falle der meisten Subgruppen, auf einer Chemotherapie mit Cytarabin für sieben Tage und einem Anthrazyklin für drei Tage. Je nach vorliegender Unterform kann die Chemotherapie mit weiteren Medikamenten, wie beispielsweise Midostaurin, einem TKi der ersten Generation, kombiniert und angepasst werden (Tabelle 3) [18, 36, 37].

Tabelle 1. Auszug aus der WHO Klassifikation der AML und verwandten Neoplasien [34, 35], angelehnt an die Onkopedia Leitlinie der AML [18].

Subgruppe	Spezifikation
AML mit wiederkehrenden genetischen Anomalien	AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 APL mit PML-RARA AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM AML (megakaryoblastisch) mit (1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 Vorläufige Spezifikation: AML mit BCR-ABL1 AML mit mutiertem NPM1 AML mit biallelischen Mutationen von CEBPA Vorläufige Spezifikation: AML mit mutiertem RUNX1
AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapieassoziierte myeloide Neoplasien	
AML, <i>Not Otherwise Specified</i> (NOS)	AML mit minimaler Differenzierung AML ohne Reifung AML mit Reifung Akute myelomonozytische Leukämie Akute monoblastische/ monozytische Leukämie Reine erythrozytäre Leukämie Akute megakaryoblastische Leukämie Akute basophile Leukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myeloisches Sarkom	
Myeloische Proliferationen, die mit dem Down Syndrom assoziiert sind	Transiente abnormale Myelopoese (TAM) Myeloische Leukämie assoziiert mit dem Down Syndrom
Blastische plasmacytoide dendritische Zell Neoplasie	
Akute Leukämien verschiedener Linien	Akute undifferenzierte Leukämie Gemischter Phenotyp Akute Leukämie (MPAL) mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 MPAL mit t(v;11q23.3); KMT2A verändert MPAL, B/myeloisch, NOS MPAL, T/myeloisch, NOS

Tabelle 2. Einteilung in Risikogruppen durch das European Leukemia Net [36], Auszug aus der Onkopedia Leitlinie der AML [18].

Risikogruppe	Aberrationen
Günstig	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD ^{niedrig*} Biallelisch mutiertes CEBPA
Intermediär	Mutiertes NPM1 mit FLT3-ITD ^{hoch*} Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD ^{niedrig*} (ohne ungünstige genetische Aberrationen) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A [§] Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); KMT2A-Genumlagerung t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (EVI1) -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen [†]) monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML)) Wildtyp-NPM1 mit FLT3-ITD ^{hoch*} Mutiertes RUNX1 [‡] Mutiertes ASXL1 [‡] Mutiertes TP53

* FLT3-ITD^{niedrig} = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient <0,5; FLT3-ITD^{hoch} = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient ≥0,5. Bestimmung über semi-quantitative Messung des FLT3-ITD Allel-Quotienten mittels DNA-Fragment-Analyse als Quotient der AUC für FLT3-ITD dividiert durch die AUC für FLT3-Wildtyp

§ in Anwesenheit seltenerer als ungünstig eingestufte Aberrationen „sticht“ die t(9;11), d.h. sie gibt den Ausschlag für eine Einstufung in die intermediäre Risikogruppe

† nur zutreffend, wenn nicht gleichzeitig eine der WHO-definierten AML-typischen Aberrationen vorliegt (d.h. t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) or t(3;3); AML mit BCR-ABL1).

‡ nur als ungünstig einzustufen, wenn keine als günstig eingestufte Aberrationen vorliegen, d.h. in Anwesenheit günstiger Veränderungen geben diese den Ausschlag für eine Einstufung in die günstige Risikogruppe

Tabelle 3. Übersicht zur Induktionstherapie der AML, Auszug aus der Onkopedia Leitlinie der AML [18].

	Subgruppen	Induktionstherapie
Alle Subgruppen außer APL und Patient ist „fit“	Core binding factor AML CD33 ⁺	7 + 3 ¹ + Go ²
	NPM1 Mutation mit FLT3 Wildtyp	7 + 3 ¹ + Go ²
	FLT3 Mutation (ITD oder Mutation in TKD)	7 + 3 ¹ + Midostaurin
	AML mit myelodysplastischen Veränderungen (MRC ³) oder Therapieassoziierte AML	CPX-351 ⁴
	Sonstige der intermediären Risikogruppe (Tabelle 2) mit CD33 ⁺	7 + 3 ¹ + Go ²
	Sonstige der intermediären Risikogruppe (Tabelle 2) mit CD33 ⁻	7 + 3 ¹
	Sonstige der ungünstigen Risikogruppe (Tabelle 2)	7 + 3 ¹

¹ 7 +3 = Therapieschemata mit Cytarabin an 7 Tagen und Daunorubicin an 3 Tagen

² Go = Gemtuzumab Ozogamicin

³ MRC = Myelodysplasia Related Changes

⁴ CPX-351 = Cytarabin + Daunorubicin im festen Verhältnis 5:1, liposomal verkapselt

2.2 FMS-Like Tyrosine Kinase 3

Die FLT3 Kinase wurde erstmals 1991 von zwei unabhängigen Gruppen beschrieben und ist auch unter den Bezeichnungen *stem cell tyrosine kinase-1* (STK-1) und *fetal liver kinase-2* (FLK2), sowie dem *cluster of differentiation antigen 135* (CD135) bekannt. Zusammen mit dem *steel factor receptor* (KIT), dem *colony-stimulating factor 1R* (FMS) und dem *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFRα/β) gehört sie zur Klasse III der Rezeptortyrosinkinase. In der normalen Hämatopoese ist sie von essenzieller Bedeutung für die reguläre Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen [38-43]. Sie kommt als reife und unreife Form vor. Erstere ist hyperglykosyliert und in der Zellmembran lokalisiert. Die unreife Form ist hypoglykosyliert, mannosehaltig und intrazellulär nachweisbar [44].

2.2.1 Aufbau

Wie auch andere Rezeptortyrosinkinasen der Klasse III besteht die FLT3 Kinase aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne, einer Juxtamembrandomäne (JM) und zwei Kinase-Domänen (Abbildung 1).

Die extrazelluläre Komponente besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Subdomänen. Die äußeren drei können den FLT3-Liganden (FL) binden, während die inneren zwei zusammen mit der Transmembrandomäne an der Verankerung in der Zellmembran beteiligt sind. Intrazellulär schließt sich die JM an, die wiederum mit einer zweiteiligen Kinase-Domäne (TKD1 und TKD2) verbunden ist. TKD1 und TKD2 werden durch die Kinase Insert Domäne getrennt. Zwischen diesen befindet sich die Aktivierungsschleife, die aus einer langen Peptidkette besteht. In der inaktiven Kinase liegt sie in der ATP-Bindungstasche (Adenosin-5'-triphosphat), wodurch diese blockiert wird. Außerdem beinhaltet die Aktivierungsschleife ein DFG-Motiv (Asparaginsäure-Phenylalanin-Glycin), welches entsprechend der inaktiven oder der aktiven Kinase, in der DFG-out oder der DFG-in Konformation vorliegt [10, 11, 45].

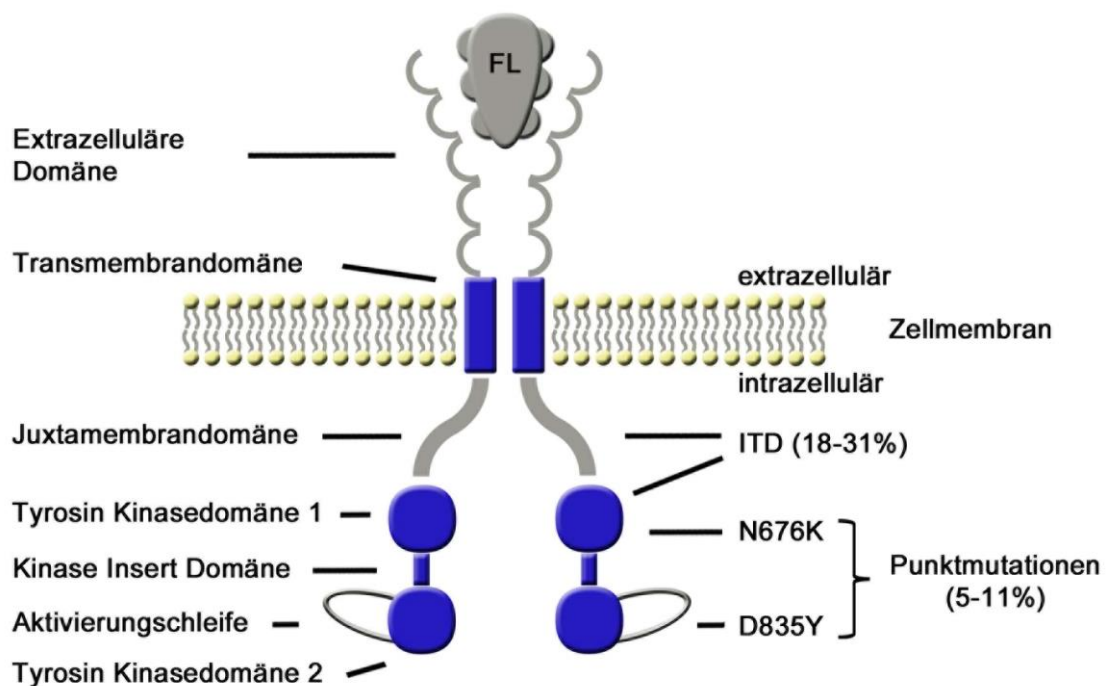


Abbildung 1. Schematischer Aufbau eines FLT3 Dimers. Bestandteile der FLT3 Kinase und typische Lokalisation von ITD und Punktmutationen, wie D835Y und N676K. Häufigkeit von ITD: 18-31% [3-9], Häufigkeit aller Punktmutationen: 5-11% [3-7, 12]. Darstellung angelehnt an [20, 22].

2.2.2 Funktionsweise der FLT3 Kinase

Die inaktive FLT3 Kinase liegt als Monomer vor. Ohne das Vorhandensein von FL, wird diese Konformation durch die autoinhibitorische Funktion der FLT3 Kinase stabilisiert. Dabei blockiert die JM sterisch die Aktivierungsschleife. Diese liegt in der DFG-out Konformation vor und versperrt ATP und Substraten den Zugang zur ATP-Bindungstasche [10, 11, 45].

Die Aktivierung der FLT3 Kinase durch Bindung von FL führt zur Rezeptordimerisierung in der JM. Daraufhin beginnt die Transphosphorylierung von Tyr 589 und Tyr 591 [45]. Es kommt zur Konformationsänderung der JM und dem Verlust der Autoinhibition. Durch die Konformationsänderung rotiert die N-terminale TKD1 um ca. 20° zur C-terminalen TKD2, wodurch die sterische Blockade der Aktivierungsschleife aufgehoben wird. Sie kann sich öffnen und gibt damit die Bindungsstellen für ATP und Substrate frei. Die intrazelluläre Signalkaskade kann nun aktiviert werden [11, 45]. Ein wichtiges nachgeschaltetes Protein (*Downstream Signal*) der FLT3 Kinase ist STAT5 [3, 46].

Die aktive Kinase wird durch Phosphorylierungen an Tyrosinresten stabilisiert. Die Deaktivierung erfolgt durch die Internalisierung des Rezeptors und die Dephosphorylierung durch zytoplasmatische Phosphatasen [11, 45].

2.2.3 Interne Tandemduplikationen

FLT3 ITD kommen in 18-31% aller AML Patienten vor und sind mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [3-9]. Sie wurden bereits 1996 entdeckt [47]. Das Gesamtüberleben und die rezidivfreie Zeit (RFS) sind bei Patienten mit ITD im Vergleich zu solchen ohne Mutation deutlich vermindert [48]. Meistens treten ITD in der JM auf (71%), sind jedoch auch zu 29% in der TKD1 zu finden [49]. Ihre Länge variiert zwischen 3 und 400 Basenpaaren. Unabhängig davon bleibt das Leseraster stets erhalten [9]. Die Länge der ITD wirkt sich negativ auf die Prognose aus [3].

ITD bewirken die konstitutive Aktivierung der FLT3 Kinase und gelten als Treibermutation der AML, was durch den Einsatz neuer TKi bestätigt wurde [10, 11, 50]. Die Behandlung mit dem potenten FLT3 Kinase Inhibitor AC220 führte bei AML Patienten mit FLT3 ITD zu sekundären Resistenzen. Daraus lässt sich schließen, dass die mutierten Zell-Klone einem selektiven Druck unterliegen und dementsprechend von FLT3 ITD abhängig sind [10, 11, 50].

Die intrazelluläre Signaltransduktion der FLT3 ITD unterscheidet sich von derjenigen der FLT3 WT [51]. In der Folge aktivieren FLT3 ITD in starkem Maße STAT5, was mit ihrer veränderten Lokalisation zusammenzuhängen scheint. Während FLT3 WT in der Zellmembran vorkommen, sind FLT3 ITD in der Nähe des Zellkerns nachweisbar [44, 52]. Letztendlich führt die konstitutive Aktivierung der FLT3 Kinase durch ITD zu einer gesteigerten Zell-Proliferation, verlängertem Zell-Überleben und einer gehemmten Zell-Differenzierung. Alle drei Prozesse sind wichtige Bausteine im Pathomechanismus der AML [53-55].

2.2.4 Punktmutationen

Die zweite Gruppe der FLT3-Mutationen sind Punktmutationen. Sie sind mit einer Häufigkeit von etwa 5-11% nachweisbar und damit deutlich seltener als FLT3 ITD [3-7, 12, 56]. Typischerweise sind sie in der Aktivierungsschleife der TKD2 lokalisiert (6-8%), 2% befinden sich jedoch in der JM und der extrazellulären Domäne [57, 58]. Die häufigste Punktmutation wird durch den Austausch einer Asparaginsäure durch Tyrosin an der Position 835 verursacht. Im Folgenden wird die Kurzschreibweise D835Y verwendet. Punktmutationen aktivieren die FLT3 Kinase ebenfalls konstitutiv. Die prognostische Relevanz von Punktmutationen bei alleinigem Nachweis ist, im Gegensatz zu FLT3 ITD, nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen [3, 12-14]. Eine große Studie konnte keine Reduktion des ereignisfreien Überlebens (EFS) und des Gesamtüberlebens nachweisen [12]. Dieselbe Studie zeigte aber auch, dass das Zusammentreffen einer Punktmutation und einer ITD einen negativen prognostischen Einfluss hat [12].

Die intrazelluläre Signaltransduktion der Punktmutationen ähnelt derjenigen der FLT3 ITD, scheint aber nicht identisch zu sein. Zum Beispiel wird STAT5 durch Punktmutationen in geringerem Maße als durch FLT3 ITD aktiviert [59, 60]. Als sekundäre Mutation bilden sie einen Resistenzmechanismus gegen TKi und sind daher bei der Auswahl geeigneter TKi von Bedeutung [15, 16].

2.3 Tyrosinkinaseinhibitoren

Die Tatsache, dass ITD als eine Treibermutation der AML bestätigt wurde, macht sie zu einem wichtigen Angriffspunkt für neue Medikamente. Konsequenterweise wurde in den letzten Jahren eine Reihe neuer niedermolekularer TKi mit verschiedenen Eigenschaften entwickelt. Sie sind in unterschiedlichen Versuchsphasen und wurden in verschiedenen Konstellationen, auch in Kombination mit anderen Therapieansätzen, getestet [10, 21, 37]. Der folgende Abschnitt vermittelt einen Überblick zu ausgewählten TKi (Tabelle 4).

TKi werden nach ihrer Potenz und Selektivität gegenüber anderen Kinasen in eine erste und zweite Generation eingeteilt. Die erste Generation besteht aus Multikinase-Inhibitoren wie Sunitinib, Sorafenib und Midostaurin. Diese hemmen die FLT3 Kinase eher unspezifisch. Stattdessen inhibieren sie weitere Kinasen wie KIT, PDGFR, RAS/RAF und VEGFR, wodurch ihre generelle Toxizität und das damit verbundene Nebenwirkungsprofil erhöht wird [3, 37].

Die zweite Generation der TKi ist deutlich potenter und selektiver für FLT3. Dementsprechend zeichnen sie sich durch eine erniedrigte halbmaximale Inhibitorkonzentration (IC_{50}) und weniger Nebenwirkungen, bedingt durch eine geringere Hemmung anderer Kinasen, aus. Wichtige Vertreter der zweiten Generation sind AC220, Crenolanib und Gilteritinib [3, 20, 37, 61]. Um die spezifische Wirkung der neuen TKi zu unterstreichen, wird der Begriff FLT3 Inhibitor (FLT3i) verwendet.

Außerdem unterscheiden sich TKi nach ihrem Bindungsmuster. Typ 1 Inhibitoren binden FLT3 Kinasen in der ATP-Bindungstasche und hemmen sowohl die aktive, als auch die inaktive Kinase. Crenolanib und Gilteritinib zählen zu den Typ 1 Inhibitoren. Im Gegensatz dazu binden Typ 2 Inhibitoren, wie AC220 und Sorafenib, allosterisch an eine hydrophobe Stelle neben der ATP-Bindungstasche. Diese ist nur in der inaktiven Kinase-Konformation zugänglich. Typ 2 Inhibitoren verhindern dadurch die Aktivierung der Kinase [3, 37]. Da die allosterische Bindungsstelle unter den Kinasen schlechter konserviert ist, als die ATP-Bindungsstelle, können Typ 2 Inhibitoren in der Regel selektiver als Typ 1 Inhibitoren binden [62].

Tabelle 4. Übersicht zu ausgewählten TKi [3, 19, 37, 63-65].

TKi	Generation	Bindungs- typ	inhibierte Kinasen	Grundgerüst
Midostaurin	1.	Typ 1	FLT3, PKC, SYK, FLK-1, AKT, PKA, KIT, FGR, SRC, PDGFR α/β , VEGFR 1/2	Indolcarbazol Alkaloid
Sorafenib	1.	Typ 2	RAF/MEK/ERK, BRAF, FLT3, VEGFR 1/2/3, PDGFR α/β	Biaryl Harnstoff Derivat
Quizartinib	2.	Typ 2	FLT3, KIT, RET, PDGFR α/β , FMS	Bisaryl Harnstoff Derivat
Crenolanib	2.	Typ 1	FLT3, PDGFR	Benzimidazol
Gilteritinib	2.	Typ 1	AXL, LTK, ALK, FLT3	Pyrazincarboxamid Derivat

2.3.1 TKi der ersten Generation – Beispiel Midostaurin

Die meisten TKi der ersten Generation haben sich weder als Mono-, noch als Kombinations-Therapie durchgesetzt, da sie häufig den gewünschten antileukämischen Effekt nicht erzielen. Eine Ausnahme stellt Midostaurin dar. Zwar zeigte es als Monotherapie in AML Patienten mit Rezidiv keine zufriedenstellende Wirkung, jedoch in Kombination mit der Standard 7+3 Chemotherapie [3, 66]. Hierbei wird Cytarabin für 7 Tage und ein Anthrazyklin, wie Daunorubicin, für 3 Tage verabreicht (Tabelle 3) [18]. In der zugrunde liegenden multinationalen, randomisierten, placebokontrollierten und doppelt verblindeten Phase 3 Studie (RATIFY) wurde Midostaurin mit Cytarabin und Daunorubicin als Induktionstherapie und anschließender Cytarabin Konsolidierungstherapie in Patienten mit neu diagnostizierter FLT3 mutierter AML verwendet. Die Vergleichsgruppe erhielt die 7+3 Chemotherapie. Die Studie stellte ein erhöhtes ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben unter Hinzunahme von Midostaurin fest [67]. Die Ergebnisse waren ausschlaggebend für die Entscheidung der FDA (*US Food and Drug Administration*) Midostaurin in Kombination mit Cytarabin und Daunorubicin als Induktionstherapie und anschließender Cytarabin Konsolidierungstherapie für die Behandlung neu diagnostizierter AML in Erwachsenen im April 2017 zuzulassen. Damit war Midostaurin der erste FLT3-Inhibitor, der für die Therapie der AML von der FDA akzeptiert

wurde [20]. Die Zulassung durch die *European Medicines Agency* (EMA) erfolgte im September 2017 [68]. Die Autoren der RATIFY-Studie weisen darauf hin, dass auch Patienten mit einem niedrigen FLT3 ITD-Anteil von der Hinzunahme Midostaurins profitierten. Das könnte daraufhin deuten, dass die Wirkung des Midostaurins nicht nur durch die Hemmung der FLT3 Kinase zustande kommt, sondern auch durch seine Eigenschaft als Multikinase-Inhibitor [3, 67].

2.3.2 Quizartinib (AC220)

AC220, ein Bisaryl-Harnstoff Abkömmling und FLT3i der zweiten Generation, ist sehr potent und selektiv gegenüber anderen Kinasen. *In vitro* hemmt es FLT3 Kinasen im nanomolaren Bereich. Als Typ 2 Inhibitor bindet es allosterisch an die inaktive Kinase, wodurch deren Aktivierung verhindert wird. Neben FLT3 Kinasen inhibiert AC220 auch KIT, PDGFR α/β , RET (*Rearrangement during Transfection*) und FMS, jedoch mindestens 10-fach geringer als FLT3 Kinasen [20, 69, 70].

In Japan wurde AC220 im Oktober 2019 für Patienten mit Rezidiv-AML und FLT3 ITD Mutation zugelassen [71]. EMA und FDA verwehrt hingegen die Zulassung für Patienten mit Rezidiv im Jahr 2019 [72, 73]. Ein Grund war, dass die mediane Überlebensdauer nur um 6 Wochen verbessert wurde. Zudem äußerten beide Institutionen Kritik an der zugrunde liegenden Phase 3 Studie (QuANTUM-R), da sie die Lebensverlängerung nicht ausreichend belege [20, 72-74]. Unabhängig von diesen Entscheidungen wird AC220 in Kombinationen mit anderen Medikamenten getestet. So zum Beispiel in Kombination mit Chemotherapie, analog zu der Anwendung von Midostaurin [20].

Als wesentliche Nebenwirkung sind eine anhaltende Zytopenie und eine verlängerte QT-Zeit hervorzuheben. Für die Zytopenie wird die Hemmung von KIT verantwortlich gemacht, das eine wichtige Rolle in der normalen Hämatopoese spielt. Die QT-Zeit Verlängerung wird durch eine Kalium-Kanal Blockade verursacht [20].

2.3.3 Resistenzmechanismen

Ein zentrales Problem bei der Anwendung von AC220 und anderen TKi stellen Resistenzmechanismen dar. Dadurch hält deren Wirkung in FLT3 ITD tragenden AML Patienten nur wenige Wochen an. Die Resistenzmechanismen werden in intrinsische und extrinsische unterteilt. Zu den intrinsischen Resistenzmechanismen

zählen sekundäre Punktmutationen, die Selektion von Klonen, die bereits eine resistente Mutation vor Therapiebeginn aufwiesen und die Aktivierung von weiteren Signalwegen. Zu den extrinsischen Mechanismen gehört die Kommunikation der Tumorzellen untereinander und der Einfluss des Knochenmarks auf die Tumorzellen (Abbildung 2) [19, 20].

In klinischen Studien wurde beobachtet, dass die Behandlung von AML Patienten mit AC220 den apoptotischen Zelluntergang peripherer Blasten bewirkt. Wohingegen Blasten im Knochenmark unter dem Einfluss von TKi einem Zellzyklusarrest unterliegen. Dies wird durch den Einfluss der Mikroumgebung des Knochenmarks erklärt [20, 75]. Dabei spielen sowohl direkte Zell-Zell Kontakte, als auch lösliche Botenstoffe, wie die vermehrte Ausschüttung von FL durch Stroma-Zellen [20], und die über ERK vermittelte Signalkaskade eine wichtige Rolle [75]. Eine vollständige Beseitigung der Blasten im Knochenmark mit TKi gelingt in der Regel nicht [75-77].

Einer der am besten untersuchten Resistenzmechanismen sind Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der FLT3. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass unter der Behandlung von AML Patienten, die eine FLT3 ITD tragen, mit AC220 sekundäre Punktmutationen entstanden, die zuvor nicht nachweisbar waren und die zu einem Wirkungsverlust des FLT3i führten [15, 16]. Dabei wurde besonders häufig die FLT3 ITD D835Y Mutation nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für den Wirkungsverlust des FLT3i ist eine Konformationsänderung der Kinase, die zu einer Stabilisierung der aktiven Form führt und damit zu einer Aktivierung der Signalkaskade. Typ 2 Inhibitoren, wie AC220, binden hingegen die inaktive Kinase [10, 15, 16, 78].

Eine weitere sekundäre Mutation ist die FLT3 ITD N676K. Hier ersetzt ein Lysin ein Asparagin an der Position 676. Diese Mutation wurde in einem AML Patienten mit Rezidiv unter der Behandlung von Midostaurin entdeckt [79]. Zudem wurde ein Wirkungsverlust gegenüber AC220 beschrieben [80]. Die Mutation ist in der ATP-Bindungsdomäne der TKD1 lokalisiert und bewirkt ebenfalls eine konstitutive Aktivierung der FLT3 Kinase. Opatz et al. schlussfolgern aus der Zusammenschau ihrer und weiterer Daten, dass die Kombination aus ITD und N676K die Kinase-Konformation verändert und dadurch die allosterische Bindungsstelle von AC220 verdeckt wird [80]. Zudem ist FLT3 ITD N676K intrazellulär nachweisbar, wodurch eine geringere Verfügbarkeit von AC220 die Resistenz begünstigen könnte [80].

Neben den oben genannten Mutationen, wurde in dieser Arbeit noch eine weitere Doppelmutationen mit FLT3 D835Y N676K untersucht. Insgesamt werden kombinierte Punktmutationen jedoch selten in Patienten mit AML nachgewiesen [12].

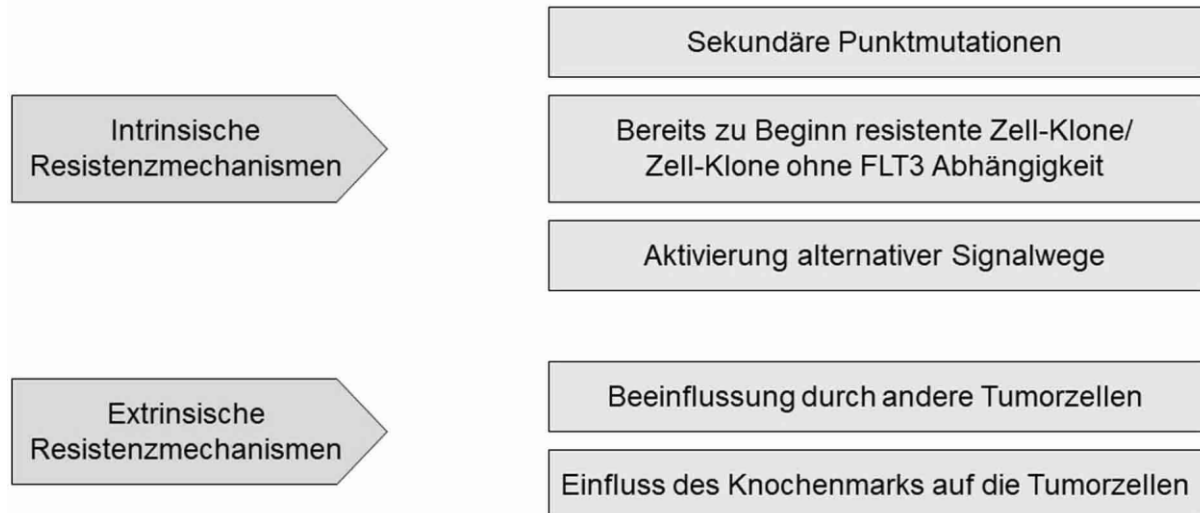


Abbildung 2. Resistenzmechanismen gegen TKI. Überblick über intrinsische und extrinsische Resistenzmechanismen [19, 20]. Crenolanib

Crenolanib kann einige gegen AC220 resistente sekundäre Mutationen inhibieren. Ursprünglich wurde Crenolanib als PDGFR-Inhibitor entwickelt und zunächst in soliden Tumoren getestet [81]. Es zählt wie AC220 zu den FLT3i der zweiten Generation. Im Gegensatz zu AC220 ist es jedoch ein Typ 1 Inhibitor und hemmt auch die aktive FLT3 Kinase. Dadurch gelingt es sekundäre Mutationen, die zu einem Wirkungsverlust von Typ 2 Inhibitoren führen, zu hemmen. Ein weiterer Vorteil von Crenolanib ist, dass es KIT im Vergleich zu AC220 weniger inhibiert, wodurch die Gefahr von Zytopenien reduziert wird [61, 62, 78, 82, 83]. Derzeit wird es in einer Phase 3 Studie in Kombination mit Chemotherapie getestet (NCT03250338) [84].

Trotzdem kommt es auch unter der Therapie mit Crenolanib zu Rezidiven. Die Mechanismen sind jedoch andere als bei AC220. Es konnten beispielsweise keine sekundären Mutationen als Ursache ausgemacht werden [85].

2.3.5 BS228 – der neue FLT3i

Die Ergebnisse bisheriger FLT3i sind vielversprechend und verdeutlichen das Potential der selektiven Hemmung von mutierten FLT3 Kinasen. Dennoch ist ihre Wirkung aufgrund unterschiedlicher Resistenzmechanismen von vorübergehender

Dauer. Vor diesem Hintergrund kommt der Entwicklung neuer Inhibitoren eine große Bedeutung zu. Ziel dieser Medikamente sollte eine möglichst breite Wirksamkeit gegen eine Vielzahl von Mutationen der FLT3 Kinase sein. Zusätzlich sollten sie andere Kinasen gar nicht oder nur wenig hemmen, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Zum einen könnte durch solche neuen FLT3i die Entstehung von einigen resistenten Zell-Klonen von vorneherein verhindert werden und zum anderen könnte die Therapie von Patienten mit resistenten Mutationen, für die es ansonsten nur wenige medikamentöse Optionen gibt, verbessert werden. Insgesamt könnte dadurch eine längerfristige Wirksamkeit der FLT3i ermöglicht werden [16, 19, 53].

In dieser Arbeit wird der neue FLT3i BS228 gegen Mutationen der FLT3 Kinase im Vergleich zu den vielversprechenden und viel untersuchten FLT3i AC220 und Crenolanib getestet. BS228 wurde in der Arbeitsgruppe Prof. Mahboobi am Institut für Pharmazie Regensburg auf der Basis eines Bis(1H-indol-2-yl)methanon Grundgerüsts entwickelt [86]. Zusätzlich wurde das mit einem tert-Butylisoxazolrest substituierte Bisaryl-Harnstoff Motiv des AC220 integriert und das Indolyl-System durch ein Benzofuranyl-System ersetzt [87]. Der neue FLT3i BS228 wurde unter dem Namen Marbotinib patentiert [22].

2.4 Ba/F3 Zellen und Interleukin-3

Als Basis für die Versuche dient die murine Pro-B-Zelllinie Ba/F3, die sich für Versuche mit Onkogenen bewährt hat [24]. Die Expression von FLT3 Mutationen ermöglicht den Zellen eine von dem Wachstumsfaktor IL-3 unabhängige Proliferation. Im Gegensatz dazu sind Ba/F3 FLT3 WT (später zur Vereinfachung nur als Ba/F3 WT bezeichnet) Zellen IL-3 abhängig [24]. Da IL-3 die Phosphorylierung von STAT5 vermittelt, ist ein vermehrtes Auftreten von p-STAT5 in Ba/F3 WT Zellen zu erwarten [25]. Die in dieser Arbeit verwendeten Ba/F3 Zellen exprimieren neben FLT3 WT sowohl Punktmutationen, als auch ITD und die Kombination von beiden. Konkret wurden Ba/F3 Zellen mit folgenden Mutationen verwendet: FLT3 ITD, FLT3 D835Y, FLT3 D835Y N676K, FLT3 ITD D835Y und FLT3 ITD N676K.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 40	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Annexin V-FITC	Miltenyi Biotec
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl₂)	Merck
Coomassie Brilliant Blau	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem
Glycin	Roth
Glycerin	Sigma-Aldrich
HEPES	Roth
Milchpulver <i>Blotting grade</i>, pulv., fettarm	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40 (NP-40)	Thermo Scientific Fluka
<i>Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific
<i>Phosphate Buffered Saline Dulbecco (PBS)</i>	Biochrom
Phosphorsäure	Roth
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich
<i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche
RNase A	Sigma-Aldrich
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)</i>	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Tween 20	Roth

3.2 Puffer und Lösungen

3.2.1 Western Blot-Analyse

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blotpuffer	100 mL 5x Lämmli Puffer 200 mL EtOH ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
Bradford Reagenz	50 mg Coomassie Brilliant Blau 25 mL Ethanol 50 mL H ₃ PO ₄ ad 500 mL H ₂ O _{bidest.}
5x Lämmli Puffer	30 g Tris 144 g Glycin ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
NET-N Lysepuffer 0,5%	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8 10% Glycerin 1 mM EDTA 0,5% NP-40 ad 200 ml H ₂ O _{bidest.}
1x SDS-Elektrophoresepuffer	200 mL 5x Lämmli Puffer 10 mL 10 % SDS ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
6x SDS-Probenpuffer (6x PP)	375 mM Tris, pH 6,8 12% SDS 30% Glycerin 500 mM DTT 0,01 Bromphenolblau
10x TBS pH 7,6	200 mM Tris 1,4 M NaCl ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}
TBS-T	100 mL 10x TBS 0,5 mL Tween ad 1000 mL H ₂ O _{bidest.}

3.2.2 Durchflusszytometrie

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10x Annexin V-Bindepuffer, pH 7,4	100 mM HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ 1% BSA ad 50 mL H ₂ O _{bidest.}
Propidiumjodid-Lösung	PI 50 µg/mL in PBS

3.3 Acrylamidgele

Sammelgel	Ansatz für 2 Gele (1 mm)
H ₂ O _{bidest.}	4,4 mL
Tris pH 6,8 1 M	760 µL
SDS 10% (w/v)	60 µL
Acrylamid	760 µL
APS 10% (w/v)	60 µL
TEMED	6 µL

Trenngel	Ansatz für 2 Gele 10% (1 mm)
H ₂ O _{bidest.}	5,7 mL
Tris pH 8,8 1,5 M	3 mL
SDS 10% (w/v)	120 µL
Acrylamid	3 mL
APS 10% (w/v)	60 µL
TEMED	6 µL

3.4 Inhibitoren

Name	Katalognummer	Hersteller
Crenolanib (CP-868,596)	S2730	Selleckchem
Quizartinib (AC220)	S1526	Selleckchem
BS228	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Mahboobi, Institut für Pharmazie, Universität Regensburg	

3.5 Medien und Medienzusätze

Name	Hersteller
RPMI-1640	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
WEHI-Zellen-Überstand (enthält IL-3)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Mandy Beyer, Universitätsmedizin Mainz, mit bestem Dank!

3.6 Zelllinie

Zelllinie	FLT3 Mutation	Wachstum	Eigenschaft	Quelle
Ba/F3	Wildtyp (WT)	IL-3 abhängig	Murine Pro-B Zellen, Suspensionszellen	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Toxikologie, Universitätsmedizin Mainz.
Ba/F3	ITD N676K	IL-3 unabhängig		
Ba/F3	D835Y			
Ba/F3	ITD D835Y			
Ba/F3	D835Y N676K			
Ba/F3	ITD			

ITD = Insertion von 36 Basenpaaren an der Position 598

3.7 Antikörper

3.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung in 2% Milchpulver/ TBS-T	Katalognummer	Hersteller
Anti-FLT3 (8F2)	Kaninchen	1:1000	3462	Cell Signaling
Anti-p-FLT3 (Tyr591)	Kaninchen	1:250	3461	Cell Signaling
Anti-STAT5	Maus	1:1000	610192	BD Biosciences
Anti-p-STAT5 (Tyr694)	Kaninchen	1:100	MA5-14973	Thermo Scientific
Anti- α-Tubulin	Kaninchen	1:1000	ab176560	Abcam

3.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung in 2% Milchpulver/ TBS-T	Hersteller
IgG Kaninchen IRDye 800CW	Ziege	1:10000	LI-COR Biosciences
IgG Maus IRDye 800CW	Ziege	1:10000	LI-COR Biosciences

3.8 Geräte und Apparaturen

Name	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe	Integra
Blottingapparatur Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Bildgebender Detektor für Western Blot Odyssey	Li-Cor Biosciences
Durchflusszytometer FACSCanto™	BD Biosciences
Elektrophoreseapparatur Protean Tetra System	Bio-Rad
Feinwaage Basic	Sartorius
Gefrierschrank VIP series -86 °C	SANYO
Gefrierschrank öko super	Liebherr
Gelgießapparatur	Bio-Rad
Lichtmikroskop Primovert	Zeiss
Pipette Pipet-Lite XLS	Rainin
Pipette AutoRep E	Rainin
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences
Plattformschüttler Rocking Platform	VWR
Rollmischer RM 5	CAT M. Zipperer GmbH
Rührplattform Variomag Mono	Thermo Scientific
Spannungsquelle PowerPac HC	Bio-Rad
Sterilbank LaminAir HB2472	Thermo Scientific
Thermomixer C	Eppendorf
Tischzentrifuge <i>Micro Centrifuge</i>	Roth
Ultraschall-Handgerät UP200Ht	Hielscher
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Waage PJ Precisa Junior	Swiss Quality
Wasserbad Aqualine AL 5	LAUDA
Zählkammer Neubauer	Marienfeld-Superior
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Scientific

3.9 Labormaterialien

Name	Hersteller
Cell star 6-well-Platte	Greiner Bio-one
Cell star 12-well-Platte	Greiner Bio-one
FACS-Röhrchen 5 ml REF 55.1579	Sarstedt
Nitrocellulose <i>Blotting Membrane</i>	GE Healthcare
Pasteurpipetten ohne Watte	Roth
Pipettenspitzen <i>BioClean Universal Tips</i>	Rainin
Pipettenspitzen Universal	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen 5 mL und 10 mL	Greiner Bio-one
Rotilabo-Mikrotestplatten Art.: 9293.1	Roth
Safe-Lock Tubes 1.5 mL	Eppendorf
Wasserbad Aqualine AL 5	LAUDA
Zellkulturflaschen <i>Cell Star</i>	Greiner Bio-one
Zentrifugenröhrchen 15 mL und 50 mL	Greiner Bio-one

3.10 Software

Name	Hersteller
Adobe Photoshop Elements 10.0	Adobe Systems Incorporated
Endnote X7.7.1	Thomson Reuters
FACSDiva Software	BD Biosciences
GraphPad Prism Version 6.01	GraphPad Software, Inc.
Image Studio Lite Version 5.2.5	Li-Cor Biosciences
Microsoft Office 365 Word 2016	Microsoft
Microsoft Office 365 Excel 2016	Microsoft

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die Zellkultur ist ein Verfahren, welches erlaubt bestimmte Zelllinien zu kultivieren und so genannte *in vitro* Versuche durchzuführen. Die Zellen werden dabei in einem geeigneten Nährmedium in speziellen Zellkulturflaschen aufbewahrt und in einem Brutschrank bei 37 °C gelagert. Regelmäßig wird ein Teil des Nährmediums ersetzt und die Zelldichte kontrolliert. Alle Arbeiten mit den Zellen geschehen schonend und unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank. Die in dieser Arbeit verwendeten murinen Ba/F3 Zellen sind Suspensions-Zellen, die sich zwar am Flaschenboden ablagern, aber sich gut durch vorsichtiges „Resuspendieren“ mit der Pipette aufwirbeln lassen.

4.1.1 Kultivierung

Für den Erhalt der Zellen wird mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Dichte der Zellsuspension abgeschätzt und anhand dessen festgelegt, in welchem Maße sie mit frischem Nährmedium verdünnt werden sollen („Splitten, Passagieren“). Meistens liegt das Verhältnis von Zellen zu frischem Nährmedium bei den Ba/F3 Zellen bei 1:10. In der Sterilbank werden die Zellen mit Hilfe einer 10 mL Pipette vorsichtig „resuspendiert“ und die zu verwerfende Menge entnommen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Pipette weder die Umgebung noch den Hals der Zellkulturflasche berührt. Nun kann die entsprechende Menge des zuvor im Wasserbad angewärmten Nährmediums hinzugegeben werden. Die Ba/F3 WT Zellen erhalten Nährmedium, welches aus RPMI-1640, 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 10% WEHI-Zellen-Überstand (enthält IL-3) besteht. Der WEHI-Zellen-Überstand wurde freundlicherweise von Frau Dr. Mandy Beyer zur Verfügung gestellt. Das Nährmedium für die Ba/F3 ITD, ITD N676K, D835Y, ITD D835Y und D835Y N676K Zellen besteht hingegen aus RPMI-1640, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (Tabelle 5). Anschließend kann die Zelldichte unter dem Mikroskop beurteilt werden. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt. Ba/F3 Zellen müssen in der Regel jeden zweiten Tag gesplittet werden. Die Zellkulturflaschen sollten in regelmäßigen Abständen von maximal zwei Wochen gewechselt werden.

Tabelle 5. Zusammensetzung der Nährmedien.

Nährmedium für Ba/F3 ITD, ITD N676K, D835Y, ITD D835Y, D835Y N676K Zellen	RPMI-1640 FCS 10% Penicillin/Streptomycin 1%
Nährmedium für Ba/F3 WT Zellen	RPMI-1640 FCS 10% Penicillin/Streptomycin 1% WEHI-Zellen-Überstand 10% (enthält IL-3)

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Ba/F3 Zellen

Um Zellen längerfristig zu erhalten, werden sie in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert. 10 mL der Zellsuspension werden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen in 1 mL FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) „resuspendiert“. DMSO soll verhindern, dass sich beim Einfrieren für die Zellen schädliche Eiskristalle bilden [88]. Die Zellsuspension wird nun in ein Kryo-Röhrchen überführt, und in einer Einfrierbox (gefüllt mit Isopropanol) für eine Woche bei – 80 °C gelagert und anschließend in den Stickstofftank überführt.

Um die eingefrorenen Zellen erneut zu kultivieren, müssen diese aufgetaut und in frisches Nährmedium überführt werden. Dabei wurde folgendes Procedere angewendet. In der Sterilbank wird in ein Zentrifugenröhrchen 5 mL und in eine Zellkulturflasche 9 mL des entsprechenden angewärmten Nährmediums pipettiert. Die eingefrorenen Zellen werden im Wasserbad aufgetaut und unmittelbar danach mit dem Nährmedium in dem Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Die Zellen werden nun in 1 mL frischem Nährmedium „resuspendiert“ und in die Zellkulturflasche überführt. Anschließend können die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt werden.

4.2 Vorbereitung und Behandlung mit Inhibitoren

4.2.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Zunächst werden die Zellen in der Zellkulturflasche „resuspendiert“ und 100 µL in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgt eine 1:2 Verdünnung durch die Zugabe von 100 µL Phosphatpuffer (PBS). Dabei wird ebenfalls „resuspendiert“. 10 µL der Zellsuspension werden auf die Neubauer Zählkammer übertragen und die Anzahl der Zellen unter dem Mikroskop ermittelt. Mithilfe der folgenden Formel kann anschließend die Zellkonzentration bestimmt werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor beträgt in diesem Fall: $\frac{2}{\text{mL}}$.

4.2.2 Aussaat

Das Aussäen der Zellen für die Versuche erfolgt in *well*-Platten. Zunächst wird die gewünschte Zellzahl pro Probe abhängig vom Versuch festgelegt, beispielsweise 10^6 Zellen pro Probe in 5 mL. Dann wird die insgesamt benötigte Zellzahl bestimmt. Die entsprechende Menge wird aus der Zellkulturflasche entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Nährmedium „resuspendiert“. Die Menge des Nährmediums, in dem die Zellen gelöst werden, richtet sich dabei nach der Anzahl der Proben. Sind beispielsweise sieben Proben gewünscht, werden 7 mL Nährmedium hinzugegeben. Nun wird in die Vertiefungen der *well*-Platte die gewünschte Menge des Nährmediums pipettiert und jeweils 1 mL der Zellsuspension hinzugefügt. Den Zellen wird anschließend eine Adaptationszeit im Brutschrank gewährt. Diese beträgt für Durchflusszytometrie-Analysen 2 h und für Western Blot-Analysen bis zum nächsten Tag.

4.2.3 Behandlung mit Inhibitoren

Für die verschiedenen Versuche wurden die Ba/F3 Zellen mit den Inhibitoren AC220, Crenolanib und BS228 behandelt. Für die Behandlung werden die Inhibitoren bei Raumtemperatur aufgetaut. Da diese in einer verhältnismäßig hohen Konzentration (100 μM) vorliegen, werden 1 μM Vorverdünnungen mit PBS angesetzt. Nun werden die bei der Aussaat vorbereiteten *well*-Platten aus dem Brutschrank entnommen und die zuvor errechneten Mengen der Inhibitoren in die entsprechenden Vertiefungen zu den Zellsuspensionen pipettiert. Anschließend werden die *well*-Platten mit einer waagerechten Bewegung, die der Form einer Acht gleicht, bewegt und die Inhibitoren somit in der Zellsuspension verteilt. Für die Dauer der Behandlung werden die Zellen im Brutschrank aufbewahrt.

4.3 Herstellen von Gesamtzellextrakten

4.3.1 Ernte und Herstellen der Gesamtzellextrakte

Die Ernte der Zellen findet auf Eis statt. Mit einer Pipette werden die Zellen aus der *well*-Platte in auf Eis stehende 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Eventuell in der *well*-Platte zurückgebliebene Zellen, werden mit 1 mL PBS gelöst und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen übertragen. Die Zellen werden bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und sammeln sich dadurch am Boden des Zentrifugenröhrchens (*Pellet*). Der Überstand wird verworfen und das *Pellet* in 1 mL PBS gelöst. Die gelösten Zellen werden in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und gekühlt (4 °C) zentrifugiert, diesmal bei 13300 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wird entfernt und die Zellen in Lysepuffer (der zuvor aus Net-N Lysepuffer, Protease Inhibitor [eine Tablette] und Phosphatase Inhibitor [1:100] angesetzt wurde) „resuspendiert“ und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Proben für 10 Sekunden und einer Amplitude von 40% sonifiziert. Die Lysate werden für 25 Minuten bei 13300 rpm gekühlt (4 °C) zentrifugiert, sodass sich ungelöste, feste Zellbestandteile am Boden des Eppendorf-Gefäßes sammeln. Der Überstand mit den lysierten Zellen wird in ein beschriftetes Eppendorf-Gefäß übertragen. Die Gesamtzellextrakte werden bei minus 20 °C gelagert.

4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford [89]

Das Verfahren wird genutzt, um die Proteinkonzentration der Gesamtzellextrakte kolorimetrisch zu ermitteln. Dafür wird eine kleine Menge der Gesamtzellextrakte entnommen und mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250 versetzt. Dieser bindet rasch an die Proteine der Gesamtzellextrakte und verändert dadurch sein Absorptionsmaximum (von 465 nm auf 595 nm). Es kommt zu einem Farbumschlag. Die Menge der Farbstoff-Protein-Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm haben, verhält sich proportional zum Proteingehalt der zu untersuchenden Probe. Durch die quantitative Detektion mit einem Photometer lässt sich mit Hilfe einer Eichgeraden die Proteinmenge der Probe ermitteln. Da das Messverfahren dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt, ist ein lineares Verhältnis zwischen Proteinkonzentration der Probe und Extinktion nur bis zu einer Extinktion von 1 gegeben. Die zu untersuchenden Proben der Gesamtzellextrakte werden daher verdünnt [89].

Zunächst werden 5 μL jedes Gesamtzellextraktes entnommen und diese mit je 45 μL destilliertem Wasser verdünnt (1:10). Für die Eichgerade werden verschiedene Proteinkonzentrationen mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt (Tabelle 6).

Tabelle 6. Erstellen einer Eichgeraden.

	H₂O_{bidest.} (μL)	1 mg/mL BSA (μL)	Konzentration ($\mu\text{g/mL}$)^a
0	30	0	0
A	28,5	1,5	2,5
B	27	3	5
C	24	6	10
D	21	9	15
E	18	12	20
F	15	15	25

^a Konzentration von BSA in der 96-*well*-Platte, nachdem 10 μL der entsprechenden BSA-Konzentration und 200 μL Bradford Reagenz zusammengeführt wurden.

Nun werden 10 μL als Doppelbestimmung jeder BSA-Konzentration nebeneinander in eine 96-*well*-Platte pipettiert. Gleiches geschieht mit den Proben. Anschließend werden 200 μL Bradford Reagenz hinzugegeben. Die 96-*well*-Platte wird

lichtgeschützt in Alufolie eingeschlagen und zügig mit einem Photometer bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Mit der Eichgeraden wird die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Gelelektrophorese werden die Proben so vorbereitet, dass sie alle die gleiche Proteinkonzentration und das gleiche Volumen besitzen. Dafür wird berechnet, welche Menge jeder Probe benötigt wird. Die entsprechenden Mengen werden entnommen und mit destilliertem Wasser auf ein einheitliches Volumen ausgeglichen. Jede Probe erhält anschließend 1/6 des Gesamt-Volumens als 6x Probenpuffer. Die Proben werden zum Schluss für fünf Minuten bei 800 rpm auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden sie bei minus 20 °C aufbewahrt.

4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [90]

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) denaturiert die Proteine und versieht diese mit einer negativen Gesamtladung. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht gelingt mit Hilfe eines Polyacrylamid-Gels, an dem eine Spannung anliegt. Die negativ geladenen Proteine bewegen sich im elektrischen Feld durch die Poren des Polyacrylamid-Gels in Richtung Anode und werden dabei nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Kleine Proteine werden schneller durch das Polyacrylamid-Gel gezogen, als große Proteine. Je höher der Anteil an Acrylamid im Gel, desto kleiner sind die Poren, was eine feinere Unterscheidung der Proteine erlaubt [91].

Nach Möglichkeit werden die Gele für die SDS-Gelelektrophorese am Vortag gegossen. Zunächst wird das Trenngel zubereitet (s. Kap. 3.3) und zwischen zwei, in einer Apparatur befestigten, Glasplatten pipettiert. Anschließend wird es mit Isopropanol beschichtet, was die Oberfläche des Gels glättet. Sobald das Trenngel ausgehärtet ist, wird das Isopropanol mit einem Filterpapier entfernt und das in der Zwischenzeit hergestellte Sammelgel aufgetragen. In das Sammelgel werden die Taschenkämme für 10 bzw. 15 Taschen eingesetzt. Die Gele können im Kühlschrank in feuchten Zellstoff gewickelt etwa eine Woche gelagert werden.

Für die SDS-Gelelektrophorese werden der Zellstoff und die Taschenkämme entfernt und die Glasplatten mit dem dazwischen befindlichen Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Die Gele stehen dabei in Elektrophoresepuffer und können nun beladen werden. Dafür werden 3,5 µL des Markers (*Page Ruler Plus*) und daneben die Proben aufgetragen. Die jeweils äußeren ungefüllten Taschen werden

mit 6x Probenpuffer beladen. Während die Proben durch das Sammelgel laufen, wird die Elektrophorese mit einer Spannung von 95 V betrieben. Sobald sie das Trenngel erreicht haben, kann die Spannung auf 125 V erhöht werden.

4.5 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, hier Nitrocellulose, die zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt elektrophoretisch. Freie Protein-Bindungsstellen auf der Membran werden durch 5% Trockenmilch, die in TBS-T gelöst ist, gesättigt. Anschließend wird die Membran mit einem spezifischen primären Antikörper inkubiert. Dieser wird durch einen infrarot markierten sekundären Antikörper gebunden. Die Emission kann durch einen Infrarot Fluoreszenz Detektor (Odyssey®) aufgenommen werden [92].

Der Western Blot folgt der Gelelektrophorese. Das Gel wird aus den Glasplatten herausgelöst und auf eine Membran zwischen zwei Filterpapiere gelegt. Dies geschieht in einem Gefäß mit Blotpuffer. Mit einem Röhrchen werden durch rollende Bewegungen behutsam Luftblasen zwischen dem Filterpapier und dem Gel entfernt. Alles zusammen wird zwischen zwei Schwämmen, in der mit Blotpuffer gefüllten und mit Kühlakkus bestückten Western Blot Apparatur, befestigt. Der Western Blot benötigt bei einer Stromstärke von 300 mA (pro Kammer) 2:10 h. Anschließend werden die Membranen entnommen und 5 Minuten in TBS-T gewaschen, bevor sie 1 h in Blockpuffer (5% Milchpulver/TBS-T) geschwenkt werden. Daraufhin werden sie dreimal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht in einem gekühlten Raum (5 °C) inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Membranen dreimal 5 Minuten in TBS-T gewaschen und für 2 h mit dem sekundären Antikörper (1:10000 Verdünnung in 2% Milchpulver/TBS-T) bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden sie erneut dreimal 5 Minuten in TBS-T gewaschen und mit einem Infrarot Fluoreszenz Detektor (Odyssey®) aufgenommen. Die entwickelten Membranen werden in Folie eingeschweißt und bei minus 20 °C gelagert.

4.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Quantifizierung von Zellen anhand bestimmter Merkmale. Dabei wird die Zellsuspension über eine dünne Kapillare angesaugt und die Zellen bzw. Zellfragmente vereinzelt. Mit Hilfe verschiedener Laser kann die Größe (*Forward Scatter*) und die Granularität (*Sideward Scatter*) der Zellen bestimmt werden [93]. Werden die Zellen zusätzlich vorher angefärbt, können weitere Informationen gewonnen werden.

4.6.1 Propidiumjodid Färbung

In diesem Fall wurde eine Propidiumjodid (PI) Färbung zur Darstellung des Zellzyklus verwendet [94, 95]. PI interkaliert in die DNA und ermöglicht mit Hilfe der Fluoreszenzintensität die Bestimmung des DNA-Gehalts. Durch diesen können Rückschlüsse auf die Zellzyklus-Phasen gezogen werden. Um den Durchtritt des PI nach intrazellulär durch die Zellmembran intakter Zellen zu ermöglichen, wird eine Fixierung in Ethanol vorgenommen. Außerdem werden die Zellen zuvor mit RNase inkubiert, um zu verhindern, dass das PI neben der DNA auch in die RNA interkaliert. Abgesehen von der DNA intakter Zellen markiert das PI auch jegliche weitere DNA-Stücke. Diese können beispielsweise aus Zellfragmenten stammen (*Debris*) [94, 95].

Während der Messung am Durchflusszytometer werden Ausschnitte (*Gates*) aller gefärbten Bestandteile definiert. Die *Gates* werden so angelegt, dass *Debris* und Zellen, die mit einer anderen Zelle zusammenhängen (doppelter DNA-Gehalt, ersichtlich an der doppelten Menge an PI), nicht mitberücksichtigt werden. Letztendlich lässt sich ein Profil erstellen, das darstellt, wie viele Zellen welcher Zellzyklus-Phase zugeordnet werden können. Zusätzlich zeigt ein *Gate* DNA-Fragmente. Für diese Klassifizierung werden vier *Gates*, entsprechend den Fraktionen subG1, G1, S und G2, definiert. In der G1-Fraktion befinden sich Zellen mit einem einfachen Chromosomensatz. Die S-Fraktion entspricht Zellen in der Replikationsphase und die G2-Fraktion zeigt Zellen mit einem doppelten Chromosomensatz. Dahingegen steht die subG1-Fraktion nicht für eine Zellzyklus-Phase, sondern repräsentiert den Bereich mit fragmentierter DNA. Diese Fraktion vergrößert sich, wenn Zellen dem Zelltod unterliegen. Das ist beispielsweise bei der Apoptose, einer Form des programmierten Zelltods, der Fall. Dabei kommt es zur Fragmentierung der DNA durch DNasen.

Dementsprechend stellen sich diese Zellen mit einem verminderten DNA-Gehalt dar. Ein Rückschluss auf die Art des Zelltods, wie beispielsweise die Unterscheidung zwischen Apoptose oder Nekrose (unkontrollierte Form des Zelltods) ist mit dieser Färbung jedoch nicht möglich [94, 95].

Für den Versuch werden die Ba/F3 Zellen zunächst ausgesät (s. Kap. 4.2.2) und mit den Inhibitoren behandelt (s. Kap. 4.2.3). Anschließend werden sie geerntet und direkt in auf Eis stehende Zentrifugenröhrchen überführt. Die Vertiefungen der *well*-Platte werden mit 1 mL PBS gespült, um restliche Zellen zu lösen und diese ebenfalls in die Flacons zu überführen. Es folgt die Zentrifugation bei 1300 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wird entsorgt und die Zellen in 100 µL kaltem (5 °C) PBS „resuspendiert“. Während die Zellen mit einem Vortexer aufgewirbelt werden, werden 2 mL minus 20 °C kaltes Ethanol (80%) tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen werden für 1 h bei minus 20 °C fixiert. Danach werden sie erneut bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und die Zellen in 333 µL PBS und 1 µL RNase A (10 mg/mL) „resuspendiert“ und in FACS-Röhrchen überführt. Es folgt eine 1-stündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Die Proben erhalten nun je 164 µL PI in einer Konzentration von 50 µg/mL und werden direkt im Durchflusszytometer FACSCanto™ gemessen. Die Einstellung der *Gates* erfolgt wie oben beschrieben. Für die anschließende Auswertung wurde Graph Pad Prism 6 verwendet.

4.6.2 Annexin V-FITC/PI Färbung

Die zweifache Färbung aus Annexin V-FITC und PI unterscheidet zwischen vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen [93, 96]. Während der Apoptose durchlaufen die Zellen verschiedene Veränderungen. Eine davon besteht darin, dass Phosphatidylserin (PS), ein negativ geladenes Phospholipid, an der Außenseite der Zellmembran präsentiert wird. Vitale Zellen weisen PS hauptsächlich auf der Innenseite der Zellmembran, also zum Zytosol zeigend, auf. Annexin V hat eine hohe Affinität zu PS und ermöglicht dieses spezifisch zu binden. Um Annexin V nachweisen zu können, wird es an einen fluoreszierenden Farbstoff (*Fluorescein Isothiocyanate* [FITC]) gekoppelt. Neben apoptotischen Zellen bindet es jedoch auch PS von nekrotischen Zellen, da diese eine gestörte Zellmembran Integrität aufweisen. Somit weist Annexin V-FITC apoptotische und nekrotische Zellen nach. Daher bedarf es einer zweiten Färbung, die helfen soll die beiden Formen des Zelltodes zu

unterscheiden. Hierfür wird eine PI Färbung genutzt. PI kann die intakte Membran von Zellen in der frühen Phase der Apoptose nicht durchdringen. Nekrotische Zellen und Zellen in der Spätphase der Apoptose weisen jedoch eine PI durchlässige Zellmembran auf. Dadurch kann das PI in die DNA interkalieren und diese markieren. Im Ergebnis stellen sich vitale Zellen Annexin V-FITC und PI negativ dar, während apoptotische Zellen in der frühen Phase Annexin V-FITC positiv und PI negativ erscheinen. Nekrotische Zellen und apoptotische Zellen in der Spätphase sind hingegen Annexin V-FITC und PI positiv [93, 96].

Für diese Färbung sind neben einer Annexin V-FITC/PI gefärbten und einer ungefärbten Kontroll-Probe auch drei mit 5 μ M Staurosporin behandelte Positivkontrollen nötig. Davon wird je eine Positivkontrolle mit PI, Annexin V-FITC und Annexin V-FITC/PI gefärbt. Diese werden als Referenz für die Einstellung des Durchflusszytometers benötigt.

Die Aussaat, die Behandlung mit Inhibitoren und die Ernte der Zellen erfolgen wie bei der PI Färbung (s. Kap. 4.6.1). Die Zellen werden auf Eis geerntet, bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird entfernt und die Zellen in 1 mL PBS gewaschen. Anschließend werden sie erneut bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entsorgt und die Zellen in 50 μ L 1x Annexin-Bindepuffer gelöst. Die Proben werden in FACS-Röhrchen überführt und erhalten je 2,5 μ L Annexin V-FITC (Ausnahme: die ungefärbte Kontrolle und die PI gefärbte Positivkontrolle). Es folgt eine 30-minütige Inkubationszeit in Dunkelheit auf Eis. Daraufhin werden 430 μ L 1x Annexin-Bindepuffer und 10 μ L PI-Lösung (50 μ g/mL) hinzugegeben (Ausnahme: ungefärbte Kontrolle und die Annexin V-FITC gefärbte Positivkontrolle). Die Messung erfolgt unverzüglich im Durchflusszytometer FACSCanto™. Die Auswertung wurde mit Graph Pad Prism 6 durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 IL-3 vermittelt Phosphorylierung von STAT5 in Ba/F3 WT Zellen

Ba/F3 WT Zellen benötigen für die Kultivierung den Wachstumsfaktor IL-3, der jedoch die Phosphorylierung von STAT5 vermittelt (s. Kap. 2.4). Um herauszufinden, wie stark die IL-3 bedingte Phosphorylierung von STAT5 ist, wurden Ba/F3 WT Zellen 4 h mit und ohne WEHI-Zellen-Überstand (enthält IL-3) kultiviert. Es wurden Gesamtzellextrakte erstellt und mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Western Blot untersucht. Zu erkennen sind die hyper- (150-160 kDa) und hypoglykosylierte Form (130-140 kDa) der FLT3 Kinase. Zudem lassen sich die zwei Banden der α - und β -Form des STAT5 identifizieren. Der gegen p-STAT5 gerichtete Antikörper detektiert lediglich die α -Form. Als Ladekontrolle dient α -Tubulin.

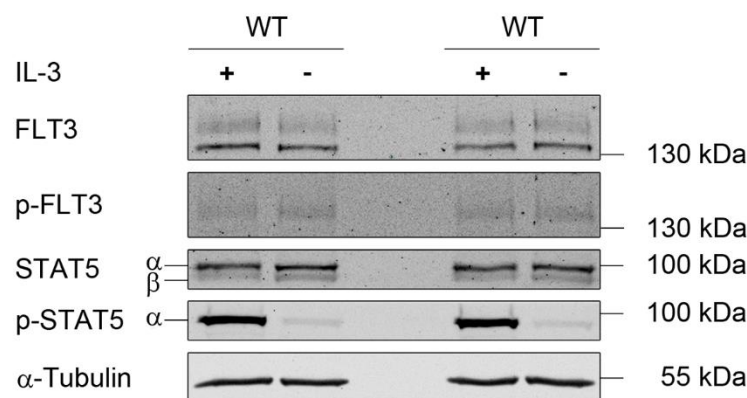


Abbildung 3. Auswirkung von IL-3 auf p-STAT5. Western Blot-Analyse von Ba/F3 WT Zellen, die für 4 h kein IL-3 erhielten, im Vergleich zu Ba/F3 WT Zellen, die in IL-3 haltigem Medium kultiviert wurden. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. n=2

Die Intensitäten der Banden des p-FLT3 zeigen keine Veränderungen nach 4-stündigem Mangel von IL-3 verglichen mit denen, die IL-3 erhielten. Dahingegen ist der Unterschied zwischen den Banden des p-STAT5 eindeutig sichtbar. Während bei Ba/F3 WT Zellen ohne IL-3 Einfluss kaum eine p-STAT5 Bande zu erkennen ist, sind die Banden des p-STAT5 unter IL-3 Einfluss sehr deutlich ausgeprägt (Abbildung 3). Dieser Versuch bestätigt, dass IL-3 maßgeblich zur Phosphorylierung von STAT5 in Ba/F3 WT Zellen beiträgt. Mit Rücksicht auf die Kultivierbarkeit der Ba/F3 WT Zellen erhielten diese weiterhin IL-3 haltiges Medium. Die starke Phosphorylierung des STAT5, bedingt durch IL-3, sollte jedoch in allen weiteren Versuchen berücksichtigt werden.

5.2 TKi reduzieren die Phosphorylierung von FLT3 Mutationen und STAT5

5.2.1 Vergleich verschiedener TKi nach 2-stündiger Behandlung

In diesem Versuch wurde der ersten Fragestellung, welche Wirkung die Inhibitoren AC220, BS228 und Crenolanib auf die Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 und der Aktivierung des in der Signalkaskade nachgeschalteten Proteins STAT5 haben, nachgegangen. Insbesondere sollte herausgefunden werden, ob es BS228 gleichermaßen wie den beiden anderen Inhibitoren gelingt die Phosphorylierung der FLT3 Mutationen und damit auch von STAT5 zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurden murine Ba/F3 Zellen mit äquimolaren Dosen (5 nM) der drei Inhibitoren über einen Zeitraum von 2 h behandelt.

Aufgrund der unterschiedlichen Proteinausprägungen sind insbesondere FLT3 ITD N676K und FLT3 ITD D835Y gut beurteilbar (Abbildung 4A-C). FLT3 ITD D835Y zeigen nach der Behandlung mit jedem der drei Inhibitoren eine Abnahme der Phosphorylierung. Gleichermäßen sind die dazugehörigen STAT5 vermindert phosphoryliert (Abbildung 4A-C). Ähnliches ist für FLT3 ITD N676K unter AC220 und BS228 zu beobachten. Unter beiden Inhibitoren ist eine verminderte Phosphorylierung, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, festzustellen (Abbildung 4A/B). Dahingegen ist die Phosphorylierung von FLT3 ITD N676K und STAT5 bei den mit Crenolanib behandelten Ba/F3 Zellen, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, nicht reduziert (Abbildung 4C).

Wie der vorangegangene Versuch zum Einfluss von IL-3 auf STAT5 erwarten ließ, ist STAT5 in Ba/F3 WT Zellen deutlich phosphoryliert. Die Banden der Gesamt FLT3 und STAT5, sowie die Ladekontrolle α -Tubulin weisen unter der Behandlung keine Veränderungen auf (Abbildung 4A-C).

Insgesamt gelingt es BS228 in diesem Versuch die Phosphorylierung von FLT3 ITD D835Y, sowie STAT5, vergleichbar mit AC220 und Crenolanib zu verringern. Die Phosphorylierung von FLT3 ITD N676K wird durch AC220 und BS228 gleichermaßen reduziert, wohingegen dies Crenolanib nicht gelingt. Da die Proteinausprägung der Mutationen FLT3 D835Y und FLT3 D835Y N676K gering ist, werden sie in einem späteren Versuch direkt miteinander verglichen (s. Kap. 5.2.3).

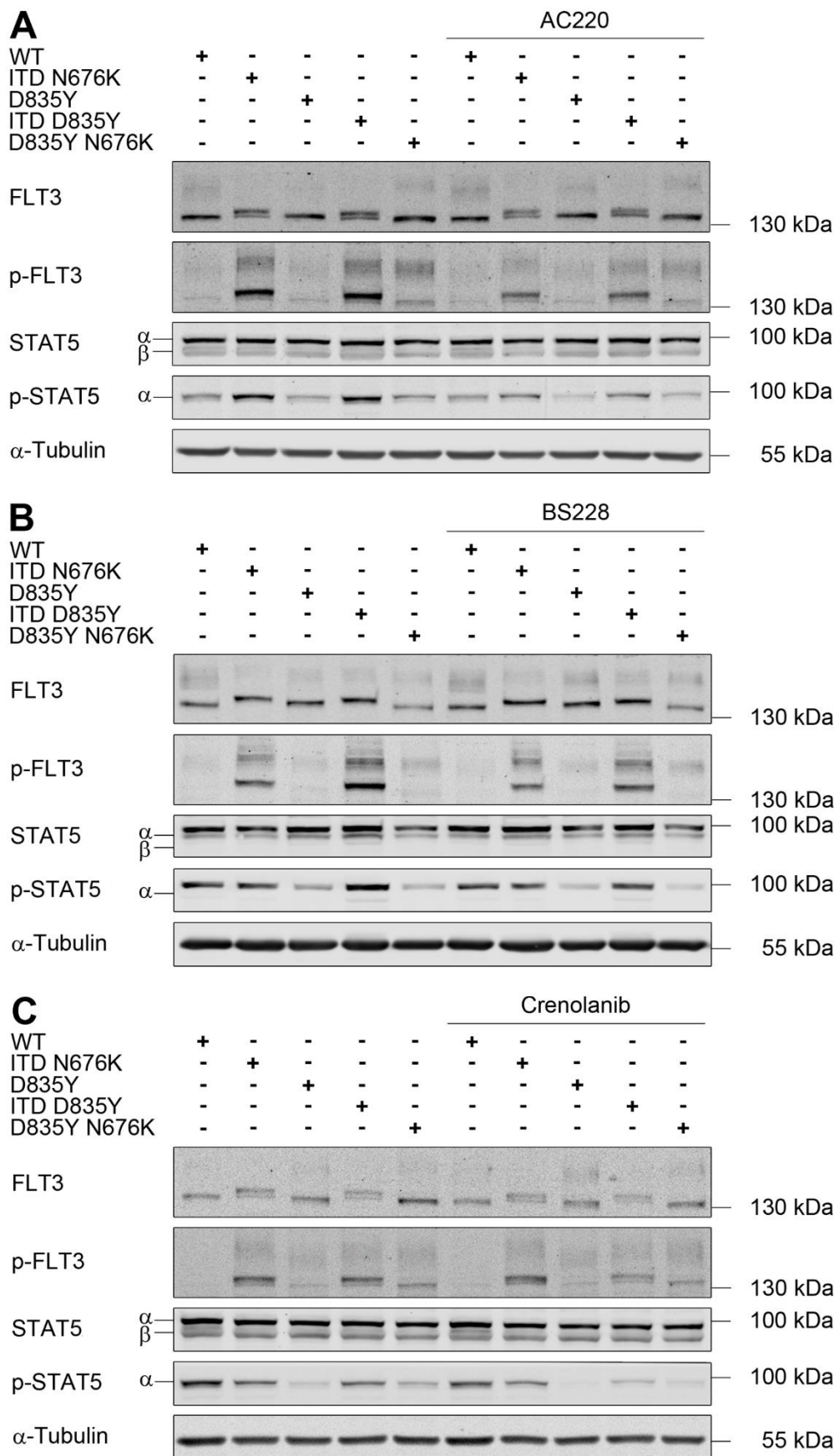


Abbildung 4. Vergleich verschiedener TKi nach 2-stündiger Behandlung. Ba/F3 WT Zellen und Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen wurden für 2 h mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib behandelt und mittels Western Blot analysiert. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. n=2. Außer **B** n=4.

5.2.2 Vergleich verschiedener TKi nach 4-stündiger Behandlung

Als Nächstes wurden Ba/F3 Zellen über einen längeren Zeitraum von 4 h mit äquimolaren Dosen (5 nM) AC220, BS228 und Crenolanib behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden ebenfalls mit Hilfe des Western Blots auf die zuvor genannten Proteine untersucht.

Im Wesentlichen bestätigen die Ergebnisse die Resultate des vorangegangenen Versuchs. Sowohl unter der Behandlung mit AC220, als auch unter BS228 ist eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von FLT3 ITD N676K und FLT3 ITD D835Y zu erkennen. Die jeweiligen STAT5 sind dementsprechend vermindert phosphoryliert. Hierbei reduziert BS228 vergleichbar mit AC220 die Phosphorylierung beider Mutationen (Abbildung 5A/B). Im Gegensatz dazu sind unter der Behandlung mit Crenolanib weder die phosphorylierte Form der FLT3 ITD N676K, noch der FLT3 ITD D835Y wesentlich vermindert. Ebenso wurden die dazugehörigen phosphorylierten STAT5 kaum reduziert (Abbildung 5C). Die Expression der Gesamt FLT3 und STAT5 sind unter der Behandlung unverändert. Ebenso sind die Banden des α -Tubulin gleichbleibend (Abbildung 5A-C).

Die 4-stündige Behandlung mit 5 nM der Inhibitoren zeigt, dass AC220 und BS228 die Phosphorylierung von FLT3 ITD N676K und FLT3 ITD D835Y, sowie der STAT5 vergleichbar reduzieren. Wohingegen unter Crenolanib diese Wirkung nicht zu erkennen ist.

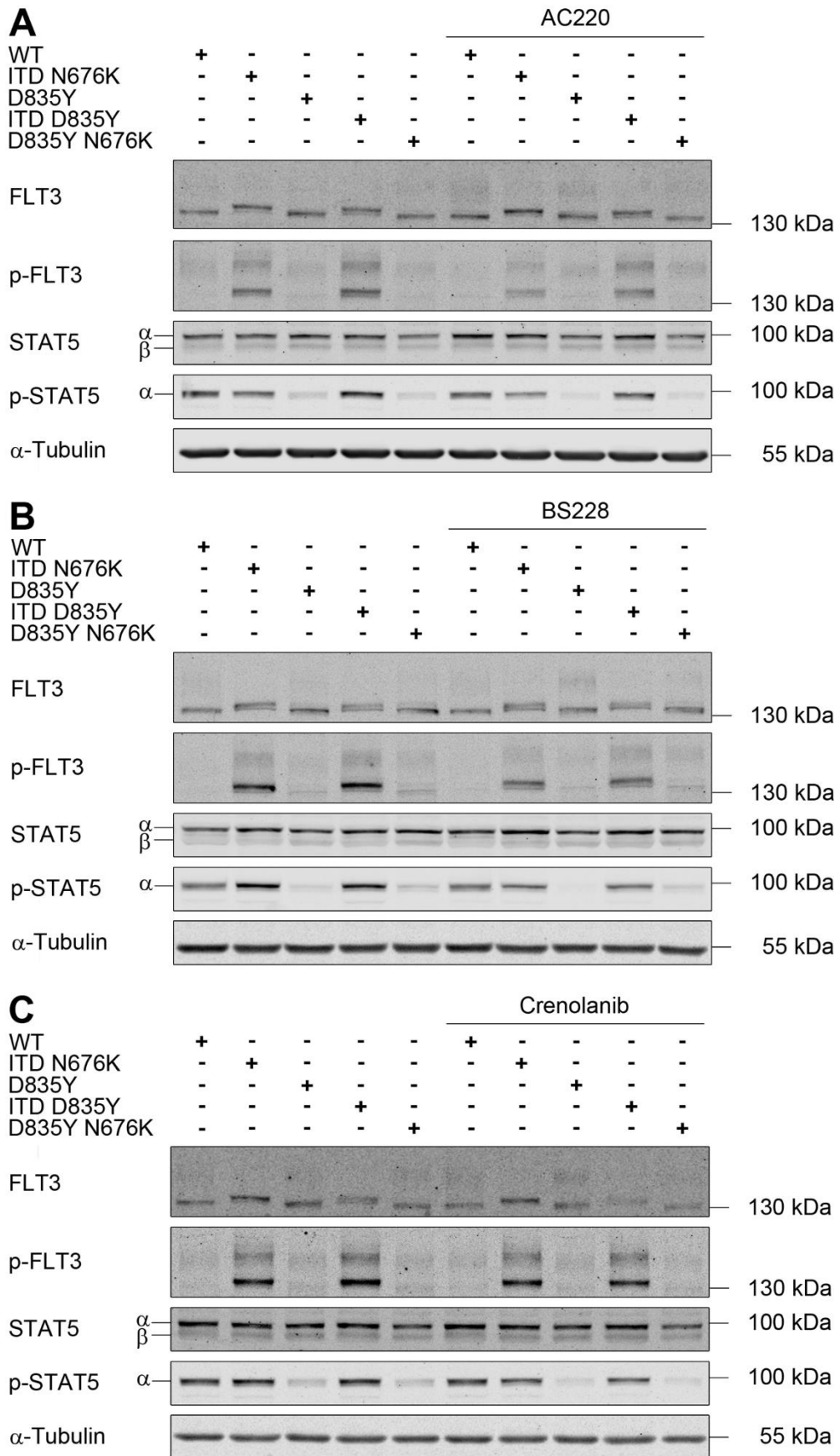


Abbildung 5. Vergleich verschiedener TKi nach 4-stündiger Behandlung. Ba/F3 WT Zellen und Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen wurden für 4 h mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib behandelt und mittels Western Blot analysiert. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. n=2.

5.2.3 Direkter Vergleich von Mutanten mit ähnlicher Proteinausprägung nach Behandlung mit gesteigerter Dosis

Um die Wirksamkeit der Inhibitoren besser bestimmen zu können, wurden in diesem Versuch Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen mit einer ähnlichen Proteinausprägung im Western Blot zusammen untersucht. Die Dosis von AC220, BS228 und Crenolanib wurde auf 20 nM erhöht und die Behandlungsdauer auf 2 h festgelegt.

Im Fall der FLT3 ITD D835Y ist eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung durch alle drei Inhibitoren, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, zu erkennen. Das trifft auch auf das nachgeschaltete Protein STAT5 zu und ist bei jedem der Inhibitoren vergleichbar ausgeprägt (Abbildung 6A). Anders stellt es sich bei FLT3 ITD N676K dar. Während AC220 und BS228 eindeutig die Phosphorylierung von FLT3 ITD N676K und STAT5 reduzieren, kann dies bei den mit Crenolanib behandelten Zellen nicht beobachtet werden (Abbildung 6A). Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen der vorherigen Versuche (s. Kap. 5.2.1 und 5.2.2). Die alleinige Punktmutation FLT3 D835Y weist unter dem Einfluss aller drei Inhibitoren, ebenso wie STAT5, eine verminderte Phosphorylierung, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, auf. Hierbei sind die Wirkungen der Inhibitoren annähernd gleich (Abbildung 6B). Im Falle der FLT3 D835Y N676K ist deren Phosphorylierung und die von STAT5 unter jedem Inhibitor reduziert. Die Wirkung von Crenolanib ist dabei am geringsten (Abbildung 6B). Die Banden der Gesamt FLT3 und STAT5 sind in den behandelten Proben unverändert im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Dasselbe trifft auf die Ladekontrolle α -Tubulin zu (Abbildung 6A/B).

Zusammenfassend zeigt der direkte Vergleich von FLT3 Mutationen mit ähnlicher Proteinausprägung in den Western Blots, dass alle drei FLT3i die Phosphorylierung von FLT3 ITD D835Y, FLT3 D835Y und FLT3 D835Y N676K, sowie den entsprechenden STAT5 beinahe gleichermaßen reduzieren. Davon abweichend sind die Ergebnisse der Mutation FLT3 ITD N676K. Während AC220 und BS228 die Phosphorylierung der FLT3 ITD N676K und STAT5 deutlich reduzieren, zeigt Crenolanib diese Wirkung nicht. Diese Beobachtung entspricht den Resultaten aus den beiden vorherigen Experimenten (s. Kap. 5.2.1 und 5.2.2).

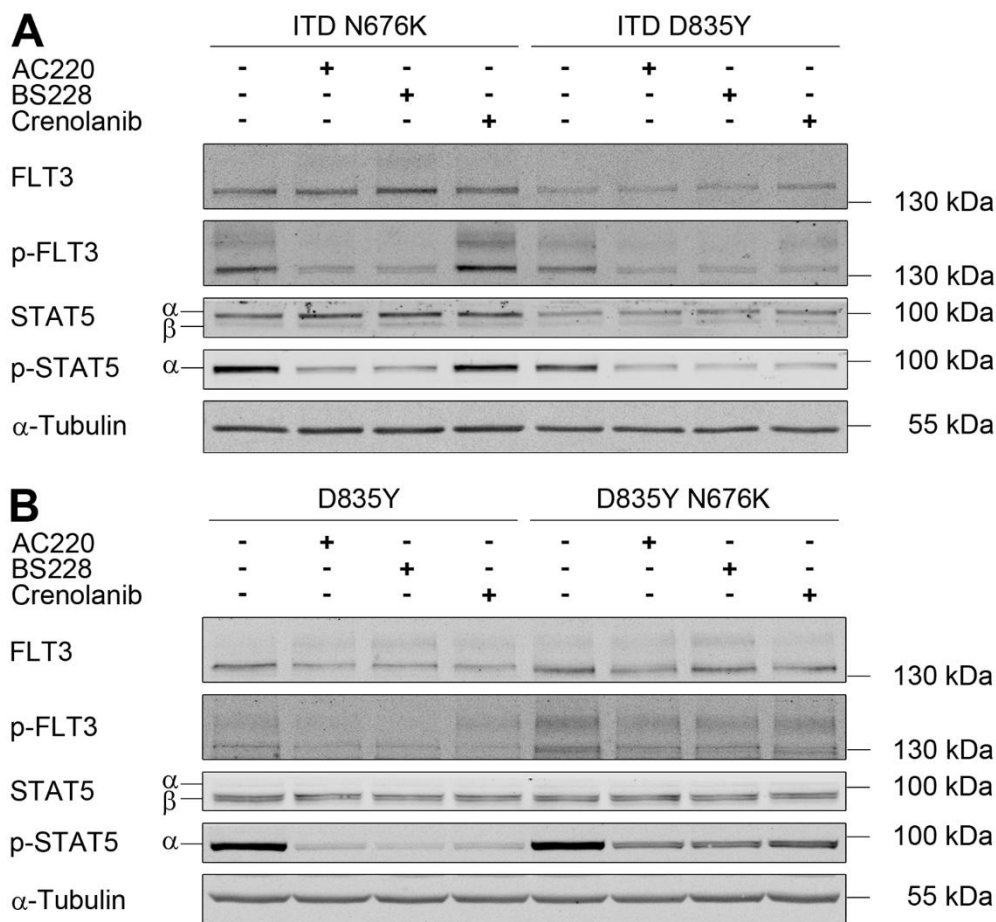


Abbildung 6. Vergleich verschiedener TKi nach 2-stündiger Behandlung mit 20 nM. Western Blot-Analyse von Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen mit ähnlich starker Ausprägung der Proteine im direkten Vergleich: **A** FLT3 ITD N676K und FLT3 ITD D835Y, **B** FLT3 D835Y und FLT3 D835Y N676K. Die Ba/F3 Zellen wurden mit 20 nM AC220, BS228 und Crenolanib über 2 h behandelt. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. n=2. Außer **B** n=3.

5.2.4 Übersicht: Ergebnisse der Western Blot-Analysen

Einen Überblick über die Ergebnisse der vorangegangenen Western Blot-Analysen soll Tabelle 7 vermitteln. AC220 gelingt es die Phosphorylierung aller getesteten FLT3 Mutationen und die nachgeschaltete Signalkaskade (gemessen an der Phosphorylierung von STAT5) zu blockieren. Crenolanib zeigt eine vergleichbare Wirkung in FLT3 D835Y und FLT3 ITD D835Y. Im Gegensatz dazu führt es jedoch nicht zu einer reduzierten Phosphorylierung der FLT3 ITD N676K. Zudem ist die Phosphorylierung der FLT3 D835Y N676K etwas geringer reduziert als durch AC220. Bemerkenswert ist, dass BS228 eine mit AC220 vergleichbare Reduktion der Phosphorylierung der getesteten FLT3 Mutationen erreicht. Die Wirkung gegen

FLT3 ITD N676K ist sogar deutlich besser als die von Crenolanib. Und auch die Phosphorylierung von FLT3 D835Y N676K wird durch BS228 deutlicher als durch Crenolanib herabgesetzt.

Tabelle 7. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus den vorangegangenen Western Blot-Analysen. ^a

Zelllinie	FLT3 Mutation	AC220	BS228	Crenolanib
Ba/F3	Wildtyp (WT)	-	-	-
Ba/F3	ITD N676K	++	++	-
Ba/F3	D835Y	++	++	++
Ba/F3	ITD D835Y	++	++	++
Ba/F3	D835Y N676K	++	++	+

^a – keine, + geringe, ++ ausgeprägte Reduktion der Phosphorylierung der FLT3 Mutationen und dem dazugehörigen STAT5 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Behandlung mit jeweils 5 nM TKi für 2 h und 4 h bzw. mit 20 nM für 2 h. Aussagen zu Ba/F3 D835Y und Ba/F3 D835Y N676K Zellen stützen sich insbesondere auf den zuletzt gezeigten Versuch (s. Kap. 5.2.3).

5.3 Einfluss der TKi auf den Zellzyklus

5.3.1 Langzeitbehandlung mit verschiedenen TKi über 24 h

Im folgenden Versuch sollte der Einfluss der Inhibitoren auf den Zellzyklus mit Hilfe einer PI Färbung und der Durchflusszytometrie untersucht werden. Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutation und dem FLT3 WT wurden zunächst für 24 h mit 5 nM AC220, BS228 und Crenolanib behandelt. Die Abbildungen zeigen den Zellzyklus und den Anteil fragmentierter DNA. Die Fraktionen G1, S und G2 entsprechen dem DNA-Gehalt der Zellen und bilden damit die Zellzyklusphasen ab. Die subG1-Fraktion entspricht hingegen fragmentierter DNA. Diese vergrößert sich, wenn Zellen dem Zelltod unterliegen. Sollte die Behandlung mit den TKi letztlich den Zelltod bedingen, ist ein Anstieg dieser Fraktion zu erwarten (s. Kap. 4.6.1).

Einen Überblick über die Verteilung des DNA-Gehalts ist in Abbildung 7 dargestellt. Besonders auffällig ist die Akkumulation von Zellen mit FLT3 D835Y in der G1-Phase unter allen drei Inhibitoren (Abbildung 7A-C). Unter der Behandlung mit AC220 nimmt diese von 43% auf 51% (Abbildung 7A), unter BS228 von 44% auf 63% (Abbildung 7B) und unter Crenolanib von 42% auf 56% zu (Abbildung 7C). Die übrigen Ba/F3 Zellen

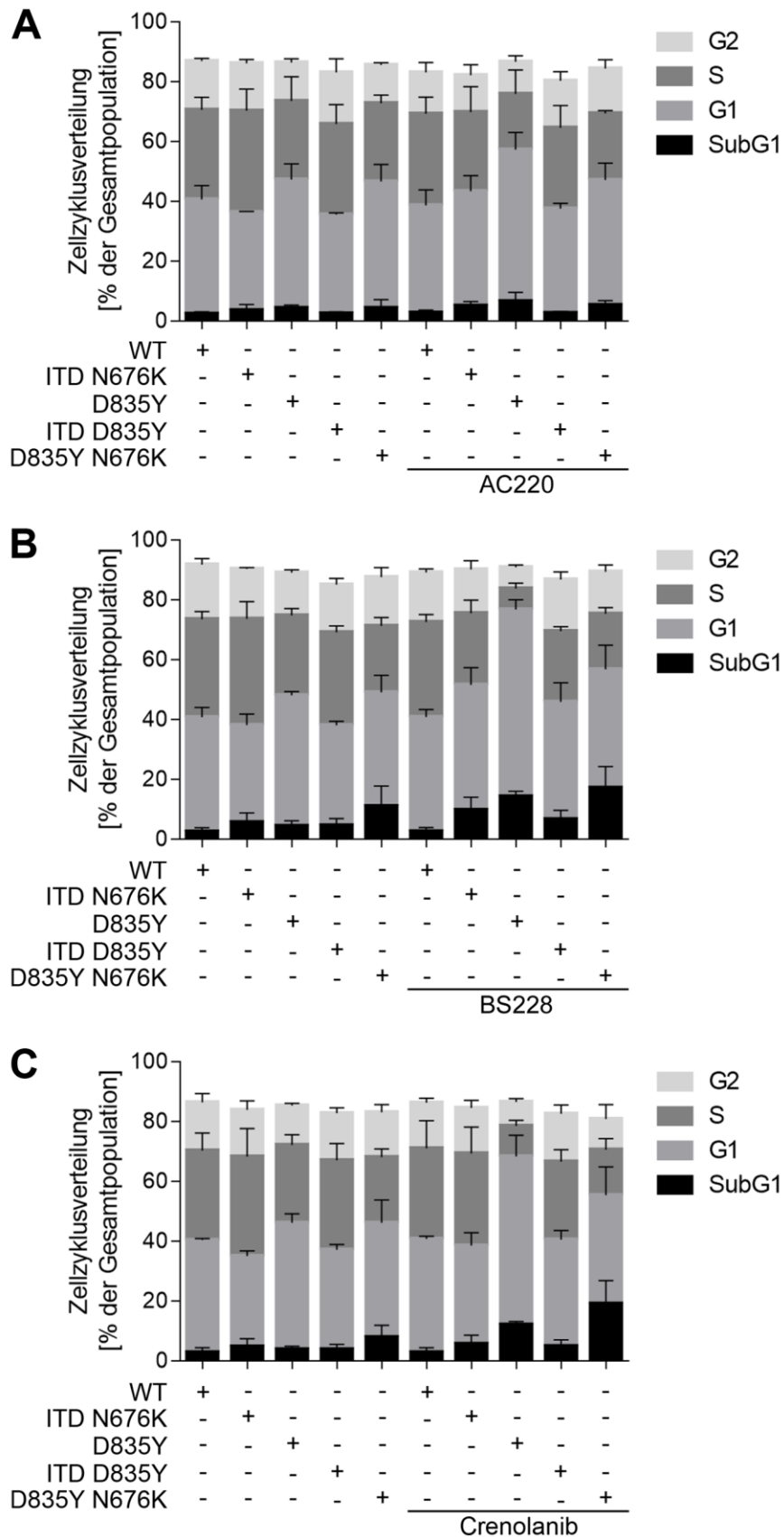


Abbildung 7. Auswirkung auf den Zellzyklus nach 24 h. Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung von Ba/F3 WT Zellen im Vergleich zu Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen nach Behandlung mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib über 24 h. Die Zellen wurden mit PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist der Mittelwert + SD. n=3.

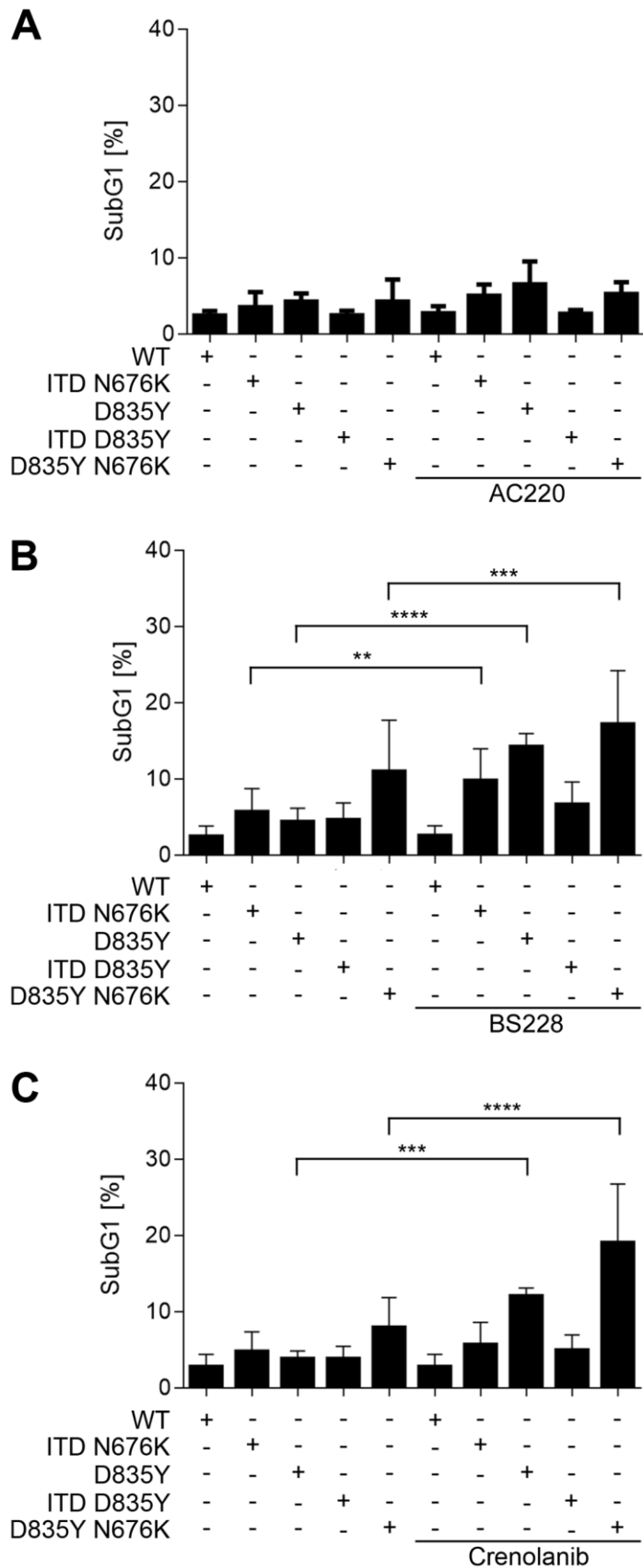


Abbildung 8. SubG1-Fraktion nach 24-stündiger Behandlung. Ba/F3 WT Zellen im Vergleich zu Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen nach Behandlung mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib. Two-way-ANOVA, Bonferroni-Korrektur. Als signifikant wurde $p < 0,05$ gewertet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Gezeigt ist der Mittelwert + SD. $n=3$.

Ergebnisse

mit FLT3 Mutationen zeigen hingegen nur teilweise Veränderungen in der G1-Phase (Abbildung 7A-C). Beispielsweise vergrößert sich die Anzahl von Zellen mit FLT3 ITD N676K in der G1-Phase unter der Behandlung mit AC220 von 33% auf 38% (Abbildung 7A), unter BS228 von 33% auf 42% (Abbildung 7B) und unter Crenolanib lediglich von 30% auf 33% (Abbildung 7C).

Die isolierte Darstellung der subG1-Fraktionen zeigt den Anteil mit fragmentierter DNA (Abbildung 8A-C). Unterschiede zwischen den einzelnen FLT3 Mutationen und den TKi werden so hervorgehoben. Zu erkennen ist, dass die Behandlung mit AC220 keine signifikanten Unterschiede der subG1-Fraktionen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen ergab (Abbildung 8A). Im Gegensatz dazu weisen Ba/F3 Zellen mit den Mutationen FLT3 ITD N676K, FLT3 D835Y und FLT3 D835Y N676K, die mit BS228 behandelt wurden, einen signifikanten Unterschied der subG1-Fraktion verglichen mit den unbehandelten Zellen auf. Unter der Inkubation mit BS228 ist in Zellen mit FLT3 ITD N676K ein Anstieg der subG1-Fraktionen von 6% auf 10%, in FLT3 D835Y von 4% auf 14% und in FLT3 D835Y N676K von 11% auf 17% zu erkennen (Abbildung 8B). Zudem sind unter Crenolanib die subG1-Fraktionen der Zellen mit FLT3 D835Y und FLT3 D835Y N676K signifikant erhöht. In Zellen mit FLT3 D835Y steigt der Anteil der subG1-Fraktion von 4% auf 12% und in Zellen mit FLT3 D835Y N676K von 8% auf 19% (Abbildung 8C). In Zellen mit FLT3 ITD D835Y sind die Veränderung der subG1-Fraktionen unter allen drei Inhibitoren marginal und nicht signifikant. Sie verändern sich nach der Inkubation mit AC220 von 2% auf 3%, mit BS228 von 5% auf 6% und mit Crenolanib von 4% auf 5% (Abbildung 8A-C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bereits nach der Behandlung mit TKi über 24 h Auswirkungen auf den Zellzyklus erkennbar sind. Insbesondere ist eine deutliche Akkumulation von Zellen in der G1-Phase festzustellen. Eindrücklich ist das in Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y nach der Behandlung mit allen drei TKi zu erkennen. Zudem stellen sich unter BS228 und Crenolanib signifikante Anstiege der subG1-Fraktion von Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y und D835Y N676K, sowie im Falle von BS228 zusätzlich von Ba/F3 Zellen mit FLT3 ITD N676K dar.

In einem weiteren Schritt wurde die Behandlungsdauer erhöht, um die Folgen für den Zellzyklus zu ergründen. Konkret ging es darum, ob sich die Akkumulation der Zellen in der G1-Phase zugunsten der subG1-Fraktion verschieben würde.

5.3.2 Langzeitbehandlung mit verschiedenen TKi über 48 h

In diesem Versuch wurden die Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen und mit dem FLT3 WT für 48 h mit 5 nM AC220, BS228 und Crenolanib behandelt. Die Färbung und Auswertung erfolgten analog zu der Behandlung über 24 h.

Die Zellzyklusverteilung zeigt, anders als der vorangegangene Versuch, dass der Anteil einiger Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen in der G1-Phase nach der Behandlung zugunsten der subG1-Fraktionen verringert ist. Am deutlichsten ist das in Zellen mit FLT3 D835Y nach der Behandlung mit BS228 und Crenolanib zu erkennen. Der Anteil der Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y in der G1-Phase, der mit BS228 behandelt wurde, reduziert sich, verglichen mit den unbehandelten Zellen, von 43% auf 20% und mit Crenolanib von 44% auf 25% (Abbildung 9B/C). Die Anzahl von Ba/F3 Zellen in der G1-Phase mit FLT3 D835Y N676K nach Behandlung mit BS228 ist von 40% auf 33% und mit Crenolanib von 37% auf 27% verringert (Abbildung 9B/C). Zellen mit FLT3 ITD N676K in der G1-Phase wurden nach Behandlung mit AC220 von 40% auf 35% und mit BS228 von 42% auf 37% reduziert (Abbildung 9A/B).

Die subG1-Fraktionen der entsprechenden Zellen sind vergrößert. Beispielsweise sind die subG1-Fraktonen von Zellen mit FLT3 D835Y unter AC220, BS228 und Crenolanib signifikant erhöht verglichen mit den unbehandelten Zellen. In mit AC220 behandelten Zellen mit FLT3 D835Y steigt die subG1-Fraktion von 5% auf 19%, mit BS228 von 4% auf 40% und mit Crenolanib ebenfalls von 4% auf 40% (Abbildung 10A-C).

Die subG1-Fraktion der Zellen mit FLT3 D835Y N676K ist unter Crenolanib signifikant von 13% auf 30% erhöht und unter BS228 von 11% auf 20% (Abbildung 10B/C). Unter der Behandlung mit AC220 ergibt sich in Zellen mit FLT3 ITD N676K ein signifikanter Anstieg der subG1-Fraktion von 4% auf 13% und mit BS228 von 5% auf 14%, wohingegen mit Crenolanib die subG1-Fraktion sich unwesentlich von 5% auf 6% vergrößert (Abbildung 10A-C).

Zellen mit der Mutation FLT3 ITD D835Y zeigen lediglich geringe und nicht signifikante Veränderungen im Zellzyklus und den subG1-Fraktionen nach der Inkubation mit AC220, BS228 und Crenolanib. Die subG1-Fraktion nach Behandlung mit AC220 ist unverändert bei 3%, mit BS228 steigt sie von 4% auf 9% und mit Crenolanib von 4% auf 7% (Abbildung 10A-C).

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der 48-stündigen TKi Behandlung die Ergebnisse der 24-stündigen Inkubation. Zusätzlich sind jedoch unter 48-stündiger AC220 Behandlung die subG1-Fraktionen von Zellen mit FLT3 ITD N676K und

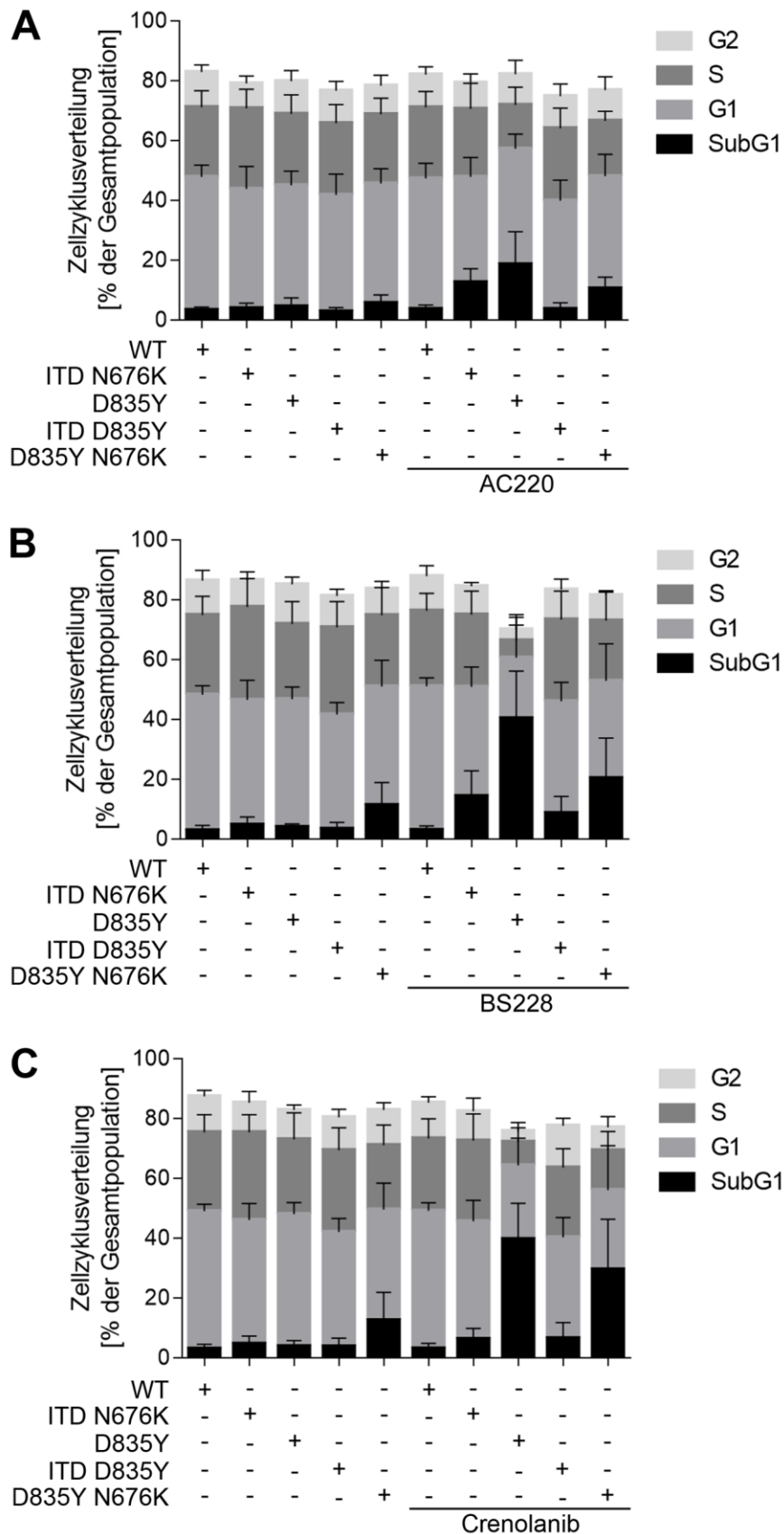


Abbildung 9. Auswirkung auf den Zellzyklus nach 48 h. Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung von Ba/F3 WT Zellen im Vergleich zu Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen nach Behandlung mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib über 48 h. Die Zellen wurden mit PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist der Mittelwert + SD. n=4.

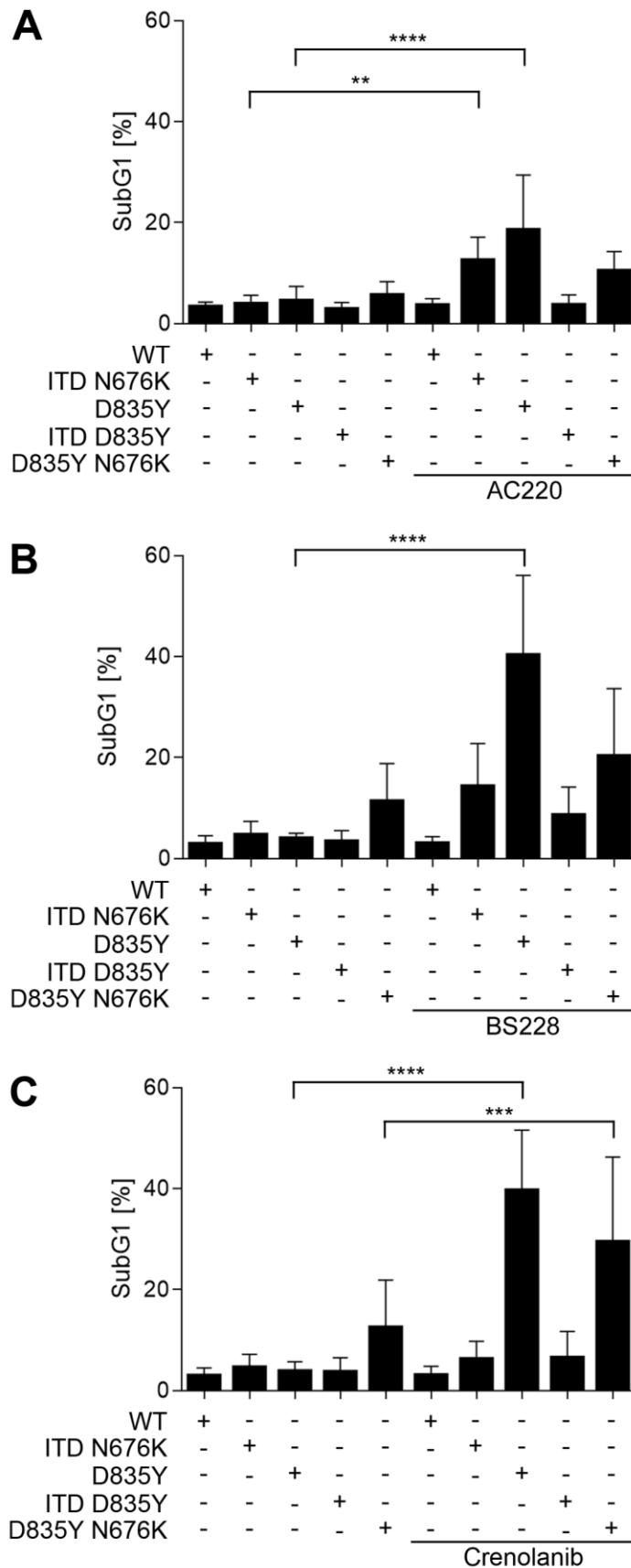


Abbildung 10. SubG1-Fraktion nach 48-stündiger Behandlung. Ba/F3 WT Zellen im Vergleich zu Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen nach Behandlung mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib. Two-way-ANOVA, Bonferroni-Korrektur. Als signifikant wurde $p < 0,05$ gewertet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Gezeigt ist der Mittelwert + SD. $n=4$.

FLT3 D835Y signifikant vergrößert. Auffallend ist die, im Vergleich zu dem vorangegangenen Versuch, insgesamt verringerte Anzahl von Zellen in der G1-Phase. Dafür ist ein Anstieg der subG1-Fractionen zu erkennen. Das zeigt sich am deutlichsten in Zellen mit FLT3 D835Y.

5.3.3 Langzeitbehandlung mit verschiedenen TKi über 72 h

Um zu ergründen, welche Wirkung die Inhibitoren auf Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen über einen längeren Zeitraum haben und ob diese anhaltend ist, wurde der Versuch mit einer Behandlung über 72 h und 5 nM AC220, BS228 und Crenolanib wiederholt. Zudem wurden exemplarisch Ba/F3 Zellen mit einer alleinigen FLT3 ITD Mutation hinzugenommen (im Weiteren mit Ba/F3 ITD abgekürzt). In einem Vorversuch wiesen diese unter BS228 eine deutlich verminderte Phosphorylierung von FLT3 ITD und STAT5 auf (s. Kap. 9.1).

Wie auch in den vorherigen Experimenten, wird der Zellzyklus von Zellen mit FLT3 D835Y sehr stark beeinflusst. Unter AC220 sind Zellen in der G1-Phase im Vergleich zu unbehandelten Zellen von 60% auf 41% reduziert und die subG1-Fraktion steigt von 9% auf 27%. Unter BS228 ist eine noch deutlichere Reduktion der Zellen mit FLT3 D835Y in der G1-Phase von 44% auf 16% zu sehen und die subG1-Fraktion vergrößert sich von 20% auf 61%. Ähnlich stellt es sich nach der Inkubation mit Crenolanib dar. Zellen mit FLT3 D835Y in der G1-Phase werden von 60% auf 16% reduziert und die subG1-Fraktion steigt von 8,4% auf 68% (Abbildung 11/12).

In Zellen mit FLT3 ITD sind ebenfalls große Veränderungen des Zellzyklus nach der Behandlung mit AC220, BS228 und Crenolanib zu erkennen. Die Anzahl der Zellen in der G1-Phase vermindert sich in den mit AC220 behandelten Zellen von 51% auf 21%, mit BS228 von 48% auf 5% und mit Crenolanib von 51% auf 40% verglichen mit den unbehandelten Zellen (Abbildung 11A-C). Dementsprechend steigt die subG1-Fraktion nach der Inkubation mit AC220 von 7% auf 55%, mit BS228 von 11% auf 83% und mit Crenolanib von 8% auf 19% (Abbildung 12A-C).

Weniger deutlich ist die Wirkung der Inhibitoren gegenüber Zellen mit FLT3 ITD N676K. Die Anzahl der Zellen in der G1-Phase verringert sich unter BS228 von 55% auf 48% (Abbildung 11B) und die subG1-Fraktion steigt von 4% auf 14% (Abbildung 12B). Unter AC220 und Crenolanib sind hingegen nur minimale Veränderungen der subG1-Fraktion zu erkennen (von 4% auf 5% bzw. von 5% auf

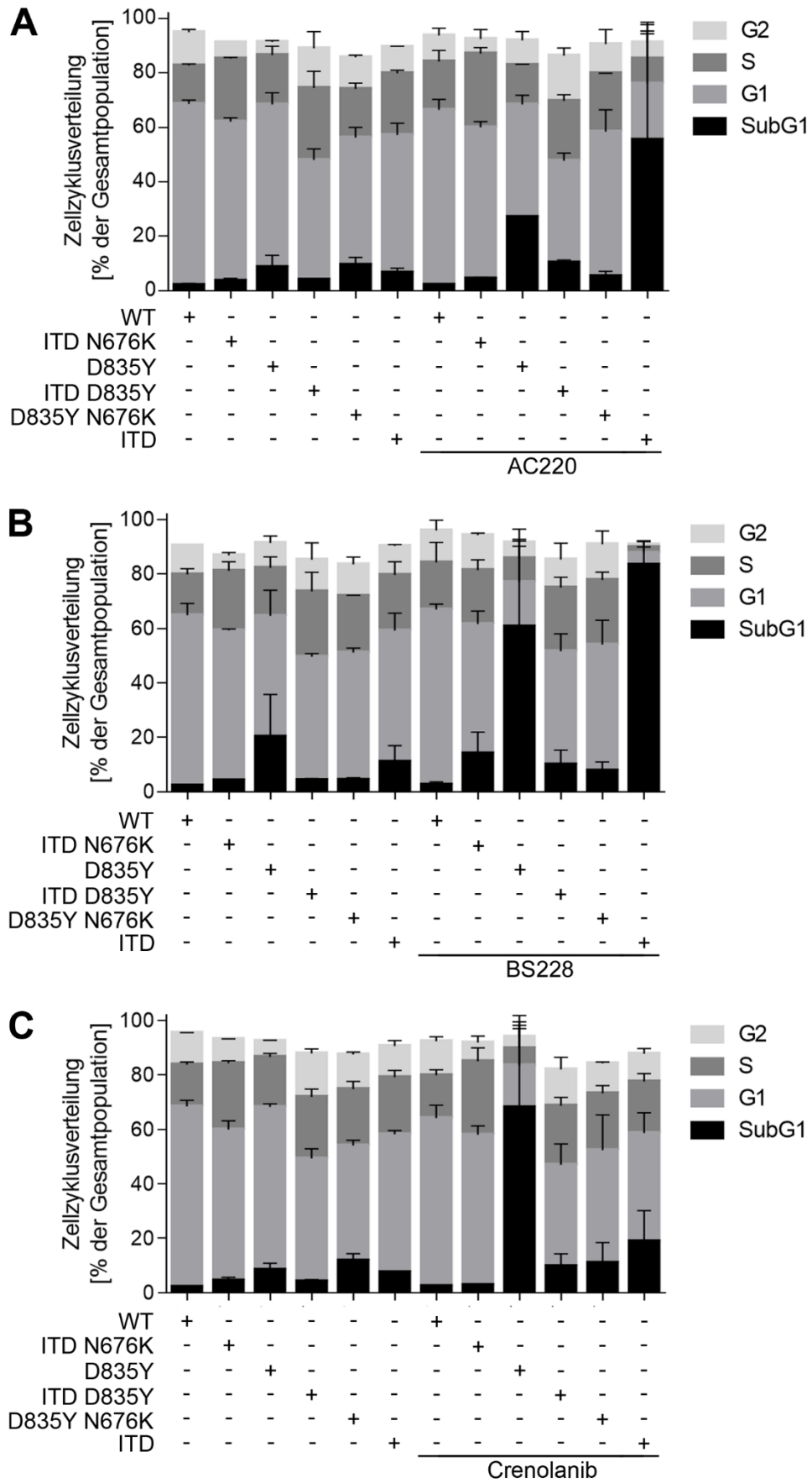


Abbildung 11. Auswirkung auf den Zellzyklus nach 72 h. Dargestellt ist die Zellzyklusverteilung von Ba/F3 WT Zellen im Vergleich zu Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen nach Behandlung mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib über 72 h. Die Zellen wurden mit PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist der Mittelwert + SD. n=2.

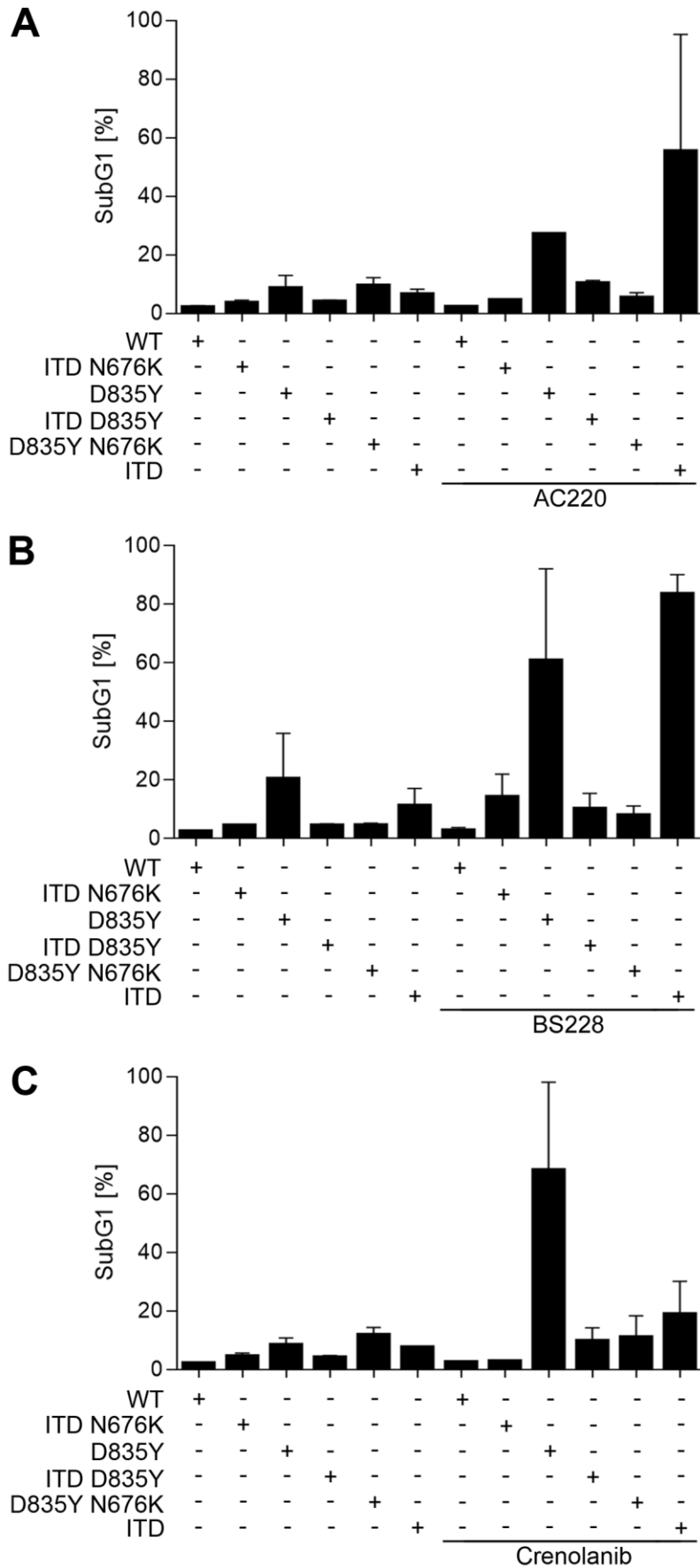


Abbildung 12. SubG1-Fraktion nach 72-stündiger Behandlung. Ba/F3 WT Zellen im Vergleich zu Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen nach Behandlung mit 5 nM **A** AC220, **B** BS228 und **C** Crenolanib. Gezeigt ist der Mittelwert + SD. n=2. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der Versuchsanzahl verzichtet.

3%, Abbildung 12A/C). Die Veränderungen des Zellzyklus von Zellen mit FLT3 ITD D835Y und FLT3 D835Y N676K nach der Inkubation mit allen drei Inhibitoren sind ebenfalls nur gering ausgeprägt (Abbildung 11A-C).

Die Zellzyklus-Analyse zeigt, genauso wie in den vorherigen Versuchen, dass Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y besonders deutlich auf die Behandlung mit den drei Inhibitoren ansprechen. Zudem ist ein ebenfalls deutliches Ansprechen von Ba/F3 Zellen mit FLT3 ITD zu erkennen. Dieses ist unter BS228 und AC220 ausgeprägter als durch Crenolanib (Abbildung 11A-C). Die Zellen mit den übrigen FLT3 Mutationen zeigen, verglichen mit Zellen der FLT3 D835Y und FLT3 ITD Mutation, deutlich geringere Veränderungen des Zellzyklus (Abbildung 11/12).

5.3.4 Übersicht: Einfluss der TKi auf den Zellzyklus

Der Einfluss der drei Inhibitoren auf den Zellzyklus unterscheidet sich je nach FLT3 Mutation erheblich (Tabelle 8). Gemeinsam haben sie, dass es zunächst zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase (meistens nach 24 h) kommt und dann zu einem Anstieg der subG1-Fractionen (nach 48 h und 72 h). Der Anstieg der subG1-Fraktion geschieht zu Lasten der Zellen in der G1-Phase. Die Wirkung schwankt dabei zwischen den verwendeten Mutationen und den Inhibitoren bedeutend. Alle drei Inhibitoren zeigen, wie auch in den Western Blot-Analysen (s. Kap. 5.2.4), eine gute Wirksamkeit gegen Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y. Diese spiegelt sich zunächst in einer Zunahme der Zellen in der G1-Phase nach 24-stündiger Behandlung und dann in dem eindrücklichen Anstieg der subG1-Fractionen nach 48 h und 72 h wider. Gegen Zellen mit FLT3 ITD und FLT3 ITD N676K wirken hauptsächlich AC220 und BS228. Hierbei sind Zellen mit FLT3 ITD deutlich empfindlicher gegenüber den beiden TKi als Zellen mit FLT3 ITD N676K. Auch in den Western Blot-Analysen haben beide Inhibitoren die Phosphorylierung von FLT3 ITD N676K und STAT5 reduziert. Crenolanib beeinflusst den Zellzyklus von Zellen mit FLT3 ITD, verglichen mit AC220 und BS228, geringer und Zellen mit FLT3 ITD N676K weisen lediglich minimale Zellzyklusveränderungen auf. Dafür wirkt Crenolanib ebenso wie BS228 gegen Zellen mit FLT3 D835Y N676K. Interessanterweise konnte keiner der Inhibitoren den Zellzyklus von Zellen mit FLT3 ITD D835Y erheblich beeinflussen. Dennoch ist erwähnenswert, dass minimale, aber nicht signifikante, Erhöhungen der subG1-Fractionen durch BS228 nach 24 h, 48 h und 72 h zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu haben in den Western Blot-

Ergebnisse

Analysen alle drei Inhibitoren eine Reduktion der Phosphorylierung von FLT3 ITD D835Y und STAT5 bewirkt. Zu einer Veränderung des Zellzyklus von Ba/F3 Zellen mit FLT3 WT kommt es unter keinem Inhibitor.

Tabelle 8. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus den vorangegangenen Durchflusszytometrischen-Analysen mit PI Färbungen. ^a

Zelllinie	FLT3 Mutation	AC220	BS228	Crenolanib
Ba/F3	Wildtyp (WT)	-	-	-
Ba/F3	ITD N676K	+	+	-
Ba/F3	D835Y	+	++	++
Ba/F3	ITD D835Y	-	-	-
Ba/F3	D835Y N676K	-	+	++
Ba/F3	ITD	++	++	+

^a – keine/mäßige, + deutliche, ++ große Zellzyklus-Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nach Behandlung mit jeweils 5 nM TKi für 24 h, 48 h und 72 h. Ba/F3 ITD Zellen wurden ausschließlich über einen Behandlungszeitraum von 72 h getestet.

Die Zellzyklus-Analysen verdeutlichen die unterschiedliche Wirksamkeit der Inhibitoren abhängig von der vorliegenden FLT3 Mutation. Zudem zeigt deren Vergleich, dass BS228 sowohl den Zellzyklus von AC220 empfindlichen, als auch von Crenolanib sensiblen FLT3 Mutationen hemmt. Damit hemmt BS228 den Zellzyklus von mehr FLT3 Mutationen als AC220 und Crenolanib.

5.4 Zelltod-Analyse nach Behandlung mit TKi über 48 h

In diesem Versuch wurde untersucht, ob der zuvor in der Zellzyklus-Analyse beobachtete Arrest in der G1-Phase und die vergrößerten subG1-Fraktionen einiger Zellen mit FLT3 Mutationen erhöhten Zelltod-Raten entsprechen. Hierfür wurden Ba/F3 Zellen mit FLT3 WT und mit FLT3 Mutationen erneut mit 5 nM TKi über 48 h behandelt und diesmal mit Annexin V FITC/PI gefärbt (s. Kap. 4.6.2). Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer und der Vergleich von vitalen und apoptotischen/ nekrotischen Zellen (Abbildung 13). Während die vorangegangenen Versuche mit Hilfe der PI Färbung besonders geeignet sind die Zellzyklusphasen zu untersuchen, ergeben sich über die subG1-Fraktionen nur indirekte Hinweise für vermehrten Zelltod. Die in diesem Experiment verwendete Annexin V FITC/PI

Färbung ist bezüglich der Detektion von Apoptose und Nekrose deutlich empfindlicher (s. Kap. 4.6).

Insbesondere Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y zeigten im vorangegangenen Versuch nach 48-stündiger Behandlung eine deutliche Erhöhung der subG1-Fractionen unter allen drei Inhibitoren. Hierbei ist die Wirkung von AC220 etwas geringer, als die der anderen TKi (s. Kap. 5.3.2). Das zeigt sich auch in der Annexin V FITC/PI Färbung. Unter der Behandlung mit BS228 bzw. Crenolanib ist ein großer Anteil der Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y Zellen apoptotisch oder nekrotisch. Nach der Behandlung mit BS228 steigt der Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle von 8% auf 50% und mit Crenolanib von 8% auf 58% (Abbildung 13C). Dieser Anteil ist unter AC220 etwas kleiner, entsprechend einem Anstieg 8% auf 22% (Abbildung 13C).

Ba/F3 Zellen mit FLT3 ITD N676K weisen eine erhöhte subG1-Fraktion unter AC220 und BS228 auf, jedoch nicht unter Crenolanib (s. Kap. 5.3.4). Gleichermaßen führen AC220 und BS228 zu vergrößerten Anteilen apoptotischer bzw. nekrotischer Ba/F3 Zellen mit FLT3 ITD N676K. Der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen steigt unter AC220 von 4% auf 11% und unter BS228 von 4% auf 23% verglichen mit den unbehandelten Zellen. Dahingegen ist der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen unter Crenolanib (5%) mit denen der unbehandelten Zellen (4%) vergleichbar (Abbildung 13B).

Sowohl die Darstellung von Ba/F3 Zellen mit FLT3 ITD D835Y, als auch mit FLT3 D835Y N676K zeigen keine Unterschiede in der Anzahl apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen in den mit den Inhibitoren behandelten Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Ba/F3 Zellen mit FLT3 ITD D835Y haben ohne Inkubation mit einem Inhibitor einen Anteil von 22% apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen, mit AC220 beträgt dieser ebenfalls 22%, unter BS228 26% und unter Crenolanib 23% (Abbildung 13D). Das bestätigt die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse, in denen ebenfalls kein Einfluss der Inhibitoren auf Zellen mit FLT3 ITD D835Y nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 5.3.4).

Die Standardabweichung in Zellen mit FLT3 D835Y N676K sind hoch, was die Aussagekraft einschränkt. Eine Tendenz lässt sich jedoch dahingehend erkennen, dass der Anteil apoptotischer/ nekrotischer Zellen unter keinem Inhibitor verglichen mit der unbehandelten Kontrolle erhöht ist. Der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen liegt ohne Einfluss eines Inhibitors bei 52%, mit AC220 bei 51%, mit BS228 bei 48% und mit Crenolanib bei 51% (Abbildung 13E). Dahingegen zeigt die PI Färbung

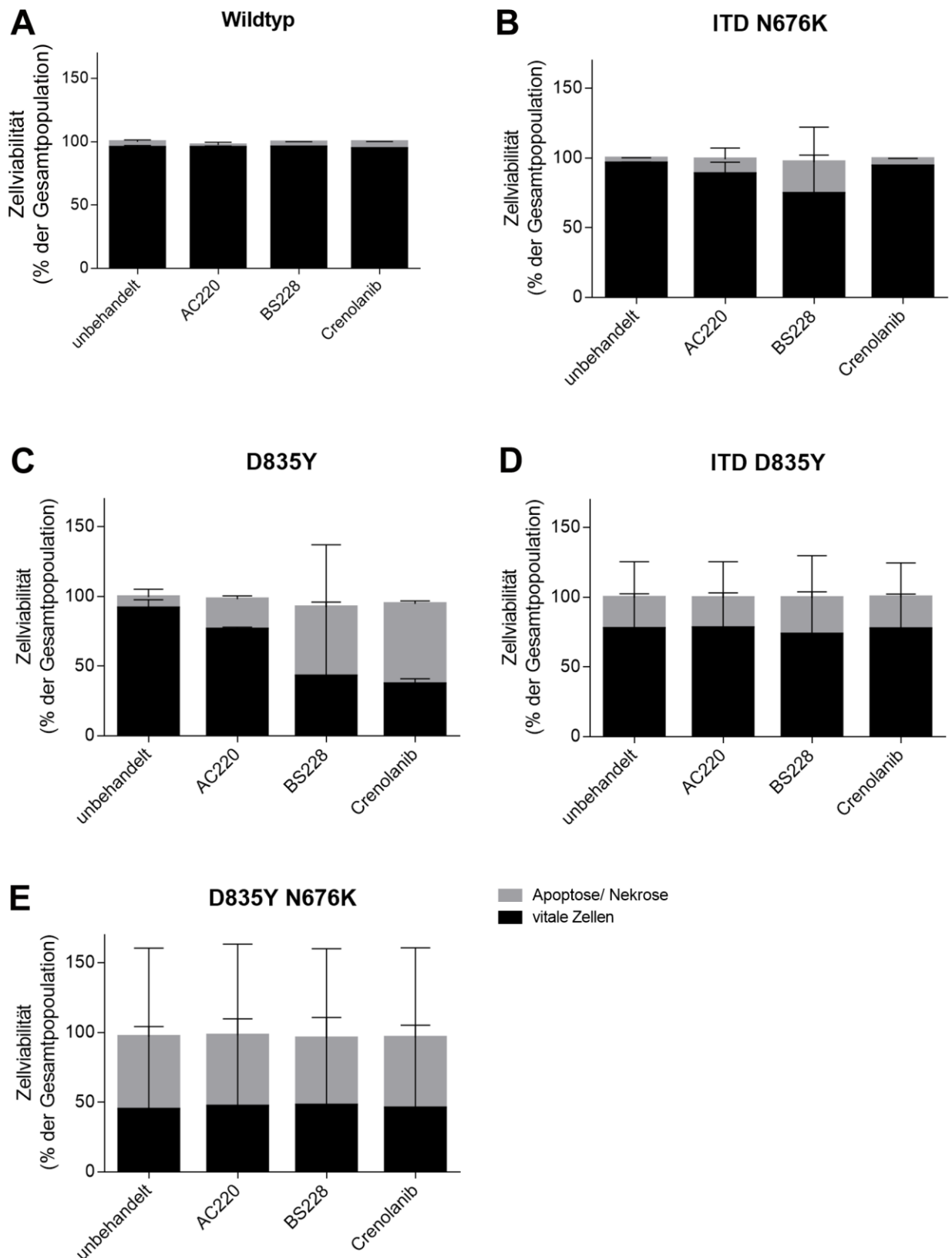


Abbildung 13. Zelltod-Analyse nach 48 h. Darstellung von **A** Ba/F3 WT, **B** Ba/F3 ITD N676K, **C** Ba/F3 D835Y, **D** Ba/F3 ITD D835Y und **E** Ba/F3 D835Y N676K Zellen unbehandelt und nach Behandlung mit 5 nM AC220, BS228 und Crenolanib über 48 h. Differenzierung zwischen vitalen und apoptotischen/ nekrotischen Zellen mit Hilfe einer Annexin V-FITC/PI Färbung und der Durchflusszytometrie. Gezeigt ist der Mittelwert + SD. n=2. Two-way-ANOVA, Bonferroni-Korrektur. Als signifikant wurde $p < 0,05$ gewertet. Ohne signifikantes Ergebnis.

Ergebnisse

von Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y N676K eine signifikante Erhöhung der subG1-Fraktionen unter BS228 und Crenolanib (Abbildung 8B/C).

In Ba/F3 Zellen mit FLT3 WT sind keine vermehrten apoptotischen oder nekrotischen Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren zu erkennen. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen beträgt ohne Inhibitor 5%, in den mit AC220 behandelten Zellen 2%, mit BS228 4% und mit Crenolanib 5% (Abbildung 13A).

Der Vergleich der Ergebnisse der PI Färbung (s. Kap. 5.3.4) mit der Annexin V FITC/PI Färbung zeigt, dass der in der PI Färbung beobachtete Zellzyklus-Arrest bzw. die erhöhte Anzahl von DNA-Fragmenten mancher Ba/F3 Zellen unter dem Einfluss der Inhibitoren sich in einem erhöhten Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen widerspiegelt. Besonders deutlich ist das in Zellen mit FLT3 D835Y und FLT3 ITD N676K zu erkennen.

6 Diskussion

Die akute myeloische Leukämie ist eine schwerwiegende Erkrankung, deren Prognose insbesondere im höheren Lebensalter, trotz deutlicher Fortschritte in der Therapie, häufig ungünstig ist [1-3, 18]. Einen wesentlichen Pathomechanismus stellen genetische Veränderungen im *FLT3*-Gen dar. Dieses kodiert für das gleichnamige Protein FLT3, eine Rezeptortyrosinkinase der Klasse III, die für die Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen verantwortlich ist [3]. Besonders häufig werden interne Tandemduplikationen nachgewiesen, die als Treibermutationen der AML gelten [3, 10, 11]. Sie haben eine kausale Rolle in der Pathogenese der Erkrankung und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert [4-9]. Daher wurden speziell gegen Mutationen der FLT3 Kinase gerichtete Inhibitoren (FLT3i) entwickelt und klinisch getestet [3, 37]. Im Verlauf zeigte sich jedoch, dass Resistenzmechanismen auftraten, die zum Wirkungsverlust der FLT3i führten. Diese Beobachtung bestätigte die Abhängigkeit der AML-Zell-Klone von FLT3 ITD und unterstrich ihre Funktion als Treibermutation [10, 19, 20]. Umso mehr sind FLT3 Mutationen in den Fokus der Therapie mit diesen Inhibitoren gerückt. Neue Inhibitoren erlauben zunehmend die potente und spezifische Hemmung der Rezeptortyrosinkinase [3, 37]. Trotzdem kommt es im Verlauf der Therapie zu unterschiedlichen Resistenzmechanismen, die einen Wirkungsverlust der FLT3i bewirken. Hierfür sind, neben weiteren Mechanismen, sekundäre Punktmutationen des *FLT3*-Gens verantwortlich [15, 16, 19]. In der logischen Konsequenz ist es das Ziel neuer Wirkstoffe möglichst viele Mutationen zu inhibieren und letztlich Resistenzen zu überwinden. Mit einem dieser neuen FLT3i beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Es handelt sich um BS228, das in der Arbeitsgruppe Mahboobi am Institut für Pharmazie der Universität Regensburg entwickelt und synthetisiert wurde. Es wurde unter dem Namen Marbotinib patentiert [22].

Als Basis für die Untersuchungen dient ein Zellmodell mit murinen Ba/F3 Zellen und der Vergleich mit den zwei vielversprechenden FLT3i AC220 und Crenolanib. Sowohl AC220, als auch Crenolanib gehören zur zweiten Generation der FLT3i [3, 20, 37, 61]. Während AC220 als Typ 2 Inhibitor jedoch an die inaktive Form der Rezeptortyrosinkinase FLT3 bindet, hemmt Crenolanib die aktive Form der Kinase (Typ 1 Inhibitor) [20]. AC220 wurde in Japan für Patienten mit Rezidiv-AML zugelassen [71], nicht jedoch in den USA und Europa [72, 73]. Eine Hürde in der Therapie stellen die oben erwähnten Resistenzmechanismen, wie sekundäre

Punktmutationen, dar. In einem solchen Fall sind häufig FLT3 ITD D835Y nachweisbar [10, 15, 16, 19, 78]. Crenolanib soll einige der sekundären Punktmutationen überwinden können [61, 62, 78, 82, 83]. Außerdem hemmt es den *Steel factor receptor* KIT nur geringfügig, wodurch die Gefahr von Zytopenien vermindert wird [62, 82] (s. Kap. 2.3). In dem Versuchsaufbau wurden die verschiedenen FLT3i sowohl an FLT3 Mutationen mit der Kombination aus ITD und Punktmutation, als auch an einer alleinigen FLT3 Punktmutation, sowie einer doppelten FLT3 Punktmutation getestet. Zur Beurteilung der Wirksamkeit des neuen FLT3i BS228 wurde zunächst dessen Auswirkung auf die FLT3 Mutationen und deren nachgeschaltete Proteine STAT5 untersucht. Dabei wurde die Dosis gesteigert und die Inkubationszeit variiert. In einem zweiten Schritt wurde die Wirkung auf den Zellzyklus nach 24 h, 48 h und 72 h analysiert. Schließlich wurde untersucht, ob die FLT3i-Behandlung der Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutation zum Zelltod führt.

6.1 Vor- und Nachteile des Versuchsaufbau

Als Grundlage der Versuche wurde die Methode der Zellkultur verwendet. Als Zellmodell dienten murine Ba/F3 Zellen, die unterschiedliche Mutationen der FLT3 und deren Wildtyp exprimieren (s. Kap. 3.6). Prinzipiell ist die Zellkultur ein weit verbreitetes und gut funktionierendes *in vitro* Verfahren. Im Gegensatz zu *in vivo* Verfahren ist es Zeit-effektiv, Ressourcen und Kosten schonend [97]. Damit steht es im Einklang mit dem Prinzip der „3 R“ (*replace, reduce, refine*) [98]. Dieses empfiehlt, wenn möglich Tierversuche durch andere Methoden zu ersetzen (*replace*), bzw., wenn nicht möglich, die Anzahl an *in vivo* Versuchen zu reduzieren (*reduce*) und die Lebensbedingung von Tieren zu optimieren (*refine*) [98]. Zudem unterliegen die Zellen in der Zellkultur definierten Einflussfaktoren, die entsprechend des Versuchsaufbaus reguliert und angepasst werden können [97]. Sollte die Regulierung aus technischen Gründen nicht möglich sein, wie die Abhängigkeit der Ba/F3 WT Zellen von IL-3, so kann dieser Effekt in der späteren Auswertung berücksichtigt werden.

Trotz der vielen Vorteile der Zellkultur hat ein solcher Versuchsaufbau auch Limitationen. Versuche im Tiermodell beinhalten weit mehr Einflussfaktoren als *in vitro* Versuche und kommen der Anwendung am Menschen deutlich näher. *In vivo* sind viele Einflussfaktoren gegeben und lassen sich nur bedingt anpassen. Hinzu kommen solche, die bisher noch nicht bekannt sind [97].

Manche Einflussfaktoren lassen sich in der Zellkultur nur bedingt nachbilden, obwohl ihnen im Tiermodell eine relevante Rolle zu kommt. Beispielsweise schützen Stromazellen des Knochenmarks durch eine übermäßige Ausschüttung von FL vor dem Zelltod [19] und stellen so einen Resistenzmechanismus gegen FLT3i dar. Zudem bieten *in vivo* Versuche, im Gegensatz zu *in vitro* Versuchen, die Möglichkeit die Pharmakokinetik einer Substanz zu erforschen.

Der verwendete Versuchsaufbau mit der Zellkultur als Grundlage ist gut geeignet die Wirksamkeit des neuen FLT3i BS228 anhand des Vergleichs mit den Ergebnissen der beiden bekannten FLT3i AC220 und Crenolanib einzuordnen. Insgesamt handelt es sich um Grundlagenforschung, die richtungsweisende Aussagen erlaubt. In einem weiteren Schritt ist die umfangreiche Erforschung im Tiermodell möglich.

6.2 Einfluss von AC220, Crenolanib und BS228 auf den FLT3-Signalweg

In einem Vorversuch wurde zunächst der Einfluss des WEHI-Zellen-Überstands auf die Phosphorylierung von FLT3 Kinasen und STAT5 in Ba/F3 WT Zellen untersucht. Diese benötigen das darin enthaltene IL-3 zum Wachstum in der Zellkultur [24], wohingegen Ba/F3 Zellen mit mutierter FLT3 ohne diesen proliferieren [23, 24]. Bekanntermaßen vermittelt eine Stimulation mit IL-3 die Phosphorylierung von STAT5 [25]. Daher wurde untersucht, wie sich der WEHI-Zellen-Überstand auf die Phosphorylierung von STAT5 in Ba/F3 WT Zellen auswirkt. Dafür wurden diese für 4 h mit und ohne WEHI-Zellen-Überstand kultiviert. Dieser Zeitraum wurde ausgewählt, da nach IL-3 Depletion von Ba/F3 WT Zellen die Dephosphorylierung von STAT5 sehr schnell, innerhalb von Minuten bis Stunden, abläuft [23]. Ein vermehrter Zelltod der Ba/F3 WT Zellen ist jedoch nach 4 h ohne IL-3 noch nicht zu erwarten. Dieser ist nach ein bis drei Tagen besonders ausgeprägt [23, 99].

Wie erwartet, zeigte sich eine deutliche Phosphorylierung des STAT5 bei den mit WEHI-Zellen-Überstand behandelten Ba/F3 WT Zellen, im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen. Die Phosphorylierung von FLT3 WT wurde durch die Hinzugabe des WEHI-Zellen-Überstandes nicht beeinflusst und zeigte sich auf niedrigem basalem Niveau (s. Kap. 5.1).

Die Ergebnisse des Vorversuchs bestätigen die Annahme, dass die Phosphorylierung des STAT5 in Ba/F3 WT Zellen durch das, im WEHI-Zellen-Überstand enthaltene, IL-3 vermittelt wird [23, 25]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die in den folgenden Western Blots ersichtliche Phosphorylierung des STAT5 der Ba/F3 WT Zellen nur in

einem geringen Maß durch die auf basalem Niveau aktive FLT3 WT Kinase zu Stande kommt (s. Kap. 5.2). Dennoch konnte bei Ba/F3 WT Zellen zwecks Kultivierbarkeit nicht auf den Zusatz von WEHI-Zellen-Überstand verzichtet werden, da der unweigerliche Zelltod in Folge des IL-3 Mangels zu erwarten wäre und eine etwaige Wirkung der Inhibitoren auf Ba/F3 WT Zellen nicht hätte nachgewiesen werden können.

Zunächst wurde die Wirksamkeit des FLT3i BS228 auf Proteinebene untersucht und verglichen mit den bekannten FLT3i AC220 und Crenolanib. Hierfür wurden Ba/F3 Zellen, die FLT3 WT oder verschiedene Mutationen in der FLT3 tragen, mit unterschiedlichen Dosierungen und über verschiedene Zeiträume mit den FLT3i inkubiert (5 nM FLT3i über 2 h und 4 h bzw. 20 nM FLT3i über 2 h). Anschließend wurde mit Hilfe von Western Blots die Wirkung auf die Phosphorylierung von FLT3 Kinasen und STAT5 analysiert. Die phosphorylierten Proteine sind von besonderem Interesse, da sowohl FLT3 Kinasen, als auch STAT5 in der aktiven Form phosphoryliert vorliegen. STAT5 ist ein wichtiges nachgeschaltetes Protein der aktivierten FLT3 Kinase und sollte daher bei effektiver Hemmung der FLT3 Kinase durch die FLT3i konsequenterweise nicht bzw. weniger phosphoryliert werden [3, 51]. Zunächst ist festzustellen, dass keiner der Inhibitoren die Phosphorylierung des FLT3 WT und des zugehörigen STAT5, in der verwendeten niedrigen nanomolaren Dosis (5 nM) und der kurzen Inkubationszeit (2 h), wesentlich beeinflusst (s. Kap. 5.2). Das spricht für die spezifische Inhibition der FLT3i gegenüber den mutierten Formen der FLT3 Kinase. Dies gilt insbesondere auch für BS228. Nicht untersucht wurden jedoch längere Zeiträume und höhere Dosen. Wie anfangs erwähnt, wird die Phosphorylierung des STAT5 in Ba/F3 WT Zellen aufgrund der Zugabe des WEHI-Zellen-Überstands, der IL-3 enthält, verstärkt. Ein schützender Effekt vor den FLT3i durch Zytokine des WEHI-Zellen-Überstands, beispielsweise durch IL-3 vermittelt, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden und ist durchaus denkbar. Sung et al. konnten in einer anderen Zelllinie einen Zytokin-vermittelten Schutz vor der Dephosphorylierung von STAT5 durch FLT3i zeigen [100].

Die häufigste bekannte Punktmutation, FLT3 D835Y, wird durch den Austausch einer Asparaginsäure durch Tyrosin an der Position 835 verursacht [12]. Tritt diese zusammen mit FLT3 ITD (FLT3 ITD D835Y) auf, können sie als sekundäre Mutation einen Wirkungsverlust von FLT3i hervorrufen. Dieser wurde beispielsweise für AC220 beschrieben [10, 78]. Daher gilt ihnen ein besonderes Augenmerk. Interessanterweise sollen FLT3 ITD D835Y Mutationen gegenüber Crenolanib, aufgrund dessen

Eigenschaft als Typ 1 Inhibitor, sensibel sein [62, 78, 82]. Sowohl in einer Dosierung von 20 nM, als auch mit 5 nM konnten alle drei getesteten FLT3i die Phosphorylierung von FLT3 D835Y und von STAT5 deutlich reduzieren, verglichen mit der unbehandelten Probe. Selbiges wurde für die Doppelmutation FLT3 ITD D835Y und dem entsprechenden STAT5 beobachtet (s. Kap. 5.2). Die Ergebnisse zeigen, dass BS228 die grundlegende Voraussetzung erfüllt, sowohl an die Punktmutation FLT3 D835Y, als auch an die Doppelmutationen FLT3 ITD D835Y zu binden, diese zu inhibieren und deren Signalweg zu unterbrechen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die kausale Funktion dieser Mutationen in der Pathogenese der AML auf Proteinebene unterbunden und somit das onkogene Potential der Zellklone reduziert wird. Hervorzuheben ist, dass BS228 gegenüber beiden Mutationen sowohl eine mit Crenolanib, als auch mit AC220 vergleichbare Wirkung aufweist.

Die in der Literatur [10, 20] beschriebene verminderte Wirkung von AC220 gegen FLT3 ITD D835Y, ist auf Proteinebene nicht zu erkennen. Möglicherweise ist diese dosisabhängig. Das legen die Western Blot-Analysen von Smith et al. nahe [10]. Die Arbeitsgruppe verwendete unterschiedliche Konzentrationen von AC220 über 90 min und testete diese gegen FLT3 ITD D835Y. Hierbei ist unter der Verwendung von 2 nM AC220 keine Dephosphorylierung der FLT3 zu erkennen, diese zeigt sich jedoch in den mit 5 nM behandelten Zellen. Dementsprechend wäre die Dosierung der Inhibitoren in dem vorliegenden Experiment mit 5 nM knapp zu hoch angesetzt, um die Resistenz von AC220 gegenüber FLT3 ITD D835Y abbilden zu können. Eine Versuchsreihe mit 2 nM AC220, Crenolanib und BS228 könnte möglicherweise den Wirkungsverlust von AC220 darstellen und Unterschiede im Vergleich zu Crenolanib und BS228 aufzeigen.

Es sind mehrere Resistenzmechanismen gegen AC220 bekannt (s. Kap. 2.3.3). Der Nachweis von sekundären Mutationen, wie beispielsweise FLT3 ITD D835Y, ist ein solcher Mechanismus. Da es BS228 gelingt diese Mutation auf Proteinebene zu hemmen, besteht die grundsätzliche Möglichkeit die Resistenz von Zellklonen mit dieser Mutation mit Hilfe des neuen FLT3i zu überwinden.

FLT3 ITD N676K sind weitere sekundäre Mutationen, die ursprünglich in Patienten mit Rezidiv unter Midostaurin entdeckt wurden [79]. AC220 und BS228 gelang es in unseren Versuchsreihen (5 nM und 20 nM) die Phosphorylierung von FLT3 ITD N676K und von STAT5 zu reduzieren (s. Kap. 5.2). Hieraus lässt sich schließen, dass BS228 die strukturelle Eigenschaft besitzt an diese Mutation zu binden und sie erfolgreich zu inhibieren, sodass in der Folge die intrazelluläre Signalkaskade

unterbrochen wird. Somit besteht die Möglichkeit mit Hilfe von BS228 diese Mutation zu überwinden. Die Wirkung ist mit der von AC220 vergleichbar. Crenolanib gelingt es hingegen nicht die sekundäre Mutation FLT3 ITD N676K zu inhibieren und die Aktivität von STAT5 zu unterdrücken (s. Kap. 5.2.4). Es ist anzunehmen, dass Crenolanib gegenüber Zellklonen mit dieser Mutation wirkungslos ist.

Vergleichbare Untersuchungen, die Western Blot-Analysen nutzen, um die Wirkung von AC220 bzw. Crenolanib auf FLT3 ITD N676K zu analysieren, sind uns nicht bekannt. Zwei weitere Arbeitsgruppen beschäftigten sich jedoch mit der Mutation FLT3 ITD N676K. Huang et al. [83] bestimmten mit Hilfe von „*colony forming assays*“ die halbmaximale Inhibitor Konzentration (IC_{50}) von Crenolanib in FLT3 ITD N676K und sehen eine Wirksamkeit des Inhibitors gegen diese Mutation. Diese konnten wir in den Western Blot-Analysen nicht nachweisen. Opatz et al. [80] ermittelten die halbmaximale Inhibitor Konzentration von AC220. Sie konnten zwar eine Sensibilität von AC220 gegenüber FLT3 N676K nachweisen, stellten jedoch einen Wirkungsverlust gegen FLT3 ITD N676K fest. Dieser stellt sich in den von uns durchgeführten Western Blots nicht dar. Denkbare Ursachen für diese Unterschiede sind vielfältig. Die Methodik beider Arbeitsgruppen zielte im Gegensatz zu den von uns durchgeführten Experimenten nicht auf die Wirkung der Inhibitoren auf Proteinebene ab, sodass ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. Zudem verwendeten Huang et al. [83] keine Ba/F3 Zellen und andere Nährmedien. Opatz et al. [80] erklären den Wirkungsverlust von AC220 durch eine gehäufte intrazelluläre Lokalisation der FLT3 ITD N676K. Die Konzentrationen von AC220 seien intrazellulär vermindert, wodurch der Wirkungsverlust zu Stande käme. Zudem postulieren sie, dass ITD die Konformation des Proteins so verändern, dass eine Bindung von AC220 erschwert wird. Das widerspricht den Ergebnissen unserer Western Blot-Analysen, in denen AC220 die Inhibition von FLT3 ITD N676K gelingt. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte auch hier die Verwendung der unterschiedlichen Methodik sein. Zudem verwendeten Opatz et al. AC220 von einem anderen Hersteller.

Die aus zwei Punktmutationen bestehende Doppelmutation FLT3 D835Y N676K wird durch alle drei FLT3i erfolgreich inhibiert (s. Kap. 5.2.4). Somit weisen sie die grundlegende Eigenschaft auf, die Aktivität von onkogenen Zellklonen mit dieser Mutation auf Proteinebene zu reduzieren. AC220 und BS228 haben eine höhere Wirksamkeit als Crenolanib. Interessanterweise ist die Wirkung aller drei FLT3i jedoch geringer als gegenüber der Punktmutation FLT3 D835Y (s. Kap. 5.2.3). Eine Erklärung hierfür wäre eine veränderte Konformation der FLT3 Kinase, die durch die zusätzliche

N676K Mutation verursacht sein könnte und die Bindung der Inhibitoren erschwert. Untersuchungen von Opatz et al. zeigen dies für FLT3 ITD N676K [80].

Zusammenfassend gelingt es BS228 jede der getesteten FLT3 Mutationen zu inhibieren und deren konstitutive Aktivität zu unterbinden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hierdurch deren intrazelluläre Signalweiterleitung, gemessen an der Phosphorylierung von STAT5, unterbrochen wird. Diese Erkenntnisse sind bedeutend, da den getesteten FLT3 Mutationen als Treiber- und sekundäre Mutationen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AML zukommt [3, 6, 10, 11, 19, 20]. Die Wirkung entspricht in etwa der des viel untersuchten Inhibitor AC220, der ebenfalls jede der getesteten Mutationen inhibiert. Im Vergleich zu Crenolanib erwies sich BS228 vorteilhaft gegenüber zwei der vier getesteten Mutationen. Für keinen der Inhibitoren konnte ein Einfluss auf Zellen mit dem FLT3 WT nachgewiesen werden, was für deren Spezifität spricht (s. Kap. 5.2.4).

6.3 BS228 blockiert den Zellzyklus

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die im vorangegangenen Versuch beobachtete Inhibition der mutierten FLT3 Kinasen in einer Veränderung des Zellzyklus resultiert. Für mehrere FLT3i, darunter auch AC220, wurde eine Zellzyklus-Blockade in der G1-Phase vorbeschrieben [101, 102]. Hierfür wurden Ba/F3 Zellen mit gleichbleibender Dosis FLT3i (5 nM) inkubiert und deren Wirkung zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) untersucht. Die verwendete Propidiumjodid Färbung erlaubt, aufgrund der Interkalation in die DNA, Rückschlüsse auf die Zellzyklus-Phasen (s. Kap. 4.6.1).

Bei Betrachtung des kürzesten Inkubationszeitraums (24 h) zeigt sich, dass einige Ba/F3 Zellen mit mutierter FLT3 Kinase unter der Behandlung mit den drei FLT3i in der G1-Phase akkumulieren. Besonders deutlich ist das in Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y zu erkennen (s. Kap. 5.3.1). Unter der Behandlung mit AC220 nimmt der Anteil der Zellen mit FLT3 D835Y in der G1-Phase, verglichen mit den unbehandelten Zellen, von 43% auf 51% (Abbildung 7A), unter BS228 von 44% auf 63% (Abbildung 7B) und unter Crenolanib von 42% auf 56% zu (Abbildung 7C). Aus dieser Beobachtung ist zu schließen, dass diese Zellen durch die Inkubation mit den Inhibitoren daran gehindert werden den Zellzyklus regulär zu durchlaufen und dementsprechend eine Zellzyklus-Blockade in der G1-Phase vorliegt. Ein solcher

Mechanismus wurde für mehrere FLT3i vorbeschrieben [101, 102] und scheint auch für BS228 zuzutreffen.

Zudem sind die subG1-Fraktionen von Ba/F3 Zellen mit den Mutationen FLT3 D835Y, FLT3 D835Y N676K und FLT3 ITD N676K nach der Behandlung mit Crenolanib und BS228 vergrößert. Beispielsweise ist in Zellen mit FLT3 D835Y unter BS228 ein signifikanter Anstieg der subG1-Fraktion von 4% auf 14% und unter Crenolanib von 4% auf 12% zu erkennen (Abbildung 8B/C). Die subG1-Fraktionen korrelieren mit der Menge fragmentierter DNA (s. Kap. 4.6.1) und lassen eine erhöhte Freisetzung von DNA durch die mit den Inhibitoren behandelten Zellen vermuten. Eine nahe liegende Erklärung für den vermehrten Nachweis fragmentierter DNA könnte deren Entstehung im Rahmen eines erhöhten Zelluntergangs sein.

Diese Überlegungen werden durch die Beobachtungen der Versuche mit längeren Inkubationszeiten (48 h und 72 h) unterstützt (s. Kap. 5.3.2 und 5.3.3). Hier zeigen sich teilweise sehr große und im Zeitverlauf zunehmende subG1-Fraktionen in denen mit FLT3i behandelten Zellen, die möglicherweise auf einen vermehrten Zelltod im Rahmen der längeren Behandlungsdauer mit den FLT3i zurückzuführen sind. Das gilt insbesondere für Ba/F3 ITD N676K, die mit AC220 und BS228 behandelt wurden. Außerdem ist dies für Ba/F3 D835Y und Ba/F3 ITD bei der Behandlung mit allen drei FLT3i, sowie für Ba/F3 D835Y N676K bei der Behandlung mit BS228 und Crenolanib zutreffend. Am Beispiel von Ba/F3 D835Y Zellen ist der Anstieg der subG1-Fraktion eindrucklich zu erkennen. Nach der Inkubation mit AC220 über 48 h steigt die subG1-Fraktion verglichen mit den unbehandelten Zellen signifikant von 5% auf 19%, mit BS228 von 4% auf 40% und mit Crenolanib ebenfalls von 4% auf 40% an (Abbildung 10A-C).

Wie die Versuche mit längeren Inkubationszeiten (48 h, 72 h) der FLT3i zeigen, sind in Zellen mit den oben genannten FLT3 Mutationen zunehmende subG1-Fraktionen und weniger Zellen in der G1-Phase nachweisbar. Der Anteil von fragmentierter DNA nimmt zu Gunsten von Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, zu (s. Kap. 5.3). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die in der G1-Phase arretierten Zellen dem Zelltod unterliegen und somit vermehrt DNA-Fragmente entstehen. Anzumerken ist, dass die verwendete Propidiumjodid Färbung lediglich fragmentierte DNA nachweist und keinen direkten Nachweis von Apoptose bzw. Nekrose liefert.

Eine Erklärung für den Wirkmechanismus der FLT3i können folgende Überlegungen liefern. ITD und Punktmutationen des *FLT3*-Gens bewirken die konstitutive Aktivierung der FLT3 Kinase, wodurch es zur Phosphorylierung und Aktivierung des ihr

nachgeschalteten Proteins STAT5 kommt [3, 12]. Das aktivierte STAT5 wird als Dimer in den Nucleus transloziert, wo es mit dem dort ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor Oct-1 (Octamer-Binding Protein 1) interagiert und den Promoter des Cyclin D1 aktiviert. In der Folge wird Cyclin D1 exprimiert, welches als wichtiger Regulationsfaktor für die Passage des Restriktionspunktes der G1-Phase des Zellzyklus mitverantwortlich ist [103]. Zudem ist die Aktivierung von weiteren Signalwegen, über die Phosphorylierung von ERK, AKT und p38, durch FLT3 Mutationen bekannt, wodurch die Expression von BCL2 unterstützt und eine anti-apoptotische Wirkung vermittelt wird [104-109]. Des Weiteren beschrieben Peschel et al. [102] die Phosphorylierung von p27 durch FLT3 ITD, wodurch dieses seiner Aufgabe, Cyclin-abhängige Kinasen zu inaktivieren, nicht nachkommen kann und es zu einer Zellproliferation kommt. Wie die, in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen zeigen, gelingt es den getesteten FLT3i die Signalwege einiger der FLT3 Mutationen, gemessen an der Phosphorylierung von STAT5, zu unterbinden. Zudem konnte mit Hilfe der Propidiumjodid Färbung nachgewiesen werden, dass es in der Folge zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus kommt. Dieser ist mutmaßlich durch die verminderte Expression des Cyclin D und die damit verhinderte Passage des Restriktionspunktes der G1-Phase zu erklären. An dieser Stelle sind weitere Untersuchungen nötig, um die Hypothese zu untermauern. Beispielsweise könnten Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen nach 24-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren auf die Expression von Cyclin D untersucht werden. Der 24-stündige Zeitraum bietet sich an, da zu diesem Zeitpunkt in den Experimenten dieser Arbeit die größte Akkumulation von Zellen in der G1-Phase nachgewiesen wurde.

Es ist anzunehmen, dass durch die Inhibition der FLT3 Mutationen auch die anderen oben erwähnten Signalwege in geringerem Maße aktiviert werden und dies zur Wirkung der FLT3i beiträgt. Vermutlich spielt auch p27 eine Rolle bei der von uns beobachteten Blockade des Zellzyklus, da gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von FLT3 ITD mit AC220 zu einer reduzierten Phosphorylierung von p27 und einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase führt [102].

Die Erkenntnis, dass der neue FLT3i BS228 Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, könnte in der späteren klinischen Anwendung von Relevanz sein. Beispielsweise entfaltet das bisher in der Therapie der AML verwendete Cytarabin seine Wirkung in der S-Phase des Zellzyklus [101]. In der G1-Phase arretierte Zellen wären dementsprechend für diese Substanz nicht mehr sensibel.

Die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse stehen weitestgehend im Einklang mit den vorangegangenen Western Blot-Analysen und sprechen für den oben geschilderten Pathomechanismus. Für fast alle getesteten FLT3 Mutationen ist festzuhalten, dass die auf Proteinebene beobachtete Inhibition, mit anschließend reduzierter Aktivität von STAT5, zu einer Zellzyklus-Blockade in der G1-Phase führt (s. Kap. 5.2.4 und 5.3.4). Auffallend ist, dass FLT3 ITD D835Y zwar durch AC220, Crenolanib und BS228 gehemmt und STAT5 vermindert phosphoryliert wird, es jedoch im Falle dieser Mutation nicht zu einer Zellzyklus-Blockade unter der verwendeten niedermolaren Dosierung der FLT3i kommt. Interessanterweise unterscheiden sie sich darin von Zellen mit alleiniger FLT3 D835Y Mutation ohne ITD. ITD scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Denkbar ist die fortbestehende Aktivierung weiterer Signalwege, trotz Inhibition von FLT3 ITD D835Y, die zu einer Passage des Restriktionspunktes der G1-Phase führen. Hierbei könnten beispielsweise der PI3K/AKT/mTOR und MAPK-ERK Signalweg eine wichtige Rolle spielen, die neben STAT5, durch FLT3 ITD aktiviert werden [104, 105]. Möglicherweise ist die Inhibition der FLT3 ITD D835Y durch die FLT3i nicht ausreichend, um diese Signalwege zu unterbrechen. Interessanterweise führt, laut unveröffentlichten Daten von Beyer et al., BS228 in einer Dosierung von 40 nM zum Zelltod von Zellen mit FLT3 ITD D835Y (Manuskript in Bearbeitung), was eine dosisabhängige Inhibition nahelegt. In weiteren Experimenten könnte nicht nur die Expression der Proteine, sondern auch Veränderungen der mRNA untersucht werden, um ein besseres Verständnis für die Wirkung der FLT3i auf transkriptioneller Ebene zu erhalten. Im Hinblick auf die Tatsache, dass FLT3 ITD D835Y als sekundäre Mutationen bekannt sind, kommt der weiteren Erforschung der Ursache eine große Bedeutung zu [10, 15, 16, 19, 78]. Gegenstand aktueller Forschung ist das Einsatzgebiet von PI3K-Inhibitoren und deren Kombination mit anderen Inhibitoren [104]. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige PI3K-Inhibition aufgrund persistierender STAT5 Aktivität unzureichend ist, um Apoptose von FLT3 ITD tragenden Zellen herbeizuführen [110]. Möglicherweise führt die Kombination aus PI3K-Inhibitoren und FLT3i zur Apoptose der FLT3 ITD D835Y tragenden Zellen und Überwindung deren Resistenz gegen FLT3i [104]. Zusammenfassend bestätigen die Versuche, dass die Inhibition der FLT3 Mutationen, sowohl durch die herkömmlichen FLT3i AC220 und Crenolanib, als auch durch den neuen FLT3i BS228, zu einer verminderten Aktivität des nachgeschalteten Signalwegs führt und eine Zellzyklus-Blockade in der G1-Phase hervorruft. Keinem der Inhibitoren gelingt es jedoch den Zellzyklus von Zellen mit FLT3 ITD D835Y zu beeinflussen, trotz

deren Inhibition auf Proteinebene. Insgesamt zeigt BS228 eine vergleichbare, teilweise sogar effektivere Wirkung als AC220 und Crenolanib.

6.4 FLT3i vermittelte Zellzyklus-Blockade führt zum Zelltod

Um genauer zu untersuchen, ob die in dem vorangegangenen Versuch festgestellte Zellzyklus-Blockade tatsächlich zum Zelltod führt, wurden die mit FLT3i behandelten Zellen exemplarisch mit einer Annexin V FITC/PI Färbung und der Durchflusszytometrie auf die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose untersucht. Für verschiedene FLT3i, darunter auch AC220, wurde dieser Wirkmechanismus beschrieben [77, 102]. Zur Analyse von Zelltod ist die vorausgegangene PI Färbung unzureichend, da hier lediglich der interkalierende Farbstoff in die DNA nachgewiesen wird und die subG1-Fraktion nur als indirekter Hinweis für einen vermehrten Zelltod gewertet werden kann. Daher wurde eine Annexin V FITC/PI Färbung ergänzt. Diese macht sich die Tatsache zu Nutze, dass apoptotische Zellen, im Gegensatz zu vitalen, das Phospholipid Phosphatidylserin an der Außenseite ihrer Zellmembran präsentieren. Dieses wird durch Annexin V gebunden und markiert. Zellen in der späten Apoptose und Nekrose weisen zusätzlich eine PI durchlässige Zellmembran auf, wodurch dieses in die DNA interkalieren kann. Dadurch können sie von Zellen in der frühen Apoptose unterschieden werden (s. Kap. 4.6.2).

Das Experiment bestätigt die Hypothese, dass Zellen, die durch FLT3i in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren, dem Zelltod unterliegen. Besonders deutlich ist das in Ba/F3 Zellen mit FLT3 D835Y und FLT3 ITD N676K zu erkennen (s. Kap. 5.4). Hervorzuheben ist, dass auch jene Zellen, die mit BS228 behandelt wurden, diesem Mechanismus unterliegen, was als Nachweis für dessen Wirksamkeit auf zellulärer Ebene gewertet werden kann.

Wie erwartet, zeigen Zellen mit FLT3 ITD D835Y keine erhöhten Zelltod-Raten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen der Zellzyklus-Analyse, in der keine Blockade des Zellzyklus dieser Zellen festgestellt werden konnte. Somit ist nicht von einer Wirksamkeit der drei Inhibitoren in der niedrigen Dosierung von 5 nM gegenüber dieser Mutation auszugehen. Das entspricht den Ergebnissen von Studien aus der klinischen Anwendung von AC220, in denen FLT3 ITD D835Y als sekundäre Mutationen in Patienten mit einem Rezidiv der AML nachgewiesen wurden [10, 15, 78] und unterstreicht die Schwierigkeit diese Resistenz zu überwinden. Überlegungen über

mögliche Ursachen, wie der weiterhin bestehenden Aktivität alternativer Signalwege, wurden oben angestellt. Die Erforschung der Ursache und die Überwindung dieser Resistenz wird bedeutend für die weitere Therapie mit FLT3i sein. Wissenswert ist, dass eine Inkubation mit einer höheren Dosis (40 nM) BS228 zum Zelltod führt (unveröffentlichte Daten von Beyer et al., Manuskript in Bearbeitung).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der neue FLT3i BS228 die FLT3 Mutationen FLT3 D835Y, FLT3 ITD N676K und FLT3 D835Y N676K erfolgreich auf Proteinebene inhibiert, woraufhin ein Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase der entsprechenden Zellen festzustellen ist, der letztlich den Zelltod bedingt. BS228 ist damit ein vielversprechender FLT3i gegenüber Zellen mit diesen Mutationen und weist eine vergleichbare, teilweise sogar bessere Wirksamkeit als AC220 und Crenolanib auf. Dahingegen konnte in den verwendeten niedrigen Dosierungen keine Wirksamkeit gegen Zellen mit FLT3 ITD D835Y festgestellt werden. Hier wird eine höhere Dosierung von BS228 nötig sein (unveröffentlichte Daten von Beyer et al.).

6.5 Fazit und Ausblick

BS228 ist ein neuer FLT3i, der in dieser Arbeit mit den FLT3i AC220 und Crenolanib verglichen wurde. Es gelingt ihm alle der getesteten FLT3 Mutationen auf Proteinebene zu inhibieren, sodass auch die Phosphorylierung des nachgeschalteten Proteins STAT5 reduziert wird. Zudem führt es in fast allen Mutationen in der verwendeten Dosierung, mit Ausnahme von Ba/F3 ITD D835Y Zellen, zu einem Zellzyklus-Arrest. Exemplarisch wurde gezeigt, dass dieser den Zelltod der entsprechenden Zellen bedingt. Derselbe Wirkmechanismus wurde auch für die anderen FLT3i beschrieben [101, 102]. Insgesamt zeigt BS228 eine vergleichbare Wirkung mit AC220 und Crenolanib. In einzelnen Mutationen ist es sogar wirksamer als Crenolanib und es gelingt BS228 mehr Mutationen zu inhibieren als AC220 bzw. Crenolanib. Die mangelnde Wirksamkeit gegenüber Zellen mit FLT3 ITD D835Y ist am ehesten auf die fortgesetzte Aktivität von weiteren Signalwegen, sowie die niedrige Dosierung der FLT3i zurückzuführen und bietet Raum für weitere Untersuchungen. Die AML ist eine heterogene Erkrankung, deren Verlauf durch verschiedene Mutationen beeinflusst wird. Treibermutationen der FLT3, wie ITD, und Punktmutationen, die zu einer sekundären Resistenz gegen FLT3i beitragen können, sind wesentliche Bestandteile des Pathomechanismus. Neue Inhibitoren, wie der FLT3i BS228, geben Hoffnung Rezidive behandeln oder sogar verhindern zu können.

Trotz vielversprechender Ergebnisse erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass es in naher Zukunft eine „*magic bullet*“, also ein einzelnes Medikament, das wirksam gegen alle Mutationen ist, geben wird [28]. Mutmaßlich kann die Prognose einer derart heterogenen Erkrankung am ehesten durch eine multimodale Therapie verbessert werden. Dazu zählt auch die Erprobung von Medikamenten Kombinationen [28]. Beispielhaft sei hier auf die erfolgreiche Kombination von Chemotherapeutika mit Midostaurin verwiesen (s. Kap. 2.3.1). Ob sich die FLT3i der nächsten Generation, wie BS228, für solche Synergismen eignen, werden weitergehende Untersuchungen zeigen.

In Zeiten der personalisierten Medizin bedarf es einer individuell maßgeschneiderten und zielgerichteten Therapie, die sich an den vorliegenden Mutationen des Patienten orientiert [28, 105]. Dafür ist es essenziell, die Wirksamkeit der einzelnen FLT3i gegenüber den unterschiedlichen Mutationen zu kennen, um den jeweils am besten geeigneten Inhibitor auswählen zu können. Entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit ist es nahe liegend BS228 bei nachgewiesener FLT3 D835Y, FLT3 ITD N676K und FLT3 D835Y N676K Mutation zu verwenden. Im Fall von Zellen mit FLT3 ITD D835Y sind höhere Dosierungen von BS228 nötig (unveröffentlichte Daten von Beyer et al.). Während der Therapie mit FLT3i wäre ein regelmäßiges Screening auf Mutationen wünschenswert, um so die aktuelle Therapie, abhängig von den nachgewiesenen Mutationen, anpassen zu können [101, 105].

Insgesamt zeigen die vorliegenden Versuche, dass BS228 die grundlegenden Eigenschaften eines FLT3i, die Hemmung von FLT3 Mutationen auf zellulärer Ebene, erfüllt. Somit sind die Voraussetzungen zur weiteren Erforschung von BS228 gegeben. Neben der Frage des Resistenzmechanismus von FLT3 ITD D835Y und dem Einfluss auf weitere Signalwege, wie beispielsweise PI3K/AKT/mTOR und MAPK-ERK, wird besonders die Wirkweise *in vivo* interessant sein. Welchen Einfluss werden das Knochenmark und Zytokine auf die Wirksamkeit von BS228 haben? Stellen diese möglicherweise Resistenzmechanismen gegenüber dem neuen Wirkstoff dar? Sollte BS228 auch in weiteren Versuchen erfolgsversprechende Ergebnisse erzielen, wird die Pharmakokinetik der Substanz eine weitere Herausforderung darstellen. Außerdem stellt sich langfristig die Frage nach Nebenwirkungen und der Möglichkeit der Kombination mit anderen Substanzen, wie beispielsweise PI3K-Inhibitoren, um Synergismen zu erzielen.

7 Zusammenfassung

Die AML ist eine heterogene Erkrankung, deren Prognose je nach Alter und nachgewiesenen Mutationen variiert [1, 2, 4-9]. Die häufigsten Mutationen sind ITD im *FLT3*-Gen, die mit einer schlechten Prognose korrelieren und als Treibermutation identifiziert wurden [3, 6, 10, 11]. Zudem konnten verschiedene Punktmutationen nachgewiesen werden [3, 4, 12]. Spezifische FLT3 Inhibitoren (FLT3i) wurden entwickelt, um diese Mutationen zu hemmen. Während die erste Generation, wie beispielsweise Midostaurin, relativ unspezifisch wirkt, weist die zweite Generation, wie Quizartinib, Crenolanib und Gilteritinib, eine deutlich spezifischere Inhibition der FLT3 Mutationen auf [3, 19-21, 61, 62, 69, 82]. Unter der Behandlung mit FLT3i treten jedoch regelmäßig sekundäre Mutationen auf, die eine Resistenz der Zellen bewirken [19, 20]. Daher ist ein Ziel in der Entwicklung neuer FLT3i, neben der effektiven Hemmung von FLT3 ITD, die Überwindung solcher Resistenzen. Getestet wurde der neue FLT3i BS228, der unter dem Namen Marbotinib patentiert ist [22], und verglichen mit den zwei vielversprechenden FLT3i der zweiten Generation AC220 und Crenolanib. Als Basis diente ein Zellmodell aus murinen Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen und einem FLT3 WT [24]. Sowohl ITD, als auch Punktmutationen des *FLT3*-Gen bewirken eine konstitutive Aktivität der FLT3 Kinase und des nachgeschalteten Proteins STAT5, wodurch es in der Folge, unter anderem durch die Expression von Cyclin D, zu einer vermehrten Zellproliferation kommt [3, 12, 103]. Daher wurde zunächst die Wirkung von BS228 auf Proteinebene untersucht und mit AC220 und Crenolanib verglichen. Wie die Ergebnisse zeigen, konnte BS228 die Phosphorylierung aller getesteten FLT3 Mutationen und deren STAT5 reduzieren (s. Kap. 5.2.4). Damit zeigte es eine mit AC220 vergleichbare und teilweise bessere Wirksamkeit als Crenolanib. Für die Spezifität der Inhibitoren spricht, dass ein Einfluss auf FLT3 WT und STAT5 nicht nachgewiesen werden konnte. Erwartungsgemäß, und durch einen Vorversuch bestätigt, wurde eine vermehrte Phosphorylierung von STAT5 in Zellen mit FLT3 WT beobachtet, die auf deren Kultivierung in WEHI-Zellen-Überstand und dem darin enthaltenen IL-3 beruht und nicht etwa durch eine vermehrte Aktivierung des FLT3 WT begründet ist (s. Kap. 2.4 und 5.1).

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss von BS228 auf den Zellzyklus analysiert (s. Kap. 5.3). Es zeigte sich, dass die verwendeten FLT3i in Ba/F3 Zellen mit FLT3 ITD, FLT3 ITD N676K, FLT3 D835Y und FLT3 D835Y N676K einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase bewirken. Überraschenderweise war dies nicht der Fall für

Zellen mit FLT3 ITD D835Y, obwohl für diese ebenfalls eine Inhibition auf Proteinebene gezeigt werden konnte (s. Kap. 5.2). Diese Beobachtung ist insofern relevant, da FLT3 ITD D835Y als sekundäre Mutation unter FLT3i Therapie nachgewiesen wurde [10, 15, 16, 19, 78]. Bedeutenderweise gelang es Beyer et al. mit höheren Dosierungen BS228 (40 nM) den Zelltod in Zellen mit FLT3 ITD D835Y nachzuweisen (unveröffentlichte Daten, Manuskript in Bearbeitung). Das spricht für eine dosisabhängige Wirkung von BS228. Der genaue Wirkmechanismus bleibt weiterer Forschung überlassen, denkbar ist die persistierende Aktivität von weiteren intrazellulären Signalwegen, wie PI3K/AKT/mTOR und MAPK-ERK [104, 105].

Neben den Zellzyklusveränderungen wurde ein, mit längerer Inkubationszeit der Inhibitoren, zunehmender Anteil an fragmentierter DNA nachgewiesen (s. Kap. 5.3). Zur Klärung der Frage, ob diese durch vermehrten Zelltod unter der Therapie mit FLT3i entsteht, wurden exemplarisch Annexin V FITC/PI Färbungen durchgeführt. Diese erbrachten den Nachweis von Zelltod in den Zellen, in denen zuvor eine FLT3i vermittelte Zellzyklus-Blockade in der G1-Phase festgestellt wurde (s. Kap. 5.4).

Für den neuen FLT3i BS228 kann resümiert werden, dass er alle getesteten FLT3 Mutationen inhibiert, wodurch das nachgeschaltete Protein STAT5 in geringerem Maße aktiviert wird. Die entsprechenden Zellen, mit Ausnahme von solchen mit FLT3 ITD D835Y, unterliegen zunächst einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase und schließlich dem Zelltod. Die Wirksamkeit ist vergleichbar mit der von AC220 und Crenolanib und teilweise sogar effektiver. Die Ergebnisse legen nahe, dass BS228 ein potenter FLT3i zur Anwendung gegen Zellen mit FLT3 ITD, FLT3 D835Y, FLT3 ITD N676K und FLT3 D835Y N676K ist, dessen weitere Erforschung vielversprechend erscheint. Ein sicherlich entscheidender Faktor in der Therapie der AML wird die Identifizierung der individuell vorliegenden Mutationen sein, um so einen geeigneten FLT3i auswählen zu können [28, 105]. Dies setzt ein umfangreiches Wissen über die verfügbaren FLT3i und deren Wirksamkeit gegenüber den FLT3 Mutationen voraus. Während einer Therapie mit FLT3i wäre ein regelmäßiges Screening auf neue Mutationen erstrebenswert, wodurch die Therapie dementsprechend angepasst werden könnte [101, 105]. Die Vielzahl an Resistenzmechanismen und die Bandbreite unterschiedlicher Mutationen lässt vermuten, dass es in naher Zukunft keine „*magic bullet*“ [28], also ein einzelnes Medikament, für die Therapie der AML geben wird. Vielmehr erscheint eine multimodale, aus mehreren Medikamenten-Kombinationen bestehende, und personalisierte Therapie aussichtsreich [28, 101, 105].

8 Literaturverzeichnis

1. Stock, W. and M.J. Thierman. *Pathogenesis of acute myeloid leukemia*. UpToDate 26. September 2019 [cited 2020 2. April]; Available from: https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-acute-myeloid-leukemia?search=aml&topicRef=94786&source=see_link.
2. Juliusson, G., et al., *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed*. *Blood*, 2012. **119**(17): p. 3890-3899.
3. Daver, N., et al., *Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence*. *Leukemia*, 2019. **33**(2): p. 299-312.
4. Schlenk, R.F., et al., *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(18): p. 1909-18.
5. Nagel, G., et al., *Epidemiological, genetic, and clinical characterization by age of newly diagnosed acute myeloid leukemia based on an academic population-based registry study (AMLSSG BiO)*. *Ann Hematol*, 2017. **96**(12): p. 1993-2003.
6. Thiede, C., et al., *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. *Blood*, 2002. **99**(12): p. 4326-35.
7. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
8. Kottaridis, P.D., et al., *The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials*. *Blood*, 2001. **98**(6): p. 1752-9.
9. Schnittger, S., et al., *Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease*. *Blood*, 2002. **100**(1): p. 59-66.
10. Smith, C.C., et al., *Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia*. *Nature*, 2012. **485**(7397): p. 260-3.
11. Grafone, T., et al., *An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment*. *Oncol Rev*, 2012. **6**(1): p. e8.
12. Bacher, U., et al., *Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2527-37.
13. Yanada, M., et al., *Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis*. *Leukemia*, 2005. **19**(8): p. 1345-9.
14. Mead, A.J., et al., *FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2007. **110**(4): p. 1262-70.
15. Alvarado, Y., et al., *Treatment with FLT3 inhibitor in patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia is associated with development of secondary FLT3-tyrosine kinase domain mutations*. *Cancer*, 2014. **120**(14): p. 2142-9.
16. Nguyen, B., et al., *FLT3 activating mutations display differential sensitivity to multiple tyrosine kinase inhibitors*. *Oncotarget*, 2017.
17. Patel, J.P., et al., *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(12): p. 1079-89.
18. Röllig, C., et al., *Akute Myeloische Leukämie (AML)*. *Onkopedia-Leitlinien Oktober 2019* [cited 2020 5. März]; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>.
19. Kindler, T., D.B. Lipka, and T. Fischer, *FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years*. *Blood*, 2010. **116**(24): p. 5089-102.

Literaturverzeichnis

20. Fletcher, L., S.K. Joshi, and E. Traer, *Profile of Quizartinib for the Treatment of Adult Patients with Relapsed/Refractory FLT3-ITD-Positive Acute Myeloid Leukemia: Evidence to Date*. *Cancer Manag Res*, 2020. **12**: p. 151-163.
21. Hunter, B.D. and Y.B. Chen, *Current Approaches to Transplantation for FLT3-ITD AML*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2020.
22. Mahboobi, S., et al. *Synthesis, Pharmacology and use of new and selective FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) Inhibitors*. 2020 [cited 2021 10. August]; Available from: <https://www.freepatentsonline.com/y2020/0190075.html>.
23. Hayakawa, F., et al., *Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines*. *Oncogene*, 2000. **19**(5): p. 624-31.
24. Warmuth, M., et al., *Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery*. *Curr Opin Oncol*, 2007. **19**(1): p. 55-60.
25. Zhang, S., et al., *Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling*. *J Exp Med*, 2000. **192**(5): p. 719-28.
26. abeomics, A.E.C.L. *IL-3 Signaling*. 02.03.2021]; Available from: <https://www.abeomics.com/il-3-signaling>.
27. Southam, C.M., et al., *A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions*. *Cancer*, 1951. **4**(1): p. 39-59.
28. De Kouchkovsky, I. and M. Abdul-Hay, 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*, 2016. **6**(7): p. e441.
29. Juliusson, G., et al., *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry*. *Blood*, 2009. **113**(18): p. 4179-87.
30. Kayser, S., et al., *The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML*. *Blood*, 2011. **117**(7): p. 2137-2145.
31. Cruse, J.M., R.E. Lewis, and H. Wang, *CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS*. *Immunology Guidebook*, 2004: p. 47-124.
32. Human Cell Differentiation Molecules. *Homepage der Organisation: Human Cell Differentiation Molecules, die HLDA (Human Leucocyte Differentiation Antigens) Workshops durchführen und die CD Nomenklatur charakterisieren*. 2016 02.03.2021]; Available from: <http://www.hcdm.org/>.
33. Schiffer, C.A. and S. Gurbuxani. *Clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of acute myeloid leukemia*. UpToDate 15. August 2019 [cited 2020 2. April]; Available from: https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-pathologic-features-and-diagnosis-of-acute-myeloid-leukemia?search=aml&topicRef=94786&source=see_link.
34. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
35. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*. 2016;**127**(20):2391-2405. *Blood*, 2016. **128**(3): p. 462-463.
36. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. *Blood*, 2017. **129**(4): p. 424-447.
37. Antar, A.I., et al., *FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions*. *Leukemia*, 2020.
38. Rosnet, O., et al., *Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family*. *Oncogene*, 1991. **6**(9): p. 1641-50.
39. Rosnet, O., et al., *Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene*. *Genomics*, 1991. **9**(2): p. 380-5.
40. Matthews, W., et al., *A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations*. *Cell*, 1991. **65**(7): p. 1143-52.
41. Small, D., et al., *STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(2): p. 459-63.

Literaturverzeichnis

42. Ja, F., S. Rossetti, and N. Sacchi, *CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol., 2009. **13**: p. 120-125.
43. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1532-42.
44. Takahashi, S., *Mutations of FLT3 receptor affect its surface glycosylation, intracellular localization, and downstream signaling*. Leuk Res Rep, 2020. **13**: p. 100187.
45. Griffith, J., et al., *The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain*. Mol Cell, 2004. **13**(2): p. 169-78.
46. Kosan, C., et al., *STAT5 acetylation: Mechanisms and consequences for immunological control and leukemogenesis*. Jakstat, 2013. **2**(4): p. e26102.
47. Nakao, M., et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(12): p. 1911-8.
48. Port, M., et al., *Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis*. Ann Hematol, 2014. **93**(8): p. 1279-86.
49. Breitenbuecher, F., et al., *Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor*. Blood, 2009. **113**(17): p. 4074-7.
50. Smith, C.C., et al., *Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis*. Blood, 2017. **130**(1): p. 48-58.
51. Choudhary, C., et al., *Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD*. Blood, 2007. **110**(1): p. 370-4.
52. Koch, S., et al., *Abnormal localization and accumulation of FLT3-ITD, a mutant receptor tyrosine kinase involved in leukemogenesis*. Cells Tissues Organs, 2008. **188**(1-2): p. 225-35.
53. Hospital, M.A., et al., *FLT3 inhibitors: clinical potential in acute myeloid leukemia*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 607-615.
54. Radomska, H.S., et al., *Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C/EBPalpha*. J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2955-66.
55. Zheng, R., et al., *Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1883-90.
56. Abu-Duhier, F.M., et al., *Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 983-8.
57. Kayser, S. and M.J. Levis, *FLT3 tyrosine kinase inhibitors in acute myeloid leukemia: clinical implications and limitations*. Leuk Lymphoma, 2014. **55**(2): p. 243-55.
58. Reindl, C., et al., *Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3700-3707.
59. Grundler, R., et al., *FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4792-9.
60. Choudhary, C., et al., *AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations*. Blood, 2005. **106**(1): p. 265-73.
61. Zimmerman, E.I., et al., *Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **122**(22): p. 3607-15.
62. Smith, C.C., et al., *Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(14): p. 5319-24.
63. Abbas, H.A., et al., *Midostaurin In Acute Myeloid Leukemia: An Evidence-Based Review And Patient Selection*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 8817-8828.
64. National Center for Biotechnology Information USA. *Compound Summary for CID 10366136, Crenolanib*. [cited 2021 23. Juni]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Crenolanib>.
65. Lee, L.Y., et al., *Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor*. Blood, 2017. **129**(2): p. 257-260.

66. Fischer, T., et al., *Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3*. J Clin Oncol, 2010. **28**(28): p. 4339-45.
67. Stone, R.M., et al., *Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation*. N Engl J Med, 2017. **377**(5): p. 454-464.
68. European Medicines Agency. *Rydapt Product Information*. 24. Mai 2018 [cited 2020 13. März]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rydapt-epar-product-information_en.pdf.
69. Zarrinkar, P.P., et al., *AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2009. **114**(14): p. 2984-92.
70. Chao, Q., et al., *Identification of N-(5-tert-butyl-isoxazol-3-yl)-N'-{4-[7-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)imidazo[2,1-b][1,3]benzothiazol-2-yl]phenyl}urea dihydrochloride (AC220), a uniquely potent, selective, and efficacious FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitor*. J Med Chem, 2009. **52**(23): p. 7808-16.
71. Daiichi-Sankyo. *Daiichi Sankyo Receives Negative CHMP Opinion for FLT3 Inhibitor Quizartinib for Treatment of Patients with Relapsed/ Refractory FLT3-ITD AML*. 21. Oktober 2019 [cited 2020 18. März]; Available from: https://www.daiichisankyo.com/media_investors/media_relations/press_releases/detail/007070.html.
72. European Medicines Agency. *Refusal of the marketing authorisation for Vanflyta (quizartinib)*. 6. Januar 2020 [cited 2020 18. März]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vanflyta>.
73. American Society of Hematology. *FDA Declines to Approve Quizartinib for FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia*. 2019 [cited 2021 23. Juni]; Available from: <https://www.ashclinicalnews.org/online-exclusives/fda-declines-approve-quizartinib-flt3-mutated-acute-myeloid-leukemia/>.
74. Cortes, J.E., et al., *Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2019. **20**(7): p. 984-997.
75. Yang, X., A. Sexauer, and M. Levis, *Bone marrow stroma-mediated resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD AML is mediated by persistent activation of extracellular regulated kinase*. Br J Haematol, 2014. **164**(1): p. 61-72.
76. Sexauer, A., et al., *Terminal myeloid differentiation in vivo is induced by FLT3 inhibition in FLT3/ITD AML*. Blood, 2012. **120**(20): p. 4205-14.
77. Levis, M., *Quizartinib for the treatment of FLT3/ITD acute myeloid leukemia*. Future Oncol, 2014. **10**(9): p. 1571-9.
78. Smith, C.C., et al., *FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors*. Leukemia, 2015. **29**(12): p. 2390-2.
79. Heidel, F., et al., *Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain*. Blood, 2006. **107**(1): p. 293-300.
80. Opatz, S., et al., *Exome sequencing identifies recurring FLT3 N676K mutations in core-binding factor leukemia*. Blood, 2013. **122**(10): p. 1761-9.
81. Lewis, N.L., et al., *Phase I study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of oral CP-868,596, a highly specific platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced cancers*. J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5262-9.
82. Galanis, A., et al., *Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants*. Blood, 2014. **123**(1): p. 94-100.
83. Huang, K., et al., *Leukemogenic potency of the novel FLT3-N676K mutant*. Ann Hematol, 2016. **95**(5): p. 783-91.
84. Clinical Trials US National Library of Medicine. *Study Investigating the Efficacy of Crenolanib With Chemotherapy vs Chemotherapy Alone in R/R FLT3 Mutated AML*. 26. Februar 2020 [cited 2020 31. März]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03250338>.

Literaturverzeichnis

85. Zhang, H., et al., *Clinical resistance to crenolanib in acute myeloid leukemia due to diverse molecular mechanisms*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 244.
86. Mahboobi, S., et al., *Novel bis(1H-indol-2-yl)methanones as potent inhibitors of FLT3 and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase*. J Med Chem, 2006. **49**(11): p. 3101-15.
87. Mahboobi, S., et al., *Inhibition of FLT3 and PDGFR tyrosine kinase activity by bis(benzo[b]furan-2-yl)methanones*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(5): p. 2187-97.
88. Notman, R., et al., *Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(43): p. 13982-3.
89. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
90. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
91. Roy, S. and V. Kumar, *A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein*. International Journal of Science and Research (IJSR), 2014. **3**(8): p. 955-960.
92. Rehm, H. and T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics 6.Auflage [E-Book]*. 2010, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
93. Vermes, I., C. Haanen, and C. Reutelingsperger, *Flow cytometry of apoptotic cell death*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 167-90.
94. Riccardi, C. and I. Nicoletti, *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Nature Protocols, 2006. **1**: p. 1458.
95. Ciancio, G., et al., *Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation*. J Histochem Cytochem, 1988. **36**(9): p. 1147-52.
96. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
97. Schmitz, S., *Der Experimentator Zellkultur 3. Auflage [E-Book]*. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
98. Flecknell, P., *Replacement, reduction and refinement*. Altex, 2002. **19**(2): p. 73-8.
99. Kelly, L.M., et al., *FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model*. Blood, 2002. **99**(1): p. 310-8.
100. Sung, P.J., et al., *Hematopoietic cytokines mediate resistance to targeted therapy in FLT3-ITD acute myeloid leukemia*. Blood Adv, 2019. **3**(7): p. 1061-1072.
101. Annesley, C.E. and P. Brown, *The Biology and Targeting of FLT3 in Pediatric Leukemia*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 263.
102. Peschel, I., et al., *FLT3 and FLT3-ITD phosphorylate and inactivate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2017. **102**(8): p. 1378-1389.
103. Able, A.A., J.A. Burrell, and J.M. Stephens, *STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity*. Biology, 2017. **6**(1): p. 20.
104. Darici, S., et al., *Targeting PI3K/Akt/mTOR in AML: Rationale and Clinical Evidence*. Journal of Clinical Medicine, 2020. **9**(9): p. 2934.
105. Scholl, S., et al., *Molecular Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Ongoing Challenges and Future Treatments*. Cells, 2020. **9**(11).
106. Bagrintseva, K., et al., *FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L)*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3679-3685.
107. Brandts, C.H., et al., *Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9643-50.
108. Bruner, J.K., et al., *Adaptation to TKI Treatment Reactivates ERK Signaling in Tyrosine Kinase-Driven Leukemias and Other Malignancies*. Cancer Res, 2017. **77**(20): p. 5554-5563.

Literaturverzeichnis

109. Chougule, R.A., J.U. Kazi, and L. Rönstrand, *FYN expression potentiates FLT3-ITD induced STAT5 signaling in acute myeloid leukemia*. *Oncotarget*, 2016. **7**(9): p. 9964-74.
110. Nogami, A., et al., *FLT3-ITD confers resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors by protecting the mTOR/4EBP1/Mcl-1 pathway through STAT5 activation in acute myeloid leukemia*. *Oncotarget*, 2015. **6**(11): p. 9189-205.

9 Anhang

9.1 BS228 reduziert Phosphorylierung von FLT3 ITD und STAT5

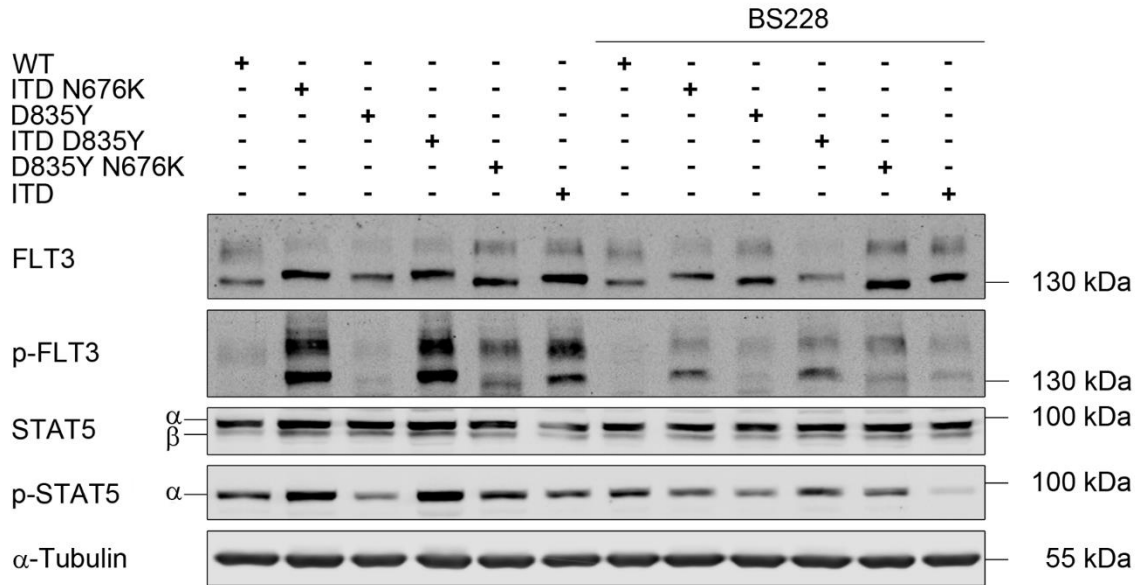


Abbildung 1. Wirkung von BS228 gegen FLT3 ITD. Einmalig wurden Ba/F3 WT Zellen und Ba/F3 Zellen mit FLT3 Mutationen für 2 h mit 5 nM BS228 behandelt und mittels Western Blot analysiert. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. n=1.

Danksagung

Danksagung

Curriculum Vitae

Curriculum Vitae