

1. Einleitung

1.I. Leukämie

Leukämie (leukos: weiß, kemia: Blut; „weißes Blut“) bezeichnet eine maligne kanzeröse Entartung des hämatopoetischen Systems. Diese Krebserkrankung zeichnet sich durch eine erhöhte Anzahl weißer Blutzellen (Leukozyten) und insbesondere durch eine stark erhöhte Anzahl ihrer unreifen Progenitoren im Knochenmark und in der Peripherie aus. Das Krankheitsbild Leukämie wurde erstmals 1845 von Rudolf Virchow beschrieben (Virchow, 1845).

Die Ursachen für Leukämien sind vermutlich verschiedenste chromosomale, epigenetische und/oder genetische Veränderungen (wie z.B. Chromosomentranslokationen, Promoter-Methylierungen, Deletionen, Insertionen, Mutationen) in den Zellen und damit einhergehende Veränderungen von Gen-Expressionsraten. Häufig werden, als Konsequenz, Tumorsuppressorgene inaktiviert und/oder Onkogene verstärkt exprimiert. In Folge führt dies zu Störungen im Gleichgewicht zwischen Proliferation, Apoptose und Differenzierungsvorgängen der betroffenen Zellen. In leukämischen Zellen verläuft im allgemeinen die Proliferation unabhängig von externen Stimuli und die Proliferationsrate kann erhöht sein. Apoptosevorgänge hingegen werden inhibiert und Differenzierungsvorgänge gestoppt (zur Übersicht: Hanahan und Weinberg, 2000; Cory et al., 2003).

In Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf werden die Leukämien eingeteilt in akute Formen, die spontan auftreten und sehr schnell zum Tode des Patienten führen können, und chronische Leukämien, deren Krankheitsverlauf sich meist über mehrere Jahre und unterschiedliche Phasen erstreckt.

Je nach Zell-Typus der vermehrt vorkommenden Leukozyten bzw. Progenitoren werden die verschiedenen Leukämietypen klassifiziert. Leukämien mit einer Anreicherung von Lymphozyten und lymphatischen Vorläuferzellen werden als lymphatische Leukämien bezeichnet, dementsprechend Leukämien mit überwiegend myeloischen ausgereiften Zellen bzw. Progenitoren als myeloische Leukämien. Eine genauere Beschreibung der Leukämie liefert dann die Bezeichnung nach den Subklonen: Bspw. die myelomonozytäre Leukämie ist eine Leukämie mit myeloischer Ausrichtung und ist insbesondere durch eine Anreicherung von Monozyten gekennzeichnet.

1.II. Chronische myeloische Leukämie

Bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) sind die Zellregulationsmechanismen (Proliferation, Apoptose, Differenzierung) in Zellen der myeloischen Reihe gestört. Als chronische Leukämie ist die CML durch einen langen Krankheitsverlauf und Ausprägung unterschiedlicher Krankheitsphasen charakterisiert: Die initiale chronische Phase zeichnet sich durch eine Akkumulation von reifen Granulozyten und unreifen myeloischen Vorläuferzellen (Myeloblasten) im peripheren Blut und extramedullären Gewebe aus (Savage et al., 1997). Der chronischen Phase, die beim Menschen mehrere Jahre andauern kann, folgt die Akzelerationsphase. Sie ist gekennzeichnet durch eine Zunahme an Myeloblasten bei Abnahme der Anzahl an funktionellen Granulozyten (Kantarjian und Talpaz, 1988). Die letzte Phase der CML ist die akute leukämische Phase, auch bezeichnet als Blastenkrise. Diese Phase ist charakterisiert durch eine überproportionale Expansion der Myeloblasten bei gleichzeitigem Differenzierungsstop der myeloischen Zellreihe (Spiers, 1977; Kantarjian et al., 1987). Unbehandelt führt die Blastenkrise beim Menschen in wenigen Monaten zum Tod.

Neben der Einordnung als Leukämie gehört die CML zur Gruppe der myeloproliferativen Syndrome (MPS; englisch **MPD**: „myeloproliferative disorder“, die Abkürzung MPD wird hier im weiteren verwendet) (Dameshek, 1951). MPDs sind chronische hämatologische Erkrankungen. Charakteristikum für eine MPD ist eine auf Progenitorzellen beruhend klonale Myeloproliferation (zur Übersicht: Tefferi und Gilliland, 2007).

Der Gruppe der MPDs gehören, aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten, noch die juvenile CML (JCML), die chronische neutrophile Leukämie (CNL), die chronische eosinophile Leukämie (CEL), die chronische basophile Leukämie (CBL), die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) und diverse andere Krankheiten des myeloischen Systems an.

1.II.1. Das Philadelphia Chromosom als Marker der CML

1960 entdeckten Nowell P.C. und Hungerford D.A., in Philadelphia, eine konstante chromosomale Veränderung in Tumorzellen von CML-Patienten. Sie fanden ein verkürztes Chromosom 22, das sogenannte Philadelphia-Chromosom (Ph) (Nowell und Hungerford, 1960).

Das Philadelphia-Chromosom liegt bei ca. 90% aller CML-Patienten vor und ist daher ein geeigneter genetischer Marker für die CML.

1973 konnte gezeigt werden, dass Ph aus einer reziproken Translokation zwischen dem langen Arm von Chromosom 9 und Chromosom 22 (t(9;22)) resultiert (Rowley, 1973). Dabei kommt es zum Austausch von genetischem Material. Das *Abelson*-Gen (*ABL*) auf Chromosom 9 wird mit der *BCR* („breakpoint cluster region“) von Chromosom 22 neu kombiniert, das Fusionsgen *BCR/ABL* entsteht (Heisterkamp et al., 1985).

Wie in zahlreichen in vitro Versuchen (McLaughlin et al., 1987; Daley und Baltimore, 1988; Gishizky und Witte, 1992) und anhand von Tiermodellen (zur Übersicht: Ren, 2002) gezeigt wurde, ist das Vorhandensein des Onkoproteins BCR/ABL ausreichend zur Ausbildung maligner Transformationen. Somit spielt BCR/ABL eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der CML.

1.II.2. Die onkogene Tyrosinkinase BCR/ABL reguliert verschiedene Signalwege

Das Fusionsprotein BCR/ABL besitzt, bedingt durch die Fähigkeit zur Oligomerbildung über die „coiled-coil“-Region (McWhirter et al., 1993) und der Deletion der regulierenden SH3 Domäne von ABL (Muller et al., 1991), eine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität. Diese im Zytosol vorliegende onkogene Kinase aktiviert zahlreiche Signalwege, die für das Ausbilden der CML und das Fortschreiten der Krankheit verantwortlich sind (Abbildung 1): Zum einen wird die Apoptoserate vermindert. Die geschieht über BCR/ABL vermittelte Aktivierung des PI(3)K/AKT Signalweges und, in Folge, Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins BAD. Zudem erhöht BCR/ABL über den RAS-Signalweg die Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 (Sanchez-Garcia und Martin-Zanca, 1997) und über STAT5-Phosphorylierung auch die Expression des anti-apoptotischen *BCL-X_L* (zur Übersicht: Sattler und Salgia, 1997; Shet et al., 2002; Calabretta und Perrotti, 2004).

Des weiteren sind die CML-Zellen zur stimulations-unabhängigen Proliferation befähigt. Dies wird durch autonome, BCR/ABL gesteuerte Aktivierung des RAS-Signalweges und des JAK/STAT5-Signalweges erreicht (zur Übersicht: Sattler und Salgia, 1997; Shet et al., 2002; Calabretta und Perrotti, 2004). Eine direkte Beteiligung von BCR/ABL am Differenzierungsstopp der Zellen ist nicht weiter erwiesen.

Zusätzlich bewirkt BCR/ABL eine abnormale Funktion des Zytoskelettes. BCR/ABL ist mit Actin kolokalisiert und phosphoryliert benachbarte Proteine des Zytoskeletts (z.B. FAK, Paxillin) (Abbildung 1), dies ist eine mögliche Erklärung für die veränderte Adhäsion der CML-Zellen an die Stromazellen und für die Zirkulation der unreifen hämatopoetischen Zellen im peripheren Blut, sowie in der Milz und der Leber (zur Übersicht: Sattler und Salgia, 1997; Shet et al., 2002; Calabretta und Perrotti, 2004).

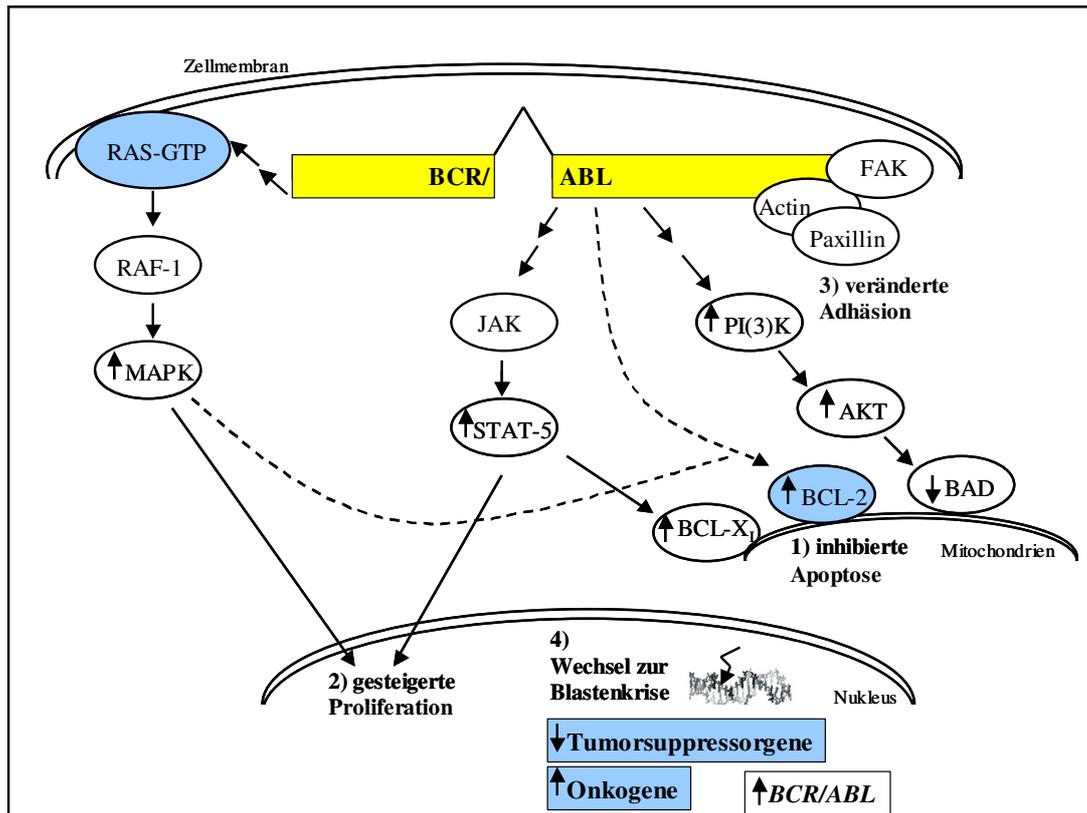


Abbildung 1: BCR/ABL vermittelte Signalwege – Induktion der CML und Wechsel zur Blastenkrise. 1) Anti-apoptotisch: BCR/ABL aktiviert den PI(3)K/AKT Signalweg, darüber Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins BAD. Erhöhung der *BCL-2* Expression durch BCR/ABL über den RAS-Signalweg und gesteigerte *Bcl-X_L* Expression über aktives Stat5. 2) Autonome (gesteigerte) Proliferation: Aktivierung des RAS-Signalweges und der JAK/STAT5 Signalwege über BCR/ABL. 3) Veränderte Adhäsion der CML-Zellen/Zirkulation: BCR/ABL ist mit Actin colokalisiert und phosphoryliert Proteine (z.B. FAK und Paxillin) des Zytoskeletts. 4) Wechsel von der chronischen Phase zur Blastenkrise: sekundäre chromosomale, epigenetische und/oder genetische Veränderungen führen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Aktivierung von Onkogenen (häufig auch Erhöhung der *BCR/ABL* Expression). MAPK: MAP Kinasen, JAK: Janus Kinasen, PI(3)K: Phosphatidyl-Inositol(3)kinase. Blaue Kennzeichnung: in der Doktorarbeit (auf *Ic5bp*^{-/-} Hintergrund) betrachtete Aspekte.

1.II.3. Wechsel von der chronischen Phase der CML zur Blastenkrise – genetische Instabilität

Initiation der Signalwege zur Inhibition der Apoptose und Erhöhung der Proliferationsrate (Kramer et al., 2001) sind die Grundlage zur Ausbildung der chronischen Phase der CML. Welche Faktoren und Prozesse jedoch notwendig sind, um den Wechsel von der chronischen Phase über die Akzelerationsphase zur Blastenkrise zu bewerkstelligen, ist nicht im Detail bekannt.

Ein Fortschreiten der CML ist jedoch häufig mit chromosomalen, genetischen und/oder epigenetischen Veränderungen verbunden (zur Übersicht: Sattler und Salgia, 1997; Shet et al., 2002; Calabretta und Perrotti, 2004).

So wurde beobachtet, dass 70-80% der CML-Patienten in der Blastenkrise zusätzliche, nicht-zufällige chromosomale Veränderungen insbesondere der Chromosomen 8, 17, 19 und 22 aufweisen. Besonders häufig wird dabei eine Verdoppelung des Philadelphia-Chromosoms und Trisomie 8 nachgewiesen (zur Übersicht: Shet et al., 2002).

Als Folge von sekundären chromosomalen, genetischen und auch epigenetischen Veränderungen werden häufig Tumorsuppressorgene inaktiviert und Onkogene aktiviert (Abbildung 1).

Ein Beispiel für ein solches, in CML-Zellen über den fortschreitenden Krankheitsverlauf häufig inaktiviertes, Tumorsuppressorgen ist das auf Chromosom 17 lokalisierte *p53*. Zum Schutz des Genoms und zur Einleitung von Regenerationsprozessen erhöht *p53* die Expression pro-apoptotischer Faktoren, zudem erhöht es die Expression Zellzyklus inhibierender Proteine (zur Übersicht: Shet et al., 2002). Mausmodelle beweisen die Bedeutung des Verlusts von *p53* in der Transformation zur Blastenkrise: *BCR/ABL* transgene *p53*^{+/-} Mäuse (Honda et al., 2000) sowie Transplantationsversuche mit *BCR/ABL* exprimierenden *p53*-defizienten Knochenmarkzellen (Skorski et al., 1996) zeigten in vivo ein sehr schnelles Ausbilden der Blastenkrise.

Andere Tumorsuppressorgene, deren Expressionsverlust in Zusammenhang mit der Ausbildung der Blastenkrise bei CML stehen, sind z.B. *p16^{INK4a}* (kodiert u.a. einen Cyclin D Inhibitor) (Sill et al., 1995) und *c-ABL* (notwendig für die DNA-Reparatur) (Zion et al., 1994).

BCL-2 ist ein Beispiel für ein in CML-Zellen aktiviertes Onkogen (Abbildung 1). Das anti-apoptotische *BCL-2* verhindert die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien und somit die Aktivierung apoptotischer Caspase-Kaskaden (zur Übersicht: Zinkel et al., 2006).

Häufig wird auch ein Anstieg des *BCR/ABL* mRNA Levels mit fortschreitender Krankheit beobachtet (Gaiger et al., 1995) (Abbildung 1), was meist auf eine Verdoppelung des Philadelphia-Chromosoms zurückzuführen ist (zur Übersicht: Shet et al., 2002). Die verschiedenen *BCR/ABL* vermittelten Signalwege werden daher dosis-abhängig, mit steigendem *BCR/ABL* über den Verlauf der Krankheit, reguliert (Cambier et al., 1998).

Des Weiteren konnte eine gesteigerte Expression des Onkogens *c-MYC* in CML-Blastenzellen nachgewiesen werden (zur Übersicht: Shet et al., 2002).

Genetische Instabilität und, in Folge, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und/oder Aktivierung von Onkogenen, sind daher vermutlich die Basis für ein Fortschreiten der CML von der chronischen in die akute leukämische Krankheitsphase.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollten gezielte, designierte Aspekte zur Induktion eines Phasenwechsel bei einer CML respektive zur Ausbildung einer akuten Leukämie aus einer MPD betrachtet werden. Dazu wurden im Mausmodell, auf dem Hintergrund einer CML-ähnlichen MPD, ausgewählte Onkogene überexprimiert bzw. Tumorsuppressorgene inaktiviert. Zunächst wird daher das verwandte murine CML-Modell vorgestellt. Im Folgenden wird dann in die Tumorsuppressorgene und Onkogene eingeleitet, die in der vorliegenden Doktorarbeit berücksichtigt wurden. Es wird ihre jeweilige allgemeine Funktion und ihre Bedeutung in der Leukämogenese beschrieben und das Zusammenspiel der Faktoren im Hinblick auf die Ausbildung der akuten leukämischen Phase erläutert.

1.III. Icsbp: ein murines CML-Modell

ICSBP („interferon consensus sequence binding protein“) wurde 1990 als ein nukleäres Protein, welches an die Interferon Consensus Sequenz (ICS) im MHC („major histocompatibility complex“) Klasse1-Genkomplex bindet, identifiziert (Driggers et al., 1990). ICSBP, auch genannt IRF-8 („interferon regulatory factor 8“), gehört zur Familie der Interferon regulierten Faktoren (IRF) (zur Übersicht: Nguyen et al., 1997). Proteine dieser Familie besitzen am N-Terminus eine konservierte DNA-Bindedomäne und am C-Terminus eine IRF Assoziationsdomäne zur Bindung von regulatorischen Kofaktoren (z.B. IRF1, IRF2, PU.1) (zur Übersicht: Levi et al., 2002).

ICSBP wird in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Es wurde in Monozyten, B-Zellen und aktivierten T-Zellen (Driggers et al., 1990; Nelson et al., 1996) sowie frühen hämatopoetischen Progenitorzellen (CD34⁺ Zellen: Qian et al., 2002; Lin⁻ Zellen: Tsujimura et al., 2002; GMP ("granulocyte-monocyte progenitors"): Terszowski et al., 2005) nachgewiesen. Zusätzlich kann die Expression über Interferon γ reguliert werden (Driggers et al., 1990).

ICSBP ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit vom Kofaktor und der jeweiligen DNA-Bindestelle als Repressor oder auch Aktivator der Transkription funktioniert (zur Übersicht: Levi et al., 2002).

1.III.1. Die *Icsbp*-defiziente Maus – ein Mausmodell für chronische myeloische Leukämie

Mittels Gen Targeting wurden *Icsbp*-defiziente (*Icsbp*^{-/-}) Mäuse generiert und 1996 von Holtschke et al. charakterisiert und publiziert. Diese *Icsbp*^{-/-} Mäuse sind immundefizient, d.h.

sie sind anfälliger gegenüber Virusinfektionen und Infektionen mit intrazellulären Bakterien (Holtschke et al., 1996; Fehr et al., 1997).

Als prägnantestes Charakteristikum jedoch bilden sie, mit einer Penetranz von 100%, eine MPD ähnlich der humanen CML aus (Holtschke et al., 1996). Dabei ist die Anzahl der Makrophagen reduziert, hingegen die Anzahl der Granulozyten und der myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphknoten stark erhöht. Es kommt zu einer gesteigerten Infiltration der peripheren hämatopoetischen Organe Lymphknoten und Milz, sowie der Leber, ein vorgeburtlich ebenfalls hämatopoetisches Organ. Dies zeigt sich in einer Umfangsvermehrung der Milz und der Leber (Hepatosplenomegalie) und in vergrößerten Lymphknoten.

Die Ausbildung der CML-ähnlichen MPD beruht auf einem intrinsischen, leukämogenen Potential, unbekannter Ursache, von *Icsbp*^{-/-} hämatopoetischen Progenitorzellen. So haben Mäuse denen *Icsbp*^{-/-} Zellen (Knochenmarkszellen bzw. fötale Leberzellen) transplantiert wurden, nach dem adoptiven Transfer eine wesentlich kürzere Lebensspanne als Mäuse, die *Icsbp*^{+/+} Zellen erhalten haben. In den mit *Icsbp*^{-/-} Zellen rekonstituierten Tieren kann massive Granulozytose und Anzeichen einer Blastenkrise beobachtet werden (Scheller et al., 1999).

Die hämatopoetischen Progenitorzellen von *Icsbp*^{-/-} Mäusen besitzen zudem ähnliche Eigenschaften wie hämatopoetische Vorläuferzellen aus CML-Patienten: Zum einen zeigen sie, unter Stimulation mit den Zytokinen GM-CSF, G-CSF oder IL-3 ein erhöhtes Potential zur Bildung von in vitro Kolonien (Emanuel et al., 1991; Scheller et al., 1999). Des weiteren zeichnen sich die Zellen durch eine verminderte Adhäsion an Fibronectin und gesteigerte Adhäsion an Laminin aus (Verfaillie et al., 1992; Scheller et al., 1999).

Nur sehr selten wird in den *Icsbp*-defizienten Mäusen ein Ausbilden der Blastenkrise bzw. einer akuten leukämischen Phase beobachtet. Die überwiegende Mehrheit der *Icsbp*^{-/-} Mäuse verbleibt in der chronischen Phase der Krankheit, bildet also lediglich ein myeloproliferatives Syndrom, eine sogenannte CML-ähnliche MPD, aus.

In der vorliegenden Doktorarbeit dienen die *Icsbp*^{-/-} Mäuse, mit ihrer Funktion als CML-Modell mit manifestiertem chronischem Verlauf, daher als Grundlage zur Analyse des Phasenwechsels bei CML.

1.III.2. ICSBP als Antagonist von BCR/ABL und Tumorsuppressor - Bedeutung bei der Ausbildung chronischer myeloischer Leukämien

Es sind unterschiedliche Funktionen für den Transkriptionsfaktor ICSBP in der Myelopoese bekannt: ICSBP spielt eine entscheidende Rolle in der myeloischen Entwicklung bei der Ausbildung der Makrophagen. Es wurde publiziert, dass in den *Icsbp*^{-/-} Mäusen die Entwicklung der Makrophagen beeinträchtigt (Holtschke et al., 1996) und die Anzahl M-CSF Rezeptor exprimierender Progenitorzellen reduziert ist (Scheller et al., 1999). Bei Überexpression von *Icsbp* in primären Knochenmark-Progenitoren hingegen, differenzieren diese Zellen zu Makrophagen (Tamura et al., 2000).

Zum zweiten spielt ICSBP eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von myeloproliferativen Störungen wie der CML. Hierfür zeigte sich das erste Indiz, wie beschrieben, in der Ausbildung einer CML-ähnlichen MPD in den *Icsbp*^{-/-} Mäusen (Holtschke et al., 1996).

Die Bedeutung des *ICSBP* Expressionsverlustes für das Ausbilden einer CML wurde in humanen Patienten bestätigt. In 79% der untersuchten CML Patienten konnte kein oder nur sehr wenig *ICSBP* Transkript nachgewiesen werden (Schmidt et al., 1998).

In den Patienten mit CML konnte zudem eine inverse Korrelation in der Expression von *ICSBP* und dem CML-spezifischen Onkogen *BCR/ABL* festgestellt werden, je höher der *BCR/ABL*-Expressionslevel desto geringer die *ICSBP* Expression (Schmidt et al., 1998).

Nachfolgende Studien bewiesen eine antagonistische Rolle von ICSBP gegenüber BCR/ABL: In *BCR/ABL* überexprimierten Mäusen mit CML-ähnlicher MPD, ist die *Icsbp* Expression reduziert (Hao und Ren, 2000). Bei Koexpression von *BCR/ABL* und *ICSBP* ist die MPD in den Mäusen abgeschwächt ausgebildet (Hao und Ren, 2000; Deng und Daley, 2001). In Zelllinien konnte gezeigt werden: bei gleichzeitiger Expression von *Icsbp* und *BCR/ABL* initiiert *Icsbp*, trotz der *BCR/ABL* induzierten, gesteigerten Proliferation, einen Wachstumsstopp und leitet die Makrophagen-Differenzierung ein (Tamura et al., 2003; Burchert et al., 2004b). Zudem reprimiert *Icsbp* die Expression der von *BCR/ABL* aktivierten Onkogene *c-MYC* (Tamura et al., 2003) und *BCL-2* (Burchert et al., 2004b).

Der inhibierende Effekt von ICSBP auf die Progression der CML wird auch therapeutisch genutzt. Interferon α , welches zur CML-Therapie eingesetzt wird, erhöht die *ICSBP* Expression in vivo (Schmidt et al., 2001).

In Folge der Expression von *BCR/ABL* zeichnen sich CML-Zellen u.a. durch eine erhöhte Apoptose-Resistenz aus. Unter dieser Prämisse bewiesen Untersuchungen für ICSBP eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Apoptose. Myeloische Zellen aus *Icsbp*^{-/-} Mäusen zeigen eine verminderte Apoptoserate, hingegen *ICSBP*-überexprimierende U937 Zellen

(U937: humane monozytäre Zelllinie) zeigen eine verstärkte Apoptoseanfälligkeit. In den *ICSBP* überexprimierenden Zellen ist zudem eine erhöhte Expression des pro-apoptotischen Gens *Caspase 3* und eine reduzierte Expression des anti-apoptotischen *BCL-X_L* festzustellen (Gabriele et al., 1999).

Zusammenfassend definiert sich daher die Rolle von *ICSBP* bei der Ausbildung von CML als Antagonist zu *BCR/ABL*, der den *BCR/ABL* induzierten Signalwegen entgegensteuert, und damit gleichzeitig als Tumorsuppressor, der die Entwicklung myeloischer Progenitoren reguliert.

1.IV. BCL-2 – Onkogen und Regulator der Apoptose

BCL-2 („B-cell lymphoma/leukaemia 2“) wurde bei der Untersuchung der Translokationsbruchstelle in follikulären B-Zell-Lymphomen mit der Chromosomentranslokation t(14;18) entdeckt (Tsujiimoto et al., 1984). Es gehört zu der *BCL-2* Familie, die sich untergliedert in die anti-apoptotische *BCL-2* Unterfamilie (mit den Mitgliedern *BCL-2*, *BCL-X_L*, *BCL-W*, *MCL-1* und *A1*) und in die pro-apoptotischen *BH3*- (mit *BID*, *HRK*, *BIM_L*, *NOXA*, *BAD*, *PUMA*, *BMF* und *BIK*) und *BAX*-Unterfamilien (mit *BAK*, *BAK* und *BOK*). Alle Mitglieder der *BCL-2* Familie zeichnen sich durch *BCL-2* homologe(BH)-Domänen aus. In der *BH3*-Unterfamilie ist dies, namensgebend, auf die Interaktion gewährleistende *BH3*-Domäne beschränkt (zur Übersicht: Cory und Adams, 2002; Adams und Cory, 2007).

Mitglieder der *BCL-2* Unterfamilie besitzen eine C-terminale hydrophobe Domäne, mit der sie permanent (*BCL-2*) oder nach zytotoxischem Signal (*BCL-X_L*, *BCL-W*) in den Zytoplasma zugewandten Membranen von Nukleus, endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien verankert sind (Janiak et al., 1994; Cory und Adams, 2002).

Inaktivierung dieser anti-apoptotischen Proteine führt jeweils zur Apoptose spezifischer Zellen. So ist in *Bcl-2*^{-/-} Mäusen das Überleben reifer Lymphozyten und melanomer Stammzellen sowie die Entwicklung der Niere beeinträchtigt (Veis et al., 1993).

Die Mitglieder der *BH3*-Unterfamilie fungieren als Schadenssensoren und als Antagonisten zu den anti-apoptotischen *BCL-2* Proteinen. In gesunden Zellen sind sie über Bindung an Mikrotubuli (Puthalakath et al., 1999) oder an das Actin-Zytoskelett (Puthalakath et al., 2001), Phosphorylierung (Zha et al., 1996), proteolytische Spaltung (Li et al., 1998; Luo et al., 1998) oder transkriptionell (Oda et al., 2000; Nakano und Vousden, 2001; Yu et al., 2001) reguliert .

Für die Cytochrom C Ausschüttung aus den Mitochondrien sind Proteine der BAX-Unterfamilie verantwortlich (Cory und Adams, 2002).

1.IV.1. Funktion von BCL-2 als anti-apoptotisches Protein

Apoptose ist ein streng kontrollierter, programmierter Zelltod und dient der Homöostase von Geweben, ist entscheidend bei der Embryogenese und spielt eine Rolle bei der Pathogenabwehr (zur Übersicht: Adams und Cory, 2007). Deregulierte Apoptose spielt ebenso eine Rolle in der Karzinogenese. In Krebszellen ist dieser Prozess oftmals inhibiert.

Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen: der Initiationsphase und der Effektorphase mit der Aktivierung der proteolytisch aktiven Caspasen (Caspase = Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum; spalten Peptidbindungen C-terminal von Aspartat).

Bei der Initiationsphase unterscheidet man, je nach Ursprung des Apoptose-Stimulus, den extrinsischen und den intrinsischen Weg.

Beim extrinsischen Weg wird die Apoptose durch Ligandenbindung an TNF („tumor necrosis factor“)-Rezeptoren initiiert. Nach Trimerisierung dieser sogenannten Todesrezeptoren werden über die Todesdomänen Adapterproteine rekrutiert und schließlich über das Adapterprotein FADD („FAS associated death domain“) die Initiator-Caspase 8 aktiviert (zur Übersicht: Ashkenazi, 2002).

Beim intrinsischen Weg wird das Apoptoseprogramm über verschiedenste Stresssignale innerhalb der Zelle, wie z.B. Zytokin-Mangel oder DNA- bzw. Zell-Schäden, aktiviert. Die Regulation dieses Weges erfolgt über Proteine der BCL-2 Familie. Der genaue Regulationsmechanismus ist nicht bekannt. Ein Modell postuliert, dass Proteine der BH3-Unterfamilie nach zytotoxischem Signal und erfolgter Konformationsänderung an BCL-2 (bzw. BCL-X_L, BCL-W) binden. Durch Bildung des BH3-BCL-2-Komplexes wird die sterische Inhibition über BCL-2 aufgehoben und somit erst ermöglicht, dass sich BAX und BAK in die Mitochondrienmembran integrieren. Nach Konformationsänderung können sich diese Faktoren mit ihrer nun freien hydrophoben Helixstruktur in der Membran der Mitochondrien verankern und bilden dort Homodimere (Hsu und Youle, 1998; Nechushtan et al., 2001). Durch Bildung von Poren oder Kanälen (Pavlov et al., 2001) oder Interaktion mit bereits vorhandenen, regulierten Kanalstrukturen ermöglichen die BAX/BAK-Homodimere das Ausströmen von Cytochrom C ins Zytoplasma (zur Übersicht: Zamzami und Kroemer, 2001).

Im Zytoplasma aktiviert Cytochrom C den Faktor APAF1 („apoptotic protease activating factor 1“). APAF1 initiiert dann die Caspase-Kaskade über autoproteolytische Aktivierung der Initiator-Caspase 9 (Abbildung 2).

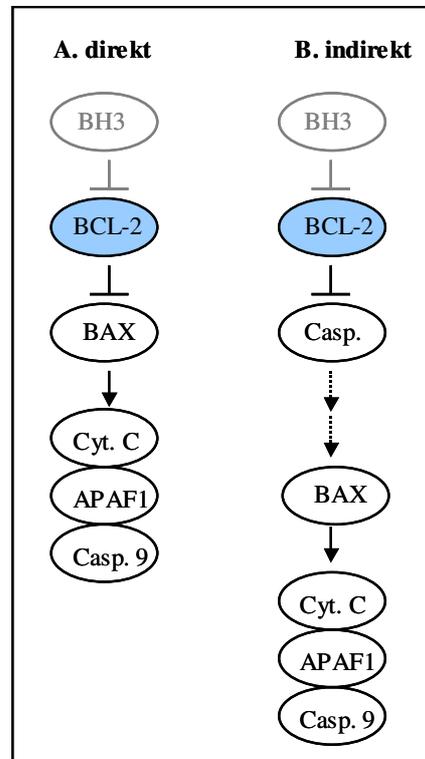


Abbildung 2: BCL-2 als anti-apoptotischer Regulator – zwei Modelle: A) BCL-2 inhibiert direkt die Dimerbildung von BAX und BAK und die Integration dieser in die Mitochondrienmembran. B) BCL-2 reguliert indirekt über Caspasen die Rekrutierung von BAX und BAK. (BH3-Faktoren regulieren ihrerseits BCL-2.) BH3: Faktoren der BH3-Unterfamilie, BAX: BAX und BAK.

In diesem Modell reguliert das anti-apoptotische BCL-2 direkt: durch das Vorliegen von BCL-2 in der Mitochondrienmembran wird die Integration und Dimerbildung von BAX bzw. BAK verhindert (Abbildung 2A). Ein anderes Modell schlägt vor, dass BCL-2 die Apoptose indirekt steuert. Hier reguliert BCL-2 die enzymatische Aktivierung von Initiator-Caspasen, welche für die Aktivierung von BAX und BAK verantwortlich sind (Abbildung 2B) (zur Übersicht: Cory und Adams, 2002; Cory et al., 2003).

Mit Aktivierung der Initiator-Caspasen ist die Effektorphase der Apoptose eingeleitet. Die Initiator-Caspasen aktivieren über proteolytische Abspaltung der Prodomäne weitere Caspasen. Diese Effektor-Caspasen sind am Abbau der Zellkernmembran und des Zytoskelettes beteiligt, aktivieren DNAsen und inhibieren die DNA-Reparatur. Die

apoptotische Zelle schnürt schließlich nach und nach kleine Vesikel ab, welche dann von Phagozyten aufgenommen werden (Cory und Adams, 2002).

1.IV.2. Funktion von BCL-2 in der Karzinogenese

BCL-2 wurde, wie bereits erwähnt, bei der Untersuchung der Chromosomentranslokation t(14;8) in B-Zell-Lymphomen entdeckt (Tsujimoto et al., 1984). In Folge der Chromosomentranslokation wurde das *BCL-2* Gen (auf Chromosom 18) mit dem Immunoglobulin schwere Ketten Lokus (IgH) (auf Chromosom 14) verknüpft und somit *BCL-2* unter dem Einfluss des IgH Enhancers E μ in den B-Zell-Klonen konstitutiv exprimiert (Tsujimoto et al., 1984; Bakhshi et al., 1985; Cleary et al., 1986). Daher wurde bereits bei Entdeckung des Gens ein onkogenes Potential für das BCL-2 Proteins vermutet.

Entgegen der ersten Annahme, dass BCL-2 das Zellwachstum fördert, stellte sich jedoch heraus, dass BCL-2 als anti-apoptotisches Protein fungiert und das Überleben von Zellen garantiert (Vaux et al., 1988; Hockenbery et al., 1990).

Transgene Mäuse (E μ -Bcl-2), welche die Chromosomentranslokation t(14;18) imitieren, beweisen das onkogene Potential von konstitutivem Bcl-2. In diesen Mäusen bildeten sich verschiedene Tumore u.a. B-Zell-Lymphome aus (Donnell Mc und Korsmeyer, 1991; Strasser und Harris, 1993). Jedoch treten die Tumore mit nur geringer Penetranz (bei 5-10% der E μ -Bcl-2 Mäuse (Strasser und Harris, 1993) und erst mit einem hohen Alter der Mäuse auf.

Dies ließ vermuten, dass das onkogene Potential von BCL-2 alleine nicht zur Ausbildung von Krebserkrankungen ausreicht, sondern weitere genetische Veränderungen erforderlich sind.

Diese Hypothese wurde durch das Vorfinden von rearrangiertem *c-Myc* in den Tumoren der E μ -Bcl-2 Mäuse bestätigt (Donnell Mc und Korsmeyer, 1991; Strasser und Harris, 1993). Erste Anzeichen für eine Kooperation zwischen BCL-2 und *c-Myc* hatten sich auch schon 1988 in den in vitro Versuche von Vaux et al. gezeigt (Vaux et al., 1988).

Die doppelt transgenen E μ -Bcl-2/*c-Myc* Mäuse lieferten schließlich den Beweis für die Synergie zwischen Bcl-2 und *c-Myc*. In diesen Mäusen hyperproliferieren die B-Zellen und ihre Progenitoren und bilden schneller und mit höherer Penetranz, als in den einfach transgenen Mäusen (E μ -Bcl-2 bzw. E μ -*c-Myc*), Tumore aus (Strasser et al., 1990).

Der synergistische Effekt liegt vermutlich in der BCL-2 vermittelten Inhibition der von dereguliertem *c-MYC* induzierten Apoptose bzw. in der *c-MYC* initiierten Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes aufgrund von *BCL-2* Überexpression (zur Übersicht: Cory et al., 2003).

Neben *c-MYC* sind noch weitere Faktoren, die mit BCL-2 Synergien eingehen, bekannt: Beispielsweise kann BCL-2 auch mit dem, aus der Chromosomentranslokation t(15;17)

hervorgehenden, PML-RAR α („promyelocytic leukaemia retinoic acid receptor α “) kooperieren. Koexpression von *BCL-2* und *PML-RAR α* in doppelt-transgenen Mäusen führt zur Anreicherung myeloischer Progenitorzellen Zellen im Knochenmark und zur Ausbildung akuter promyelozytärer Leukämie (Kogan et al., 2001).

Konstitutives *BCL-2* in Verbindung mit Defizienz eines pro-apoptotischen Faktors führt ebenso zur Ausbildung von Leukämien, denn Fas-defiziente *BCL-2* überexprimierende transgene Mäuse bilden akute myeloische Leukämien aus (Traver et al., 1998).

Auf dem Hintergrund der CML spielt die onkogene Funktion von *BCL-2* ebenso eine bedeutende Rolle (Abbildung 3): So erhöht *BCR/ABL* die Expression des anti-apoptotischen *BCL-2* (Sanchez-Garcia und Grutz, 1995; Sanchez-Garcia und Martin-Zanca, 1997). Im Gegenzug wird die Expression des Tumorsuppressor ICSBP, welcher die *BCL-2* Expression reprimiert und die *BCR/ABL* vermittelte Leukämogenese inhibiert (Burchert et al., 2004b; Middleton et al., 2006), von *BCR/ABL* negativ reguliert (Hao und Ren, 2000). Doppeltransgene Mäuse, welche *BCL-2* und *BCR/ABL* überexprimieren, bilden myeloische Leukämien aus (Jaiswal et al., 2003).

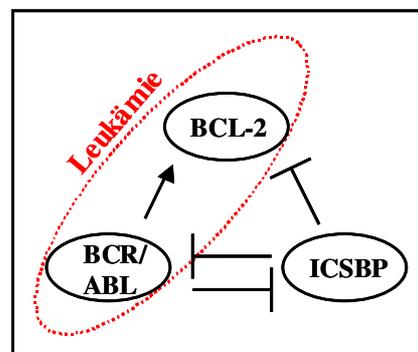


Abbildung 3: Zusammenspiel von *BCL-2*, *BCR/ABL* und *ICSBP* in der Leukämogenese. *BCR/ABL* reguliert *BCL-2* positiv. Doppeltransgene *BCR/ABL Bcl-2* Mäuse bilden myeloische Leukämien aus. *ICSBP* wirkt antagonistisch zu *BCR/ABL* und reprimiert die Expression von *BCL-2*. *BCR/ABL* und *ICSBP* regulieren sich wechselseitig. *BCR/ABL* reprimiert die *ICSBP* Expression, *ICSBP* inhibiert die *BCR/ABL*-vermittelte Leukämogenese.

1.V. NF1 – Tumorsuppressor und Regulator der Proliferation

Das *NF1* Gen wurde 1990 über Positionsklonierungen identifiziert (Cawthon et al., 1990; Wallace et al., 1990). Das über 60 Exons umfassende humane *NF1* erstreckt sich über mehr als 300 kb genomischer DNA und kodiert eine 11-13 kb große mRNA (zur Übersicht: Gutmann und Collins, 1993).

Das ca. 250 kDa große Proteinprodukt Neurofibromin 1 (NF1) ist im Zytosol lokalisiert. NF1 ist weit verbreitet, mit höchster Expressionsrate in Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems. In Abhängigkeit vom Zelltyp kommt das Protein in verschiedenen Splice-Varianten vor (zur Übersicht: Cichowski und Jacks, 2001; Dasgupta und Gutmann, 2003).

NF1 besitzt eine Region mit starker Homologie zu den katalytischen Domänen der RAS-GTPase aktivierenden Proteine (RAS-GAPs) p120RAS-GAP der Säugetiere bzw. Ira1 und Ira2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ballester et al., 1990; Xu et al., 1990b). RAS-GAPs stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität von RAS, initiieren somit den Wechsel vom aktiven RAS-GTP zum inaktiven RAS-GDP und sind daher wichtige negative Regulatoren der Proliferation, des Zellwachstums und des Überlebens der Zelle (Abbildung 4).

Dass NF1 tatsächlich eine RAS-GAP Funktion erfüllt, wurde bereits 1990 über biochemische Ansätze bewiesen (Martin et al., 1990; Xu et al., 1990).

Neben der Funktion als RAS-GAP reguliert NF1 die G-Protein stimulierte Adenylat-Zyclase Aktivität (The et al., 1997; Tong et al., 2002).

1.V.1. *NF1*: Zusammenspiel zwischen transkriptioneller Regulation und Leukämogenese

Die Expression von *NF1* wird von dem nukleären Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor ICSBP aktiviert (Abbildung 4): Zhu et al. konnten per Chromatinimmunopräzipitation nachweisen, dass *NF1* ein direktes Target von ICSBP ist. Zudem wiesen sie eine verringerte *NF1* Expression in *Icsbp*^{-/-} myeloischen Zellen nach und zeigten, dass bei Einbringen der NF1-GRD (GRD: „GAP-related domain“) die *Icsbp*^{-/-} Zellen nicht weiter hypersensitiv, sondern nunmehr mit regulierter Proliferation auf das Zytokin M-CSF („monocyte-colony stimulating factor“) reagieren (Zhu et al., 2004). Zur Aktivierung der *NF1* Expression muss jedoch ein nach Zytokin-Stimulation zusammengefügtes Heterodimer aus PU.1 und IRF2 bereits am NF1 Promoter gebunden sein (Huang et al., 2007) und ICSBP phosphoryliert vorliegen (Huang et al., 2006).

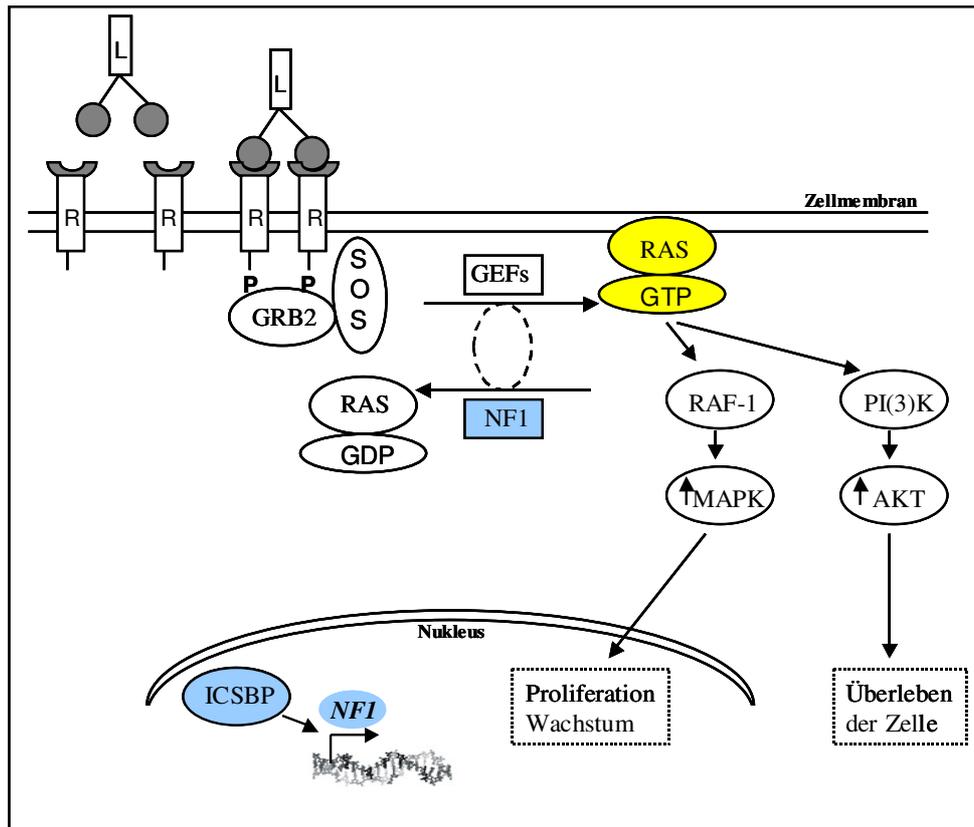


Abbildung 4: Regulation des RAS-Signalweges durch die ICSBP-aktivierte RAS-GAP NF1. Nach Ligandenbindung und Aktivierung der Rezeptoren wird das zytosolische RAS-GDP mittels des GRB2/SOS-Komplexes an die Plasmamembran rekrutiert und dann von GEFs („guanine nucleotide exchange factors“) in den aktiven RAS-GTP Zustand versetzt (zur Übersicht: Boguski und McCormick, 1993). Aktives RAS-GTP steuert über die PI(3)Kinase und AKT das Überleben der Zellen und reguliert über den MAP-Kinase Signalweg die Expression von Genen, die für Zellwachstum und Proliferation verantwortlich sind (zur Übersicht: Dasgupta und Gutmann, 2003). Die RAS-GAP NF1 initiiert die Hydrolyse des aktiven RAS-GTP zum inaktiven RAS-GDP. Somit wird die Menge des aktiven RAS-GTP limitiert, NF1 ist daher ein wichtiger negativer Regulator der Proliferation, des Zellwachstums und des Überlebens der Zelle. Die Expression von *NF1* selbst wird vom Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor ICSBP aktiviert. L: Ligand, R: Rezeptor, MAPK: Map-Kinasen, PI(3)K: Phosphatidylinositol(3)-Kinase.

Bei ICSBP-Defizienz liegt, aufgrund der fehlenden transkriptionellen Aktivierung, somit auch das GTPase aktivierende Protein NF1 vermindert vor (Zhu et al., 2004). In Folge kann der Zytokin-abhängige RAS-Signalweg nur noch reduziert über die Hydrolyse von RAS-GTP gesteuert werden. Der Proteinlevel an aktivem RAS-GTP ist erhöht. Dieser Zusammenhang liefert eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Myeloproliferation in *Icsbp*^{-/-} Zellen und die Ausbildung der CML-ähnlichen MPD in den *Icsbp*^{-/-} Mäusen.

Auf einen direkten Zusammenhang zwischen transkriptioneller Regulation von *NF1* und der Entwicklung von MPDs bzw. myeloischen Leukämien deuten auch die Ergebnisse von Huang et al. hin. Sie entdeckten, dass bei Anwesenheit einer für akute myeloische Leukämie (AML) spezifischen, konstitutiven SHP2-Protein-tyrosin-phosphatase in myeloischen Zellen ICSBP permanent dephosphoryliert vorliegt und somit keine transkriptionelle Aktivierung von NF1 erfolgt (Huang et al., 2006). Einen weiteren Hinweis liefert die Tatsache, dass das für AML-

typische, der Chromosomentranslokation t(8;21) entstammenden, Fusionsprodukt AML-ETO die Transkription von *NFI* reprimiert (Yang et al., 2005).

Auf Proteinebene wird die RAS-GAP Aktivität durch Wachstumsfaktor-initiierte Degradation von NF1 über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg reguliert (Cichowski et al., 2003).

1.V.2. Neurofibromatose I: Verlust des Tumorsuppressors NF1 und Ausbildung maligner Krebserkrankungen im Menschen

Bereits hundert Jahre vor der Identifizierung des krankheits-verantwortlichen *NFI* Gens, im Jahr 1882, beschrieb Friedrich von Recklinghausen erstmals die Neurofibromatose I Erkrankung (auch „von Recklinghausen“-Erkrankung bezeichnet).

Neurofibromatose I tritt mit der Häufigkeit von ca. 1 unter 3500 Individuen auf und wirkt sich hauptsächlich in den Zellen der Haut und des Nervensystems aus (zur Übersicht: Cichowski und Jacks, 2001; Dasgupta und Gutmann, 2003; Trovo-Marqui und Tajara, 2006).

Patienten mit dieser Krankheit weisen oftmals Pigmentstörungen („Café au lait“-Flecken, Hautsprenkelungen), gutartige Hämangiome der Iris (Lisch Knötchen) und Knochenfehlbildungen auf und leiden häufig an Lernstörungen. Zudem finden sich gutartige tumoröse Veränderungen der Haut- und Nervenzellen. Der für die Neurofibromatose I prominenteste gutartige Tumor ist das aus entarteten Schwannschen Zellen, perineuralen Zellen und Fibroblasten bestehende Neurofibrom. Eine besondere, diffuse (plexiforme) Form des Neurofibroms kann sich zu einem malignen peripheren Nervenscheiden-Tumor umwandeln, ebenso können sich bösartige Astrozytome, Gliome, Fibrosarkome, Phäochromozytome (= Tumor des Nebennierenmarks) und myeloische Leukämien ausbilden. Insbesondere Kinder (unter 5 Jahren) mit Neurofibromatose I Erkrankung haben ein erhöhtes Risiko (um das 200-500fache erhöht) maligne myeloische Krankheiten wie juvenile CML, Monosomy 7 Syndrom (eine Myelodysplasie) und akute myeloische Leukämie auszubilden (Bader und Miller, 1978; Stiller et al., 1994).

Aufgrund der Veranlagung zur Tumorbildung mit Transformation zu malignen Formen und Ausbildung von Leukämien, wird die Neurofibromatose I auch als Tumor-Prädispositions-Syndrom bezeichnet (zur Übersicht: Cichowski und Jacks, 2001; Dasgupta und Gutmann, 2003; Trovo-Marqui und Tajara, 2006).

Grundlage der Neurofibromatose I Erkrankung ist das Vorliegen eines defekten Allels des *NFI* Gens (durch Deletion oder „loss of function“-Mutation(en)). Dieses veränderte *NFI*

Allel wird entweder autosomal dominant über die Generationen weitervererbt oder erst später in der Entwicklung durch Mutationen in somatischen Zellen erlangt.

Knudson's „Second Hit“-Hypothese zur Ausbildung maligner Krebserkrankungen besagt jedoch, dass dieser erste „Hit“ zwar Grundvoraussetzung ist, ihm aber zwangsläufig ein zweiter „Hit“ (Inaktivierung des zweiten Allels durch Deletion oder Mutation(en)) folgen muss (Knudson, 1971).

Untersuchungen an Krebszellen beweisen, dass das Ausbilden der Tumore und Leukämien in Neurofibromatose I Patienten dieser Hypothese gerecht wird: So wurde ein Verlust des zweiten *NF1* Wildtyp-Allels (LOH: „loss of heterozygosity“) oder Inaktivierung des *NF1* Wildtyp-Allels über somatische Mutationen in Neurofibromen (Colman et al., 1995; Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997) und in Phäochromozytomen (Xu et al., 1992), ebenso wie in Knochenmarkzellen bei 50-60% der JCML Patienten (Shannon et al., 1994; Miles et al., 1996; Side et al., 1997; Side et al., 1998) nachgewiesen.

Das Ausbilden der nicht-malignen Krankheitssymptome wie der Pigmentstörungen, gutartigen Hämangiomen der Iris, Knochenfehlbildungen und Lern-Defizite beruht jedoch vermutlich allein auf der *NF1*-Haploinsuffizienz d.h. dem Vorliegen eines einzelnen defekten *NF1* Allels und dadurch reduziert vorliegender *NF1* Proteinmenge (zur Übersicht: Cichowski und Jacks, 2001).

Wie bereits erwähnt, ist die prominenteste Funktion von *NF1* die RAS-GTPase Aktivität. Fehlt *NF1* als Konsequenz fehlender transkriptioneller Aktivierung (s. 1.V.1.) oder, im Kontext der Neurofibromatose I, einer biallelen Inaktivierung, können die über RAS-GTP induzierten Signalwege zur Proliferation, Wachstum und Überleben der Zelle nicht mehr über *NF1*-vermittelte Inaktivierung von RAS-GTP zu RAS-GDP reguliert werden. In Folge des vermehrt vorliegenden aktiven RAS-GTP hyperproliferieren die Zellen und können maligne Krebsformen wie Tumore oder Leukämien ausbilden. *NF1* definiert sich daher als Tumorsuppressor, dessen Verlust die Ausbildung maligner Krebserkrankungen begünstigt.

Bestätigt wird dies durch das Vorliegen homozygot inaktivierter *NF1* Allele in den Krebszellen von Neurofibromatose I Patienten (Xu et al., 1992; Shannon et al., 1994; Colman et al., 1995; Miles et al., 1996; Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997; Side et al., 1997; Side et al., 1998) und demzufolge erhöhten RAS-GTP Proteinmengen in den Tumoren (Basu et al., 1992; DeClue et al., 1992; Kim et al., 1995; Guha et al., 1996; Lau et al., 2000; Sherman et al., 2000). Des Weiteren findet man bei 20-30% der Kinder mit malignen myeloischen Erkrankungen, ohne *NF1*-Defizienz, aktivierende RAS-Mutationen in den

Knochenmarkszellen. Bei Kindern mit myeloischen Leukämien, die in Kombination mit Neurofibromatose I, also verminderter *NF1* Expression, entstehen, werden jedoch keine RAS-Mutationen beobachtet (Kalra et al., 1994; Side et al., 1998). Hier basieren die malignen myeloischen Störungen allein auf der NF1-Defizienz.

Zudem weisen leukämische Zellen von juvenilen Patienten mit Neurofibromatose I und juveniler CML erhöhte RAS-GTP Proteinmengen auf (Bollag et al., 1996), und mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark oder peripheren Blut dieser Patienten zeigen unter Stimulation mit dem Zytokin GM-CSF in Methylcellulose eine erhöhte Anzahl myeloischer Progenitor-Kolonien (CFU-GM: „colony unit forming-granulocytes/monocytes“) (Emanuel et al., 1991).

1.V.3. *Nf1* mutante Mäuse: Nf1-Defizienz und das Ausbildung einer (J)CML-ähnlichen MPD

Die klassischen *Nf1*-homozygot defizienten (*Nf1*^{-/-}) Mäuse wurden über Gen Targeting und Insertion eines *Neo*^R-Gens in das Exon 31 von *Nf1* generiert und 1994 von den Gruppen Brannan C.I. und Jacks T. publiziert. *Nf1*^{-/-} Mäuse sind nicht lebensfähig. Sie sterben im Embryonalstadium am Tag 12-13 an Fehlbildungen des Herzens und zeigen eine verzögerte Entwicklung der Nieren, der Leber und der Skelettmuskulatur. *Nf1*^{-/-} Embryonen weisen zudem eine Hyperplasie der Neuralleisten-entstammenden sympathischen Ganglien auf (Brannan et al., 1994; Jacks et al., 1994).

Nf1 heterozygote (*Nf1*^{+/-}) Mäuse sind vital. Sie stellen jedoch kein geeignetes Mausmodell für die humane Neurofibromatose I dar, da sie weder Neurofibrome, noch die typischen, sogenannten Lisch Knötchen, noch Pigmentstörungen ausprägen. Parallel zu den humanen Patienten weisen sie jedoch auch eine Tumorprädisposition auf. Über einen Beobachtungszeitraum von 27 Monaten bilden 75% der *Nf1*^{+/-} Mäuse Tumore (u.a. Phaeochromozytome, Lymphome, Adenokarzinome, Fibrosarkome, Hepatome) aus. Zudem entwickeln auch die *Nf1*^{+/-} Mäuse MPDs. Im Alter von 17 bis 27 Monaten zeigen sich jedoch lediglich in 10% der *Nf1*^{+/-} Mäuse myeloische Leukämien. Ebenso wie in den Krebszellen der humanen Neurofibromatose I Patienten wurde in allen Phaeochromozytomen und myeloischen Leukämien der *Nf1*^{+/-} Mäuse der Verlust des zweiten *Nf1* WT-Allels nachgewiesen (Jacks et al., 1994).

Um die Funktion der RAS-GAP NF1 in der Leukämogenese zu untersuchen und die Notwendigkeit der biallelen Inaktivierung zur malignen Transformation der Zellen zu überprüfen, wurden weiterführende Experimente mit *Nf1*^{-/-} Zellen durchgeführt: Adoptiver

Transfer von *Nf1*^{-/-} fötalen Leberzellen in bestrahlte Rezipienten-Mäuse führt mit einer Penetranz von 100% zur Ausbildung einer (J)CML-ähnlichen MPD (Largaespada et al., 1996). Ebenso führt die somatische Inaktivierung von *Nf1* in hämatopoetischen Zellen von *Mx1-Cre Nf1flox/flox* Mäusen zur Entwicklung dieser MPD (Le et al., 2004). Diese Ergebnisse bestätigen, wie schon die Resultate aus den Krebszellen der Neurofibromatose I Patienten (s.1.V.2.), die Wichtigkeit der homozygoten Inaktivierung von *Nf1* bei der Ausbildung maligner Krebserkrankungen.

Homozygoter *NF1*-Verlust geht im humanen wie auch im murinen System mit einem erhöhten RAS-GTP Level (Bollag et al., 1996; Largaespada et al., 1996) und Hypersensitivität gegenüber dem Zytokin GM-CSF (wie auch gegenüber den Zytokinen Il-3 und SCF“stem cell factor“), d.h. einem gesteigerten, auf myeloischen Progenitorzellen beruhenden CFU-GM Koloniewachstum, einher (Emanuel et al., 1991; Zhang et al., 1998). Birnbaum et al. bewiesen, dass die GM-CSF Sensitivität eine zentrale Rolle für das Ausbilden der (J)CML-ähnlichen MPD spielt: Nach Transplantation von *Nf1*^{-/-}*Gmcsf*^{-/-} (bzw. *Nf1*^{-/-}*Gmcsf*^{+/+}) fötalen Leberzellen in *Gmcsf*^{-/-} bzw. *Gmcsf*^{+/+} bestrahlte Rezipienten-Mäuse bilden nur die Mäuse mit GM-CSF Produktion (*Gmcsf*^{+/+} des Transplantats oder des Rezipienten), anschließender Bindung an Tyrosinkinaserzeptoren und Aktivierung des RAS-Signalweges eine (J)CML-ähnliche MPD aus. Liegt kein GM-CSF vor (*Gmcsf*^{-/-} des Transplantats und des Rezipienten), ist die Myeloproliferation nicht gestört (Birnbaum et al., 2000). Bestätigt wurde dies durch die Ergebnisse von Kim et al.. Sie zeigten, dass in Mäusen mit unvollständigem GM-CSF Rezeptor (beta c Kette fehlt) die (J)CML-ähnliche MPD gar nicht (in mit *Nf1*^{-/-} *beta c*^{-/-} fötalen Leberzellen rekonstituierten Mäusen) oder nur noch abgeschwächt (in *Mx1-Cre Nf1flox/flox*- *beta c*^{-/-} Mäusen) ausgebildet wird (Kim et al., 2007).

Zusammenfassend ergibt sich, dass *Nf1* nach Zytokin-(GM-CSF, SCF, IL-3)Stimulation die Myeloproliferation negativ über die zur Verfügung stehende Menge an aktivem Ras-GTP reguliert. Ein Fehlen von *Nf1* (durch fehlende transkriptionelle Aktivierung oder biallele Inaktivierung) führt zur Ausbildung von MPDs und ist an der Entstehung verschiedener Neoplasien beteiligt.