

Gezielte Induktion von akuten Leukämien in Icsbp-defizienten Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

eingereicht am
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jessica Königsmann
aus Osnabrück

Berlin, Juli 2007

Diese Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in der Abteilung Molekulare Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Ivan Horak und der Betreuung von Dr. Dirk Carstanjen durchgeführt.

Gutachter:

Prof. Dr. Ivan Horak, Abteilung Molekulare Genetik, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie und Freie Universität Berlin

Prof. Dr. Hartmut Oschkinat, Abteilung Protein Struktur, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie und Freie Universität Berlin

Datum der Disputation: 18.03.2008

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Des weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch nicht bei anderen Fakultäten zur Prüfung vorgelegt wurde.

Berlin, den _____

Jessica Königsmann

für Michael und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.I. Leukämie	1
1.II. Chronische myeloische Leukämie	2
1.II.1. Das Philadelphia Chromosom als Marker der CML	2
1.II.2. Die onkogene Tyrosinkinase BCR/ABL reguliert verschiedene Signalwege	3
1.II.3. Wechsel von der chronischen Phase der CML zur Blastenkrise – genetische Instabilität	4
1.III. Icsbp: ein murines CML-Modell	6
1.III.1. Die Icsbp-defiziente Maus – ein Mausmodell für chronische myeloische Leukämie	6
1.III.2. ICSBP als Antagonist von BCR/ABL und Tumorsuppressor -Bedeutung bei der Ausbildung chronischer myeloischer Leukämien	8
1.IV. BCL-2 – Onkogen und Regulator der Apoptose	9
1.IV.1. Funktion von BCL-2 als anti-apoptotisches Protein	10
1.IV.2. Funktion von BCL-2 in der Karzinogenese	12
1.V. NF1 – Tumorsuppressor und Regulator der Proliferation	14
1.V.1. <i>NF1</i> : Zusammenspiel zwischen transkriptioneller Regulation und Leukämogenese	14
1.V.2. Neurofibromatose I: Verlust des Tumorsuppressors NF1 und Ausbildung maligner Krebserkrankungen im Menschen	16
1.V.3. <i>Nf1</i> mutante Mäuse: <i>Nf1</i> -Defizienz und das Ausbildung einer (J)CML-ähnlichen MPD	18
2. Aufgabenstellung	20
3. Material	21
3.I. Reagenzien und Chemikalien	21
3.II. Lösungen und Puffer	22
3.III. Medien	24
3.III.1. Zellkultur	24
3.III.2. Bakterienkultur	25
3.IV. Enzyme	25

3.V. Oligonukleotide	26
3.V.1. Primer für die Real-Time PCR	26
3.V.2. Primer für die RT-PCR	26
3.V.3. Primer für die PCR	27
3.V.4. Primer zur Sequenzierung des <i>BCL-2Mieg3</i> Plasmides	27
3.VI. Antikörper	27
3.VI.1. Western Blot	27
3.VI.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)/Durchflusszytometrie	27
3.VII. Zelllinien	28
3.VIII. Bakterien	28
3.IX. Mäuse	28
3.X. Plasmide	28
3.XI. Kits	29
3.XII. Analyseprogramme	29
3.XIII. Geräte	29
4. Methoden	31
4.I. Molekularbiologische Methoden	31
<u>4.I.1. DNA-Techniken</u>	<u>31</u>
4.I.1.1. Isolation genomischer DNA aus Zellsuspensionen	31
4.I.1.2. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	31
4.I.1.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	32
4.I.1.4. Extraktion der DNA aus Agarosegelen	32
4.I.1.5. Photometrische Quantifizierung der DNA	32
4.I.1.6. Quantifizierung der DNA mittels γ /HindIII-Fragmenten	33
4.I.1.7. Klonierung des retroviralen Vektors <i>BCL-2Mieg3</i>	33
4.I.1.7.1. Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	33
4.I.1.7.2. Ligation	34
4.I.1.7.3. Transformation in kompetente DH5 α Bakterien	35
4.I.1.7.4. Screening der Bakterien-Kolonien	35
4.I.1.7.5. Sequenzierung des retroviralen Konstrukts <i>BCL-2Mieg3</i>	35
4.I.1.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
4.I.1.9. Mikroarray-basierende comparative Genomhybridisierung (Array CGH)	36
<u>4.I.2. RNA-Techniken</u>	<u>37</u>
4.I.2.1. Bedingungen für RNase freies Arbeiten	37
4.I.2.2. Isolation von Gesamt-RNA aus Zellsuspensionen	37

4.I.2.3. Reverse Transkription der RNA	37
4.I.2.4. Quantitative Real-Time PCR	38
<u>4.I.3. Protein-Techniken</u>	<u>39</u>
4.I.3.1. Gesamtproteinextrakte aus Zellen	39
4.I.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	39
4.I.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung denaturierter Proteine	39
4.I.3.4. Western Blot	40
4.II. Zellbiologische Methoden	41
4.II.1. Kultivierung von Zelllinien	41
4.II.2. Isolation primärer Zellen	41
4.II.3. Gewinnung peripherer Blutzellen	42
4.II.4. Kultivierung von Knochenmark-Makrophagen	42
4.II.5. Kultivierung myeloischer Zellen in Suspensionen (für Proliferationsmessungen)	42
4.II.6. Kultivierung myeloischer Zellen in Methylcellulose (CFU-Assays)	43
4.II.7. Herstellung Retrovirus beinhaltender Überstände	44
4.II.8. Bestimmung der Titer der retroviralen Überstände	45
4.II.9. Anreicherung von Knochenmark-Progenitorzellen mittels 5-Fluoruracil und Vorstimulation zur retroviralen Transduktion	45
4.II.10. Retrovirale Transduktion von Knochenmarkzellen	46
4.II.11. Transplantation der retroviral transduzierten Zellen	47
4.II.12. Sortierung Linien-Marker negativer hämatopoetischer Vorläuferzellen mittels MACS	47
4.II.13. Durchflusszytometrische Analyse der Zellen (FACS)	48
4.II.13.1. Analyse anhand von Zellmarkern	48
4.II.13.2. Bestimmung der Zellzyklusphasen und der Apoptoserate – Propidiumiodid-Färbung	49
4.II.14. Bestimmung der Proliferationsrate über H ³ -Thymidin-Inkorporation	49
4.II.15. Spektrale Karyotypisierung (SKY)	50
4.III. Maus-Analyse	50
4.III.1. Bestimmung der Organgewichte	50
4.III.2. Analyse des peripheren Blutes	51
4.IV. Histopathologie	51
4.V. Mikroskopie	51
4.V.1. Herstellung von Blutaussstrichen	51
4.V.2. Herstellung von Zytospins	51

4.V.3. May-Grünwald-Giemsa Färbung	52
5. Ergebnisse	53
5.I. BCL-2 und Icsbp-Defizienz kooperieren nicht bei der Induktion von Leukämien	53
5.I.1. <i>BCL-2</i> wird retroviral in den myeloischen Vorläuferzellen exprimiert	54
5.I.2. Überlebenskurven der transplantierten Mäuse	55
5.I.3. Höchste Leukozytenzahl im peripheren Blut bei Überexpression von <i>BCL-2</i> in <i>Icsbp</i> ^{+/+} Progenitoren	56
5.I.4. Keine Unterschiede in den Milzgewichten und Lebergewichten der transplantierten Mäuse	58
5.I.5. Überexpression von <i>BCL-2</i> führt, unabhängig von der <i>Icsbp</i> Expression, zur Ausbildung von myeloischen als auch lymphatischen Leukämien	59
5.I.6. Geringe Leukämie-Inzidenz: Nur 6% respektive 13% der <i>BCL-2</i> überexprimierenden Mäuse entwickeln Leukämien	62
5.II. Nf1-Haploinsuffizienz führt zum Ausbilden von Leukämien in Icsbp-defizienten Mäusen	64
<u>5.II.1. <i>Nf1</i> Expression in Abhängigkeit von den Genotypen</u>	<u>65</u>
5.II.1.1. <i>Nf1</i> Heterozygotität führt zu einer Reduktion der <i>Nf1</i> Expression um mindestens 50%	65
5.II.1.2. Geringste <i>Nf1</i> Expression bei <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäusen	66
<u>5.II.2. Prä-Leukämischer Phänotyp: Zusätzliche Nf1-Haploinsuffizienz führt in den <i>Icsbp</i>^{-/-} Mäusen zu einer gesteigerten Myelopoese</u>	<u>68</u>
5.II.2.1. Höchste Leukozytenzahl im peripheren Blut junger <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäuse. Anzahl nimmt nicht mit zunehmendem Alter der Mäuse zu	68
5.II.2.2. Die Erhöhung der Leukozytenzahl basiert auf einer Vermehrung der Granulozyten	69
5.II.2.3. Erhöhtes Milzgewicht und erhöhte Milzzellzahl bereits bei jungen <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäusen	71
5.II.2.4. Höchste Leukozytenzahl in der Milz von jungen <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäusen	73
5.II.2.5. Erhöhter Anteil neutrophiler Granulozyten in den Lymphknoten von prä-leukämischen <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäusen	75
5.II.2.6. Die Lebern der prä-leukämischen <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäuse zeigen keine Anzeichen einer Infiltration	77

5.II.2.7. Verteilung von <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} und <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/+} Zellen über die Zellzyklusphasen	88
5.II.2.8. Höchste CFU-GM Kolonienanzahl aus <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Knochenmarkzellen	81
5.II.2.9. Gleichverteilung der hämatopoetischen Progenitor-Populationen zwischen <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} und <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/+} Mäusen	86
5.II.2.10. Höchste CFU-GM Kolonienanzahl auch aus <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Milzzellen	88
5.II.2.11. Myeloische Suppressor Zellen treten in <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäusen nicht vermehrt auf	92
<u>5.II.3. Leukämischer Phänotyp: Ausbilden von myeloischen Leukämien</u>	<u>94</u>
5.II.3.1. <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäuse sterben früher	94
5.II.3.2. Zunahme peripherer Leukozyten im Blut erkrankter <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäuse	95
5.II.3.3. Zunahme des Milz- und Lebergewichtes bei den erkrankten <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäusen	97
5.II.3.4. <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäuse bilden Leukämien aus	100
5.II.3.5. 46% aller <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäuse erkranken an Leukämien	105
5.II.3.6. Myeloische Leukämien überwiegen	106
5.II.3.7. Hohe Leukozytenzahl, hohes Milz- und Lebergewicht bei blastenreichen Leukämien	107
5.II.3.8. Korrelationen von sekundären genetischen Veränderungen und leukämischen Phänotypen	109
5.II.3.9. Verlust des <i>Nf1</i> WT-Transkripts basiert auf einem LOH von <i>Nf1</i> und ist abhängig vom Leukämietyp	110
6. Diskussion	113
6.I. Keine Kooperation von <i>Icsbp</i>-Defizienz und <i>Bcl-2</i> Überexpression bei der Induktion von Leukämien	113
6.II. <i>Nf1</i>-Haploinsuffizienz führt zur Ausbildung von Leukämien in <i>Icsbp</i>-defizienten Mäusen	116
6.II.1. Negativ additiver Effekt von <i>Icsbp</i> -Defizienz und <i>Nf1</i> -Haploinsuffizienz auf die <i>Nf1</i> Expression	117
6.II.2. Prä-leukämischer Phänotyp: Konsequenzen der geringen <i>Nf1</i> Expression in <i>Icsbp</i> ^{-/-} <i>Nf1</i> ^{+/-} Mäusen	118
6.II.3. Kooperative Leukämogenese	120
6.II.4. Bedeutung des LOH von <i>Nf1</i> bei der Ausbildung der Leukämien	123
6.II.5. Ausblick	127

7. Zusammenfassung	128
8. Summary	130
9. Literatur	132
10. Anhang	144
10.I. Abkürzungen	144
10.II. Schreibweisen	146
10.III. Lebenslauf	147
10.IV. Publikationen, Patent, Poster	148
10.V. Danksagung	149