

## 5. Ergebnisse

### 5.1. *BCL-2* und *Icsbp*-Defizienz kooperieren nicht bei der Induktion von Leukämien

*Icsbp*-defiziente (*Icsbp*<sup>-/-</sup>) Mäuse dienen als Mausmodell für die humane CML: Diese Mäuse entwickeln ein, der humanen Leukämie ähnliches, myeloproliferatives Syndrom -eine CML-ähnliche MPD- gekennzeichnet durch eine erhöhte Anzahl reifer Granulozyten und myeloischer Progenitoren im Knochenmark und in der Peripherie (Holtschke et al., 1996). Ein Wechsel von der chronischen Phase zur akuten Phase, d.h. zur Ausbildung von akuten Leukämien, findet in den *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch nur sehr selten und unter bislang ungeklärten Umständen statt.

In ca. 90% der Patienten mit humaner CML findet sich in den leukämischen Zellen, als Ergebnis der Chromosomentranslokation t(9;22), die konstitutiv aktive Tyrosin-Kinase BCR/ABL (Nowell und Hungerford, 1960; Rowley, 1973; Heisterkamp et al., 1985; Muller et al., 1991; McWhirter et al., 1993). Die onkogene Kinase BCR/ABL steuert die Expression verschiedenster Gene: so wird u.a. die Expression von *ICSBP* negativ reguliert (Hao und Ren, 2000), die Expression des anti-apoptotischen Proteins *BCL-2* hingegen erhöht (Sanchez-Garcia und Grutz, 1995). Überexpression von *ICSBP*, im Gegenzug, reprimiert die *BCL-2* Expression und inhibiert die BCR/ABL induzierte Leukämogenese (Burchert et al., 2004a).

Werden *BCL-2* und *BCR/ABL* zusammen in myeloischen Progenitoren (von doppelt-transgenen Mäusen) überexprimiert, führt dies zu einem synergistischen Effekt und dadurch zur frequenten Induktion von myeloischen Leukämien in den Mäusen (Jaiswal et al., 2003). Zudem ist bekannt, dass ein Ausbilden der akuten leukämischen Phase aus der CML häufig mit genetischer Instabilität und der Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen einhergeht (detaillierte Ausführungen in der Einleitung).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde untersucht, ob eine Überexpression des Onkogens *BCL-2* in Kombination mit *Icsbp*-Defizienz ebenso einen Synergieeffekt zur Induktion von Leukämien erzielt: Im Mausmodell wurde analysiert, ob eine gesteigerte Expression von *BCL-2* in *Icsbp*<sup>-/-</sup> myeloischen Vorläuferzellen hinreichend ist, die chronische MPD der Mäuse in eine akute Leukämie zu transformieren.

### 5.I.1. *BCL-2* wird retroviral in den myeloischen Vorläuferzellen exprimiert

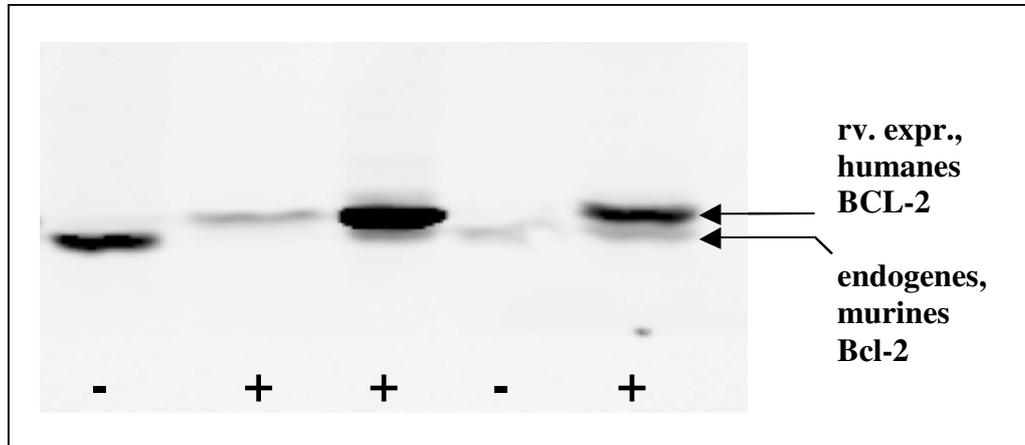
Die Überexpression von *BCL-2* im hämatopoetischen System wurde über retrovirale Transduktion *Icsbp*<sup>-/-</sup> myeloischer Vorläuferzellen und anschließender Transplantation dieser Zellen in letal bestrahlte, Knochenmark-defiziente *Icsbp* C57/Bl6 WT-Mäuse erreicht.

(abgekürzt: BCL-2 *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse).

Zur Kontrolle der Abhängigkeit von der *Icsbp* Expression wurden zudem auch *Icsbp*<sup>+/+</sup> myeloische Progenitorzellen transduziert und transplantiert (abgekürzt: BCL-2 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse). Als Negativ-Kontrolle wurden zusätzlich sowohl *Icsbp*<sup>-/-</sup> Vorläuferzellen als auch *Icsbp*<sup>+/+</sup> Progenitoren, die mit dem leeren retroviralen Konstrukt (Mieg3) transduziert wurden, in *Icsbp* C57/Bl6 WT-Mäuse transplantiert (abgekürzt: Mieg3 *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse bzw. Mieg3 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse).

Die Expression des retroviral exprimierten, humanen *BCL-2* wurde vor dem Beginn der Transplantationsexperimente mittels Western Blot überprüft.

Wie Abbildung 7 zeigt wurde vor der retroviralen Transduktion (-) nur das endogene, murine Bcl-2 Protein in den myeloischen Progenitoren exprimiert, nach Transduktion der Zellen (+) fand sich auch das retroviral exprimierte, humane BCL-2 Protein in den Zellen.



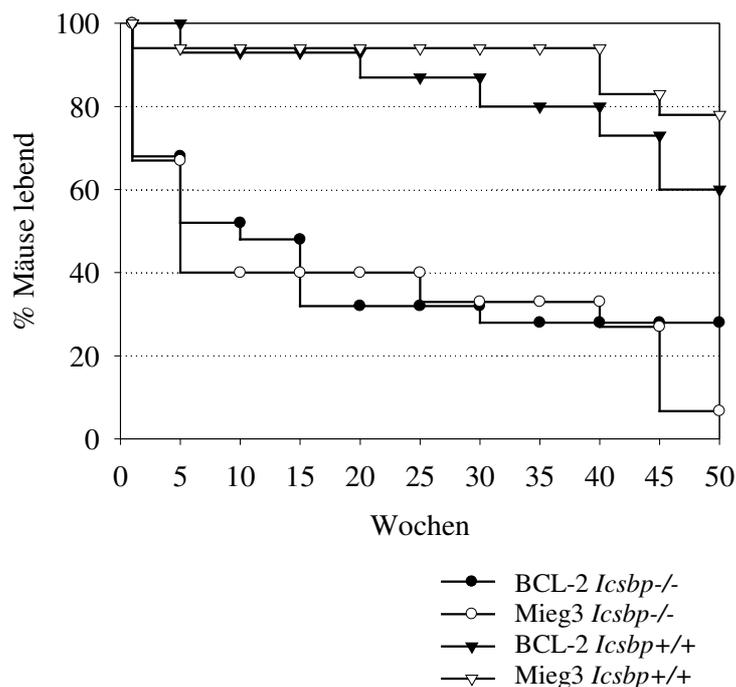
**Abbildung 7: Humanes BCL-2 wird nach retroviraler Transduktion in den murinen myeloischen Vorläuferzellen exprimiert.** Western Blot für retroviral exprimiertes, humanes BCL-2 bzw endogenes, murines Bcl-2 (ca. 26 kDa) mit Proteinlysate aus nicht transduzierten (-) und retroviral transduzierten (+) myeloischen Vorläuferzellen. rv. expr.: retroviral exprimiert

### 5.1.2. Überlebenskurven der transplantierten Mäuse

Der Verlauf der Überlebenskurven kann Aufschluss über krankhafte Phänotypen der Mäuse geben. Ein vergleichsweise steiler Abfall der Überlebenskurve zeigt eine erhöhte Sterblichkeit dieser Mäuse an und deutet auf das Ausbilden von akuten letalen Krankheiten z.B. akuten Leukämien in diesen Mäusen hin.

Zur Bestimmung der Überlebenskurven, wurden daher für alle transplantierten Mäusen (Alter der Mäuse: 2-3 Monate zum Transplantationszeitpunkt) die Zeitspanne von Transplantation bis zum Todeszeitpunkt dokumentiert.

Auffällig war, von den Mäusen, denen *Icsbp*<sup>-/-</sup> Vorläuferzellen transplantiert worden waren, lebten bereits 10 Wochen nach der Transplantation nur noch 52% (*BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup>) bzw. 40% (*Mieg3 Icsbp*<sup>-/-</sup>) der Mäuse, im Gegensatz zu mehr als 90% lebender Mäuse, denen *Icsbp*<sup>+/+</sup> Zellen injiziert worden waren (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Kaplan-Meier Überlebenskurven der transplantierten Mäuse.** Junge, gleichaltrige (Alter: 2-3 Monate) *Icsbp* C57/B16 WT-Mäuse wurden bestrahlt und anschließend mit den retroviral veränderten (Konstrukte: BCL-2 oder Mieg3-Leervektor) *Icsbp*<sup>-/-</sup> bzw. *Icsbp*<sup>+/+</sup> myeloischen Vorläuferzellen transplantiert. Die Überlebenszeitspannen der einzelnen Mäuse von Transplantation bis zum Todeszeitpunkt wurden hier dargestellt. N=31 *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=15 *Mieg3 Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=15 *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup>, N=18 *Mieg3 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse.

Wie von uns diagnostiziert wurde, starben diese Mäuse nicht aufgrund leukämischer Erkrankungen. Die betroffenen Tiere wiesen jedoch alle eine zu geringe Leukozytenzahl im

peripheren Blut auf. Es ist daher anzunehmen, dass mit *Icsbp*<sup>-/-</sup> Zellen transplantierte Mäuse, aufgrund der zu *Icsbp*<sup>+/+</sup> unterschiedlichen Zellzusammensetzung der transplantierten (Vorläufer-)Zellen, schlechter das hämatopoetische System rekonstituieren können und somit eher an den Folgen der Transplantation sterben.

Nach den ersten 10 Wochen waren jedoch keine weiteren Besonderheiten zu verzeichnen.

Die Überlebenskurven verliefen ab diesem Zeitpunkt relativ parallel zueinander. Zwischen der 10. und 50 Woche starben, sowohl unabhängig von der *Icsbp* Expression als auch der *BCL-2* Expression, 20-30% der transplantierten Mäuse (Abbildung 8).

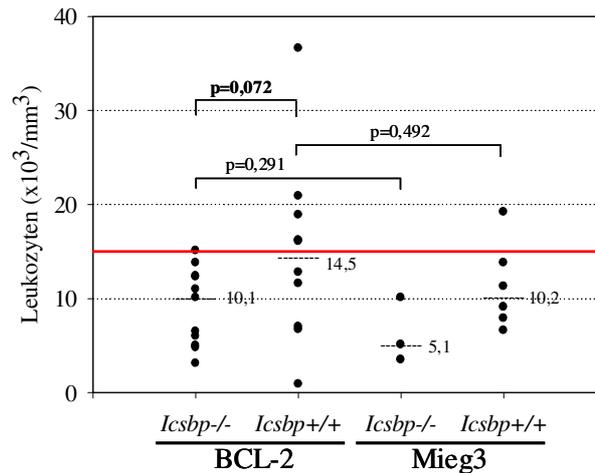
Vom Beobachtungszeitpunkt nach 10 Wochen betrachtet war somit keine Korrelation zwischen Überlebensrate und *Icsbp*-Hintergrund der transplantierten Zellen oder speziell zur *BCL-2* Überexpression feststellbar.

### **5.I.3. Höchste Leukozytenzahl im peripheren Blut bei Überexpression von *BCL-2* in *Icsbp*<sup>+/+</sup> Progenitoren**

Die Ausbildung von Leukämien ist durch eine fehlgesteuerte, erhöhte Expansion einer bestimmten Blastenpopulation, häufig verbunden mit einem Differenzierungsstop, charakterisiert. Die vermehrte Expansion ist oftmals in der Peripherie, anhand der erhöhten Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut, nachweisbar (normale, murine Leukozytenzahl:  $5\text{-}15 \times 10^3/\text{mm}^3$ ). Jedoch erhöht sich auch z.B. in Folge einer Infektion, bedingt durch die Aktivierung der Immunabwehr, die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut.

Um erste Anzeichen für ein mögliches Ausbilden von Leukämien in den transplantierten Mäusen zu detektieren, wurde den Mäusen peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen und dieses auf den Gehalt an Leukozyten untersucht.

Zur Analyse wurden in diesem Versuch und in den folgenden Versuchen alle transplantierten, erkrankten Mäuse einbezogen, sowie alle Mäuse, die am Ende der Studie, 12 Monate nach der Transplantation (Alter der Mäuse zu diesem Zeitpunkt: 14-15 Monate), noch lebten. Als „erkrankt“ galten alle Mäuse, die Verhaltensabnormalitäten (z.B. Isolation, Apathie) oder körperliche Auffälligkeiten (z.B. offensichtliche Gewichtsabnahme, struppiges Fell, Buckel, hervortretende Augen, Diarrhö, Schwellungen) zeigten. Zudem wurden nur die Mäuse berücksichtigt, die schon einige Wochen nach der Transplantation vollständig rekonstituiert waren oder länger als 8-10 Wochen überlebten.



**Abbildung 9: Höchste Leukozytenzahl im peripheren Blut bei Überexpression von *BCL-2* in *Icsbp*<sup>+/+</sup> Zellen.** Den Mäusen wurde peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen und dieses mit dem Blutzählgerät auf den Gehalt an Leukozyten untersucht. N=11 BCL-2 *Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=10 BCL-2 *Icsbp*<sup>+/+</sup>, N=3 Mieg3 *Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=6 Mieg3 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse. Die rote Linie markiert den oberen Schwellenwert für murine periphere Leukozytenzahlen im normalen/gesunden Niveau ( $15 \times 10^3/\text{mm}^3$ ). Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Von den Mäusen mit *BCL-2* Überexpression in *Icsbp*<sup>-/-</sup> Vorläufern lag für keine Maus die Leukozytenzahl oberhalb des Schwellenwertes (Abbildung 9).

Hingegen lagen 50% (5 von 10) der Mäuse mit Überexpression von *BCL-2* in *Icsbp*<sup>+/+</sup> Zellen mit der Leukozytenanzahl über der Obergrenze. Der Unterschied zwischen den BCL-2 *Icsbp*<sup>-/-</sup> bzw. BCL-2 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäusen war jedoch, aufgrund der großen Varianz der Werte, nicht signifikant (Vergleich: BCL-2 *Icsbp*<sup>-/-</sup> mit BCL-2 *Icsbp*<sup>+/+</sup>: p=0,072).

Keine der Mäuse mit dem Mieg3-Konstrukt in *Icsbp*<sup>-/-</sup> Zellen und nur 1 von 6 Mieg3 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse lag mit der Leukozytenzahl über dem Schwellenwert (Abbildung 9).

Insgesamt fiel auf, dass die Leukozytenwerte für Mäuse mit *BCL-2* Überexpression höher lagen als für die Mieg3-Kontrollmäuse. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Vergleich: BCL-2 *Icsbp*<sup>-/-</sup> mit Mieg3 *Icsbp*<sup>-/-</sup>: p=0,291; BCL-2 *Icsbp*<sup>+/+</sup> mit Mieg3 *Icsbp*<sup>+/+</sup>: p=0,492) (Abbildung 9).

Der größte Anteil an Mäusen, die mit ihrer Leukozytenzahl über dem oberen Schwellenwert lagen, fand sich bei den Mäusen mit *BCL-2* Überexpression in *Icsbp*<sup>+/+</sup> Zellen (Abbildung 9).

#### 5.1.4. Keine Unterschiede in den Milzgewichten und Lebergewichten der transplantierten Mäuse

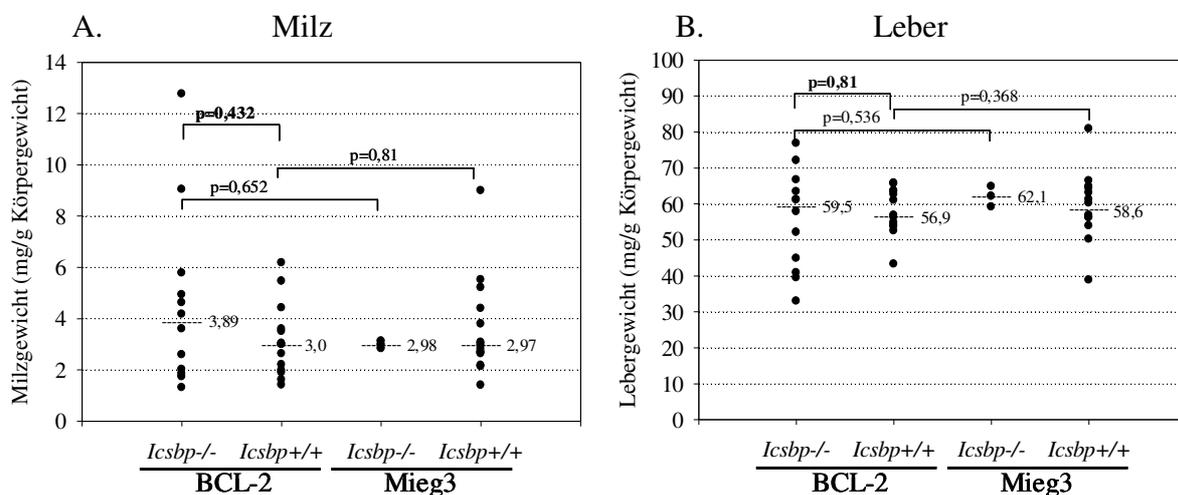
Im Krankheitsverlauf von Leukämien kommt es zu einer unkontrollierten Expansion proliferierender Blastenzellen. Die Leukozytenzahl im Knochenmark und meist auch in der Peripherie nimmt zu, dies geht häufig mit einer gesteigerten Infiltration von Milz und/oder Leber einher. Somit ist ein mögliches weiteres Indiz für das Ausbilden von Leukämien eine Größenzunahme der Milz bzw. der Leber.

Den transplantierten Tieren wurden daher jeweils die Milz und die Leber entnommen und die Organgewichte in Relation zum jeweiligen Körpergewicht ermittelt.

Die *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse hatten die höchsten Milzgewichte. Der Unterschied war jedoch gegenüber den Milzgewichten der Mäuse mit *BCL-2* Überexpression in *Icsbp*<sup>+/+</sup> Zellen ( $p=0,432$ ) bzw. den Milzgewichten der *Mieg3 Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse nicht signifikant ( $p=0,652$ ) (Abbildung 10A).

Die Milzgewichte der *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse und der *Mieg3 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse unterschieden sich nicht ( $p=0,81$ ) (Abbildung 10A).

Somit machte sich die *BCL-2* Überexpression in hämatopoetischen Vorläuferzellen nicht in einem allgemein erhöhten Milzgewicht der transplantierten Mäuse bemerkbar.



**Abbildung 10: Keine Unterschiede im Milzgewicht und im Lebergewicht der transplantierten Mäuse.** Den transplantierten Mäusen wurde jeweils die A) Milz und die B) Leber entnommen und deren Gewichte ermittelt. A) Milz: N=12 *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=14 *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup>, N=3 *Mieg3 Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=15 *Mieg3 Icsbp*<sup>+/+</sup>. B) Leber: N=12 *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=13 *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup>, N=3 *Mieg3 Icsbp*<sup>-/-</sup>, N=14 *Mieg3 Icsbp*<sup>+/+</sup>. Die Organgewichte wurden in Relation zum jeweiligen Körpergewicht gesetzt und in mg/g Körpergewicht hier dargestellt. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Auch der Unterschied der Lebergewichte der *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse und der *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse war nicht signifikant ( $p=0,81$ ) (Abbildung 10B).

Ebenso führte, unabhängig von der *Icsbp* Expression, *Bcl-2* Überexpression nicht zu einer Zunahme des Lebergewichtes (Vergleich: *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup> mit *Mieg3 Icsbp*<sup>-/-</sup>:  $p=0,536$  und Vergleich: *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup> mit *Mieg3 Icsbp*<sup>+/+</sup>:  $p=0,368$ ) (Abbildung 10B).

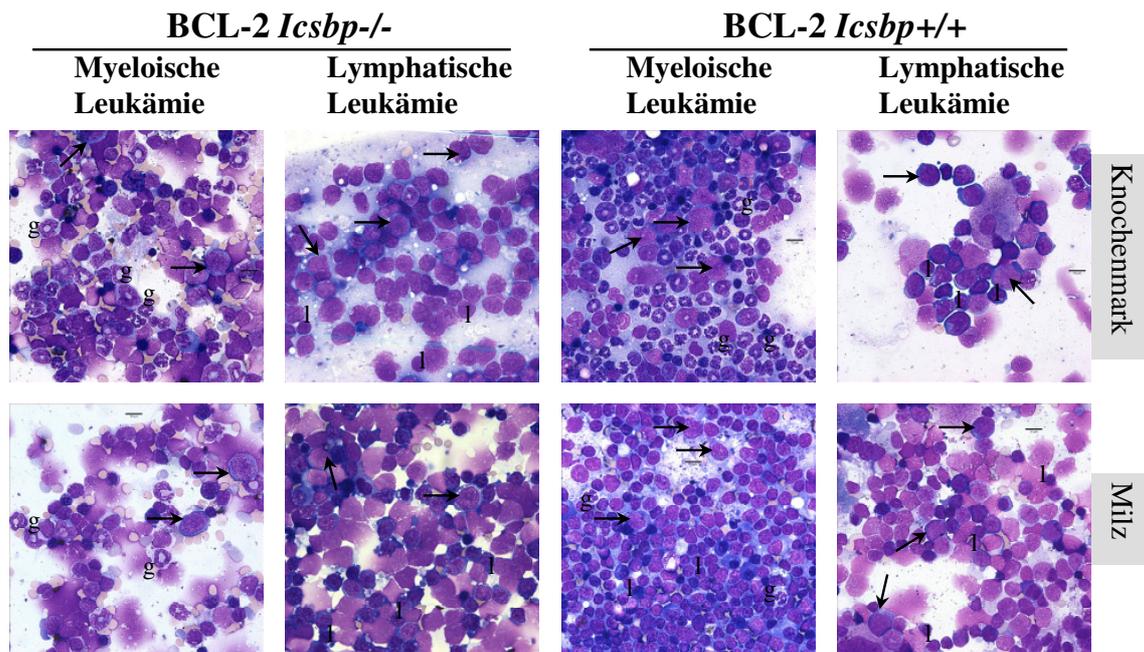
Zusammenfassend bedeutet dies, dass sich eine *BCL-2* Überexpression im hämatopoetischen System, bei Analyse der gesamten Kohorte der transplantierten Mäuse, weder auf *Icsbp*<sup>-/-</sup> noch auf *Icsbp*<sup>+/+</sup> Hintergrund in einer allgemeinen Vergrößerung der Milz oder der Leber bemerkbar machte.

### **5.I.5. Überexpression von *BCL-2* führt, unabhängig von der *Icsbp* Expression, zur Ausbildung von myeloischen als auch lymphatischen Leukämien**

Um den Anteil an leukämischen Mäuse zu ermitteln und den Typus der Leukämien zu bestimmen, wurden die Verteilungen der Zellpopulationen und die Anzahl der Blastenzellen in den erkrankten Mäusen analysiert.

Dazu wurden zum einen primäre Knochenmark- und Milzzellen auf einen Objektträger gebracht, May-Grünwald-Giemsa gefärbt und mikroskopisch ausgewertet (Abbildung 11).

Des Weiteren wurden Einzellzell-Suspensionen aus Knochenmark und Milz hergestellt und die Verteilung der Granulozyten und Makrophagen (*GR1*<sup>+</sup> und *CD11*<sup>+</sup> Zellen) und B-Lymphozyten (*B220*<sup>+</sup> Zellen) in Abhängigkeit von der Expression des Reporters EGFP (kodiert auf dem bizistronischen, retroviralen Vektor *Mieg3*; Abbildung 6 S. 33) durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 12). Der Bezug zur EGFP-Expression gibt dabei an, ob es sich bei den Veränderungen im hämatopoetischen System um einen Effekt der retroviral transduzierten, EGFP<sup>+</sup> transplantierten Zellen handelt. So zeigten alle Mäuse mit gesteigerter Myeloproliferation bzw. leukämischer Erkrankung deutlich erhöhte EGFP Expression in den akkumulierten Zellen.

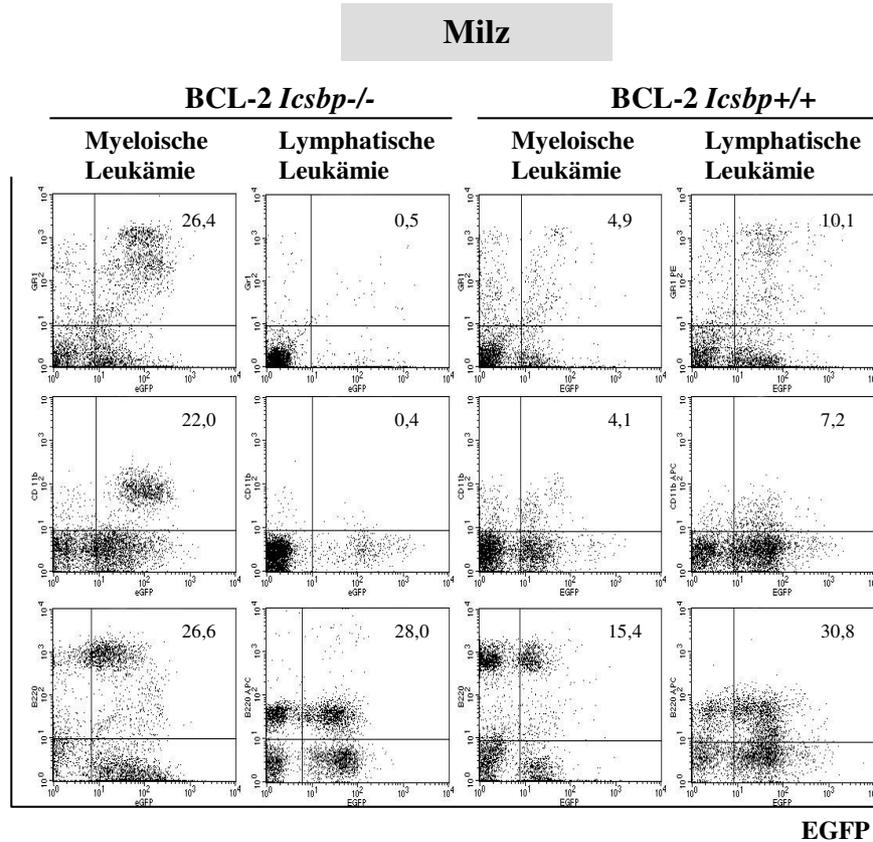
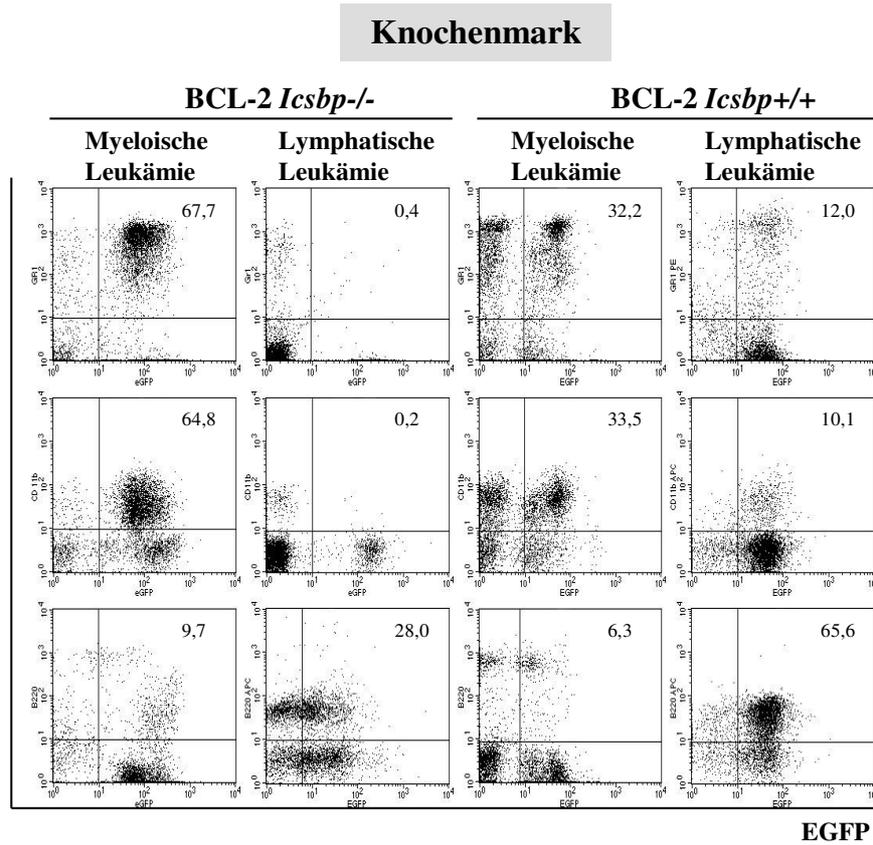


**Abbildung 11: Überexpression von *BCL-2* führt, unabhängig von der *Icsbp* Expression, vereinzelt zur Ausbildung sowohl myeloischer als auch lymphatischer Leukämien (Zytospin-Analyse). Zytospins von Knochenmark- bzw. Milzzellen, May-Grünwald-Giemsa gefärbt.  $N=1$  ist zu berücksichtigen (aufgrund der geringen Anzahl leukämischer Mäuse s. Abbildung 13). g=Granulozyten, l=Lymphozyten, Pfeile=Blastenzellen (exemplarisch angezeigt). Vergrößerung: 1:1000.**

Mäuse mit myeloischer Leukämie zeigten auf den Zytospins von Knochenmark- und Milzzellen eine erhöhte Anzahl an Blasten (Abbildung 11, Pfeile) und eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Abbildung 11, g), bei reduzierter Anzahl an Lymphozyten (Abbildung 11, l). In der FACS-Analyse des Knochenmarks zeigte sich ebenso, im Vergleich zu den Mäusen mit lymphatischer Leukämie, eine hohe Anzahl an  $GR1^{+}EGFP^{+}$  bzw.  $CD11b^{+}EGFP^{+}$  Zellen und eine reduzierte Anzahl  $B220^{+}EGFP^{+}$  Zellen (Abbildung 12).

In der Milz zeigten sich die Leukämien nicht so charakteristisch.  $GR1^{+}EGFP^{+}$  bzw.  $CD11b^{+}EGFP^{+}$  Zellen kamen in erhöhter Zahl (*BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup>) aber auch reduziert (*BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup>) vor. Der Anteil  $B220^{+}EGFP^{+}$  Zellen war gegenüber der Anzahl bei lymphatischen Mäusen gleich (*BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup>) bzw. reduziert (*BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup>) (Abbildung 12).

Lymphatische Leukämien ließen sich durch eine erhöhte Anzahl an Blastenzellen, eine stark erhöhte Lymphozytenzahl unter Reduktion der myeloischen Zellen, auf den Zytospins von Knochenmark- und Milzzellen diagnostizieren (Abbildung 11). In der FACS-Analyse des Knochenmarks zeigten sich lymphatische Leukämien im Vergleich zu myeloischen Leukämien entsprechend durch eine geringe Anzahl an  $GR1^{+}EGFP^{+}$  und  $CD11^{+}EGFP^{+}$  Zellen und eine hohe Anzahl  $B220^{+}EGFP^{+}$  Zellen. In der Milz war der Anteil der  $B220^{+}EGFP^{+}$  Zellen erhöht bis unauffällig (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Überexpression von *BCL-2* führt, unabhängig von der *Icsbp* Expression, vereinzelt zur Ausbildung sowohl myeloischer als auch lymphatischer Leukämien (FACS-Analyse). s. Seite 62.

**Abbildung 12: Überexpression von *BCL-2* führt, unabhängig von der *Icsbp* Expression, vereinzelt zur Ausbildung sowohl myeloischer als auch lymphatischer Leukämien (FACS-Analyse).** Einzelzell-Suspensionen aus Knochenmark und Milz wurden hergestellt und gegen Granulozyten und Makrophagen (GR1<sup>+</sup> und CD11<sup>+</sup>), B-Lymphozyten (B220<sup>+</sup>) angefärbt und durchflusszytometrisch die Verteilung der Zellpopulationen nach EGFP-Expression analysiert. EGFP ist der Reporter des bizistronischen retroviralen Konstrukts. D.h. EGFP-Expression gibt an, dass es sich um einen Effekt der transplantierten Zellen handelt. Analyse an transplantierten *Bcl-2 Icsbp*<sup>-/-</sup> und *Bcl-2 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäusen. N=1 ist zu berücksichtigen (aufgrund der geringen Anzahl leukämischer Mäuse s. Abbildung 13). *Mieg3 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse: gesund, ohne Krankheitsanzeichen 12 Monate nach der Transplantation (N=6).

Insgesamt ergab sich aus der Zytopsin- und FACS-Analyse: Mäuse mit einer retroviralen Überexpression von *BCL-2* im hämatopoetischen System bilden, unabhängig von der *Icsbp* Expression, Leukämien aus. Die Leukämien beruhen auf der klonalen Expansion *Bcl-2* überexprimierender, EGFP<sup>+</sup> transplantierte Zellen und sind nicht von einem Zell-Typus, sondern sowohl myeloischer als auch lymphatischer Ausrichtung.

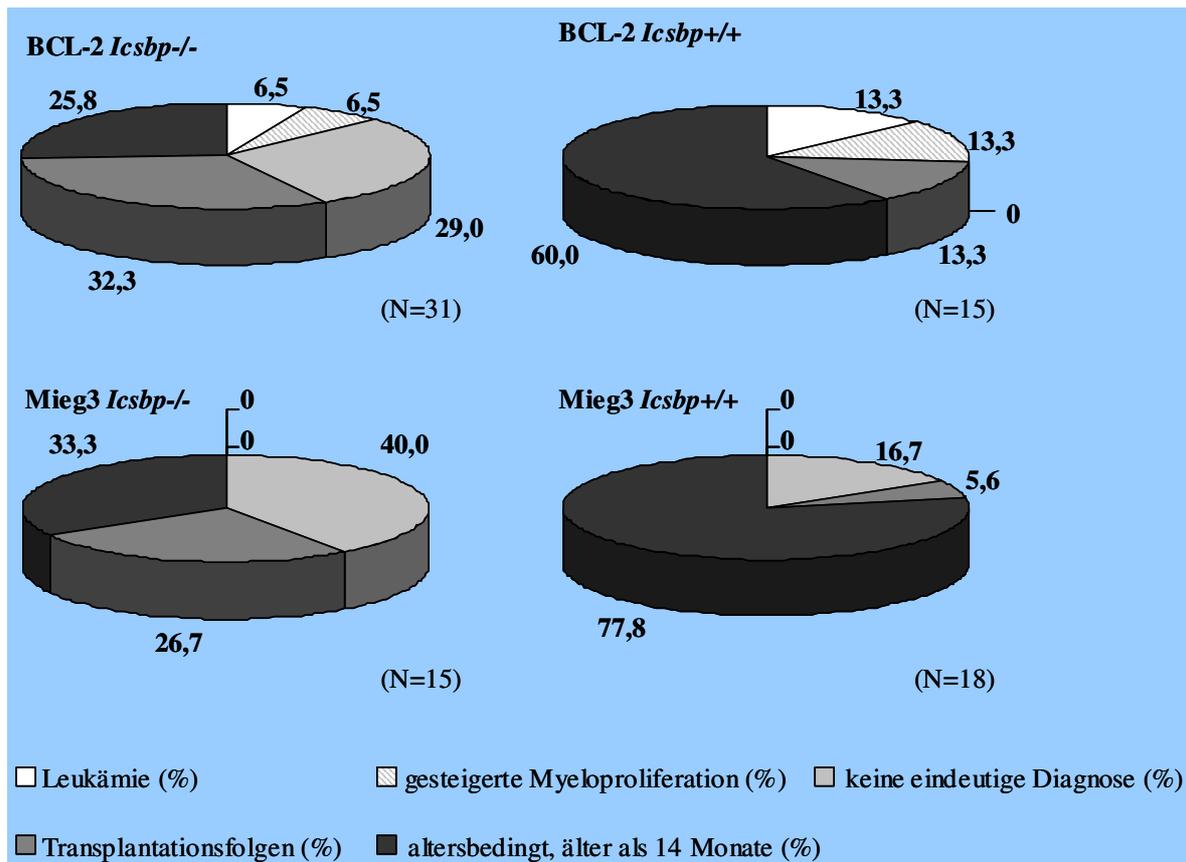
#### **5.I.6. Geringe Leukämie-Inzidenz: Nur 6% respektive 13% der *BCL-2* überexprimierenden Mäuse entwickeln Leukämien**

Bei Betrachtung der statistischen Verteilung der Todesursachen aller transplantierten Mäuse, zeigte sich, die Mehrheit der Mäuse, insgesamt 58-83%, starben altersbedingt oder an Transplantationsfolgen (mangelnde Rekonstitution des Knochenmarks, Strahlenschäden) (Abbildung 13). Die *Bcl-2* Überexpression bzw. die Insertion des *Mieg3*-Konstrukts zeigten demnach keine direkten Auswirkungen auf diese Mäuse.

Wie schon anhand der Überlebenskurven beobachtet worden war, zeigte sich hier erneut das schlechtere Rekonstitutionsvermögen der mit *Icsbp*<sup>-/-</sup> Zellen transplantierten Mäuse. Ca. 30% der Mäuse mit *Icsbp*<sup>-/-</sup> Zellen starben an Transplantationsfolgen, bei den Mäusen mit injizierten *Icsbp*<sup>+/+</sup> Zellen starben an dieser Todesursache nur 6% bzw. 13% (Abbildung 13). Bei 16-40% der transplantierten Mäuse konnte keine genaue Diagnose gestellt werden. Es zeigten sich bei diesen Tieren aber keinerlei Anzeichen für eine Leukämie oder gesteigerte Proliferation eines Zelltyps (Abbildung 13).

Keine der *Mieg3*-Mäuse (*Mieg3 Icsbp*<sup>-/-</sup> bzw. *Mieg3 Icsbp*<sup>+/+</sup>) zeigte Anzeichen für eine gesteigerte Myeloproliferation oder Leukämie-Erkrankung.

Bei den *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen entwickelten 6,5% (2 von 31) eine gesteigerte Myeloproliferation, bei den *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäusen 13,3% (2 von 15) (Abbildung 13). Ebenso bildeten lediglich 6,5% (2 von 31) der *BCL-2 Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse und 13,3% (2 von 15) der *BCL-2 Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse Leukämien aus (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Lediglich 6,5% der BCL-2 *Icsbp*<sup>-/-</sup> und 13,3% der BCL-2 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse bilden Leukämien aus.** Todesursachen aller transplantierten Mäuse. Die Statistiken zeigen die prozentuale (%) Verteilung der an Leukämie erkrankten, die % Verteilung von Mäusen mit gesteigerter Myeloproliferation, die % Verteilung von Mäusen ohne eindeutige Diagnose, die % Verteilung von Mäusen, die Transplantationsfolgen (Strahlenschäden, schlechte Rekonstitution) erlitten und die Prozentzahl von Mäusen, die altersbedingt verstarben. N gibt immer die jeweilige Gesamtzahl an transplantierten Mäusen an.

Demnach führt die retrovirale *BCL-2* Überexpression nur bei einem geringen Teil (6% respektive 13%) der Mäuse zur Ausbildung von Leukämien.

*Icsbp*-Defizienz begünstigt das Ausbilden der Leukämien nicht. Der Anteil der leukämischen Mäuse sowie der Anteil der Mäuse mit gesteigerter Myeloproliferation war bei den BCL-2 *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen sogar um 50% geringer als bei den BCL-2 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäusen. Zudem waren die vereinzelt Leukämiefälle nicht von einem Zell-Typus, sondern sowohl myeloischer als auch lymphatische Ausrichtung.

Ohne retrovirale *BCL-2* Überexpression (in den Mieg3 *Icsbp*<sup>-/-</sup> bzw. Mieg3 *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse) wurde keine gesteigerte Myeloproliferation oder das Ausbilden von Leukämien beobachtet.

Damit beruht die Entwicklung der Leukämien auf der *Bcl-2* Überexpression und retrovirale Insertionsmutagenese kann als Ursache für die Leukämieentstehung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

## 5.II. Nf1-Haploinsuffizienz führt zum Ausbilden von Leukämien in Icsbp-defizienten Mäusen

*NF1* ist ein Tumorsuppressorgen und kodiert das RAS-GTPase aktivierende Protein NF1, welches die Hydrolyse vom aktiven RAS-GTP zum inaktiven RAS-GDP initiiert (Ballester et al., 1990; Martin et al., 1990; Xu et al., 1990). Nach liganden-vermittelter Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Ablauf des RAS-GTP aktivierten MAP-Kinase Signaltransduktionsweges, der in Folge zu vermehrter Zellproliferation und Zelldifferenzierung führt, kann diese Signalkette über NF1 als RAS-GAP reguliert und so die Proliferationsrate begrenzt werden (zur Übersicht: Cichowski und Jacks, 2001). NF1 ist somit ein wichtiger Regulator der Zellproliferation.

Bei Verlust von NF1 durch biallele Inaktivierung bilden humane Neurofibromatose I Patienten, aufgrund der deregulierten Proliferation, Tumore und Leukämien aus, (Xu et al., 1992; Shannon et al., 1994; Colman et al., 1995; Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997; Side et al., 1997; Side et al., 1998). Bei gewebe- bzw. zellspezifischer Nf1-Defizienz entwickeln Mäuse eine (J)CML-ähnliche MPD (Largaespada et al., 1996; Le et al., 2004) (detaillierte Ausführungen in der Einleitung).

Auch *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse bilden eine CML-ähnliche MPD aus, die Anzahl an Granulozyten und myeloischen Progenitoren ist dabei erhöht, Makrophagen liegen vermindert vor (Holtschke et al., 1996). Eine Progression der CML-ähnlichen MPD zur akuten Leukämie wird in den *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch nur sehr selten und zudem unter ungeklärten Umständen beobachtet.

Da der Transkriptionsfaktor ICSBP die Expression von *NF1* positiv reguliert, ist es möglich, dass das Ausbilden der CML-ähnlichen MPD in *Icsbp*-defizienten Mäusen auf der reduzierten *Nf1* Transkriptmenge beruht.

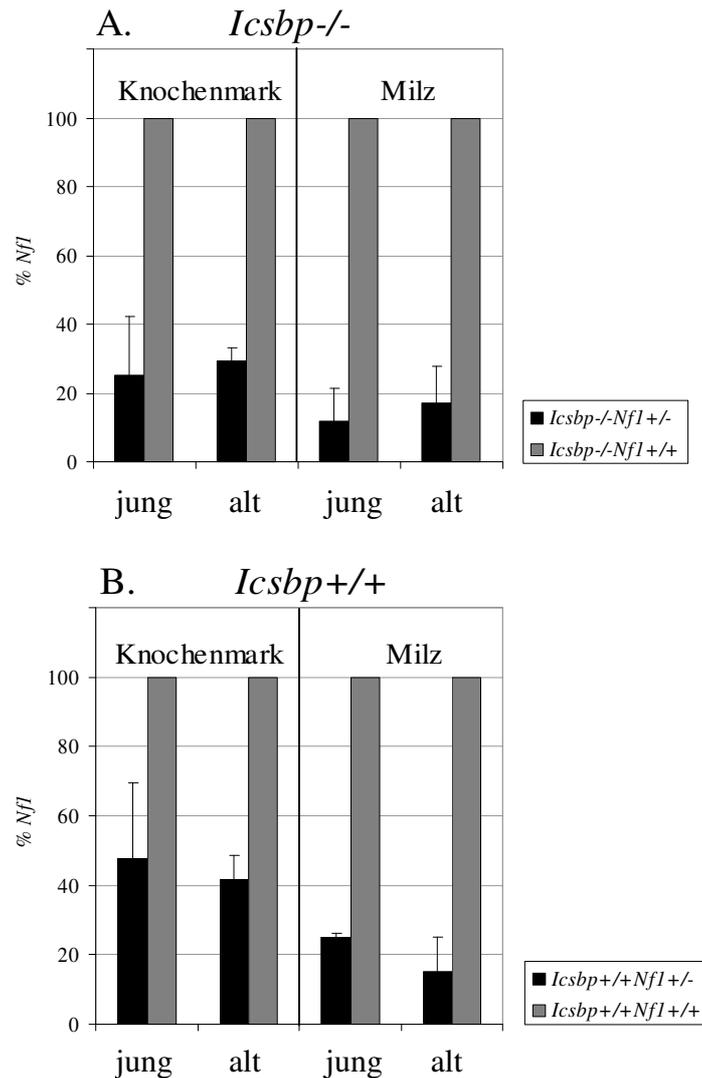
In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher untersucht, ob eine additiv verstärkte Reduktion der *Nf1* Expression, aufgrund der Kombination von Nf1-Haploinsuffizienz und der fehlenden transkriptionellen Aktivierung bei *Icsbp*-Verlust, zur gezielten Induktion von akuten Leukämien in *Icsbp*-defizienten Mäusen führt. Es wurde hinterfragt, ob zur Ausbildung von Leukämien tatsächlich, wie bisher allgemein angenommen, eine biallele Inaktivierung (durch LOH oder somatische Mutationen) von *Nf1* vorliegen muss, oder ob eine verstärkt reduzierte *Nf1* Expression hinreichend ist.

Zudem wurde analysiert, in wieweit der *Icsbp*<sup>-/-</sup> spezifische, zelluläre Phänotyp für das Ausbilden der Leukämien mit entscheidend ist.

## 5.II.1. *Nf1* Expression in Abhängigkeit von den Genotypen

### 5.II.1.1. *Nf1* Heterozygotität führt zu einer Reduktion der *Nf1* Expression um mindestens 50%

*Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>-/-</sup> Mäuse konnten für die Studien zur Leukämieinduktion nicht verwendet werden, denn *Nf1*<sup>-/-</sup> Mäuse sind embryonal letal. Sie sterben am Tag 13.5 p.c. an Herzfehlbildungen und/oder an verschiedensten Deformationen der Neuralleiste (Brannan et al., 1994).



**Abbildung 14A und B: *Nf1* Heterozygotität führt zu einer Reduktion der *Nf1* Expression um mindestens 50% - unabhängig von der Art des Gewebes und dem Alter der Mäuse.** Real-Time PCR an synthetisierter cDNA aus primären Knochenmark- bzw. Milzzellen. 1A.) Zellen aus *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen, 1B.) Zellen aus nicht-leukämischen *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäusen; jung: 3 Monate alte Mäuse, alt: 7 Monate alte Mäuse; N=3. Die Werte für *Nf1*<sup>+/+</sup> (bezogen auf GAPDH) wurden auf 100% normalisiert. Berechnungen: siehe Material und Methoden.

Um zu überprüfen, ob alleine ein heterozygoter Allelstatus von *Nf1* zu einer Verminderung des *Nf1* Expression im hämatopoetischen Gewebe führt und damit tatsächlich eine genetisch-

bedingte Nf1-Defizienz in den zu analysierenden *Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen vorliegt, wurden die *Nf1* Transkriptmengen per Real-Time PCR quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass die *Nf1* Transkriptmenge bei *Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen, im Vergleich zu der *Nf1* Transkriptmenge bei *Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen, um mindestens 50% reduziert war. Das Ergebnis war unabhängig von der *Icsbp* Expression (*Icsbp*<sup>+/+</sup> oder *Icsbp*<sup>-/-</sup>) und vom Ursprung der RNA (Zellen aus dem Knochenmark oder aus der Milz) (Abbildung 14A und 14B). Somit lag durch den heterozygoten *Nf1* Allelstatus eine Nf1-Haploinsuffizienz vor. Zudem ergab der Vergleich zwischen den *Nf1* Transkriptmengen aus den jungen und älteren Tieren keinen Unterschied. Es konnte demnach keine fortschreitende Abnahme der *Nf1* Transkriptmenge mit zunehmendem Alter (bis 7 Monate) der nicht-leukämischen Mäusen beobachtet werden (Abbildung 14A und 14B).

#### **5.II.1.2. Geringste *Nf1* Expression bei *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen**

Wie gezeigt wurde, ist die *Nf1* Expression bei heterozygotem *Nf1* Allelstatus reduziert. Weiterhin zu beweisen war, ob sich bei *Icsbp*-Verlust ebenso eine reduzierte *Nf1* Expression nachweisen lässt, und insbesondere, ob die Kombination von *Icsbp*-Defizienz und Nf1-Haploinsuffizienz in einer zusätzlich verstärkten Reduktion der *Nf1* Expression resultiert.

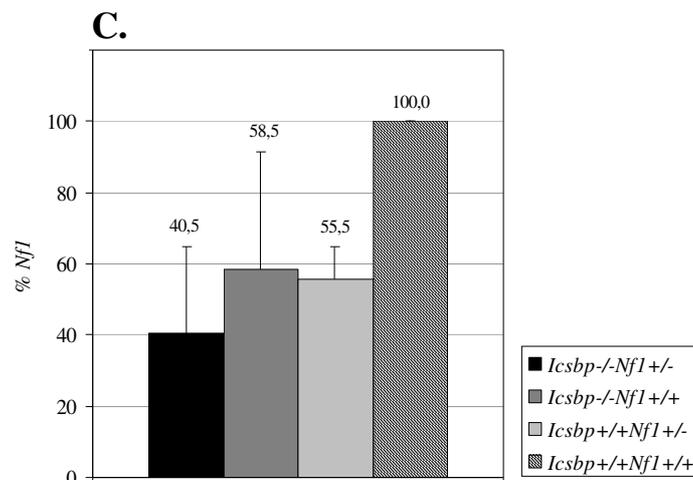
Unter Berücksichtigung zelltyp-abhängiger *Nf1* Expressionsraten lassen jedoch die oben angeführten Real-Time Experimente, aufgrund der unterschiedlichen Zellzusammensetzungen im Knochenmark bzw. in der Milz von *Icsbp*<sup>-/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäusen, keinen Vergleich über die *Nf1* Transkriptmengen zwischen den *Icsbp*<sup>-/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup> Genotypen zu.

Um Vergleichbarkeit zwischen den Genotypen zu schaffen, musste mit Material aus einer weitgehend homogenen Zellpopulation gearbeitet werden. Daher wurden aus den Knochenmarkzellen der Mäuse Knochenmark-Makrophagen kultiviert und aus diesen RNA für weitere Real-Time Experimente isoliert.

Der negative Einfluss des Fehlens des Transkriptionsfaktors *Icsbp* auf die *Nf1* Expression zeigte sich beim Vergleich der %*Nf1*-Werte von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> (4 von 5 Messungen zeigten einen geringeren %*Nf1*-Wert für *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>) und beim Vergleich der %*Nf1*-Werte von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> (3 von 4 Messungen zeigten einen geringeren %*Nf1*-Wert für *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>) (Tabelle 1). Somit unterstützen unsere Daten die bereits publizierten Ergebnisse (Zhu et al., 2004; Huang et al., 2006; Huang et al., 2007), dass der Transkriptionsfaktor *Icsbp* die Expression von *Nf1* positiv reguliert bzw. bei dessen Abwesenheit die *Nf1* Expression reduziert ist.

Die Ursachen für die starken Schwankungen der %*Nf1*-Werte aus *Icsbp*<sup>-/-</sup> Knochenmark-Makrophagen lagen vermutlich in der *Icsbp*<sup>-/-</sup> bedingten Beeinträchtigung der Makrophagen-Differenzierung und somit in unvermeidlichen Heterogenitäten in den *Icsbp*<sup>-/-</sup> Knochenmark-Makrophagen Populationen.

Wie vermutet zeigte sich, dass die geringste *Nf1* Transkriptmenge und damit die niedrigste Expressionsrate, aufgrund der Kombination von *Icsbp*-Defizienz und zusätzlichen *Nf1*-Haploinsuffizienz, bei *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen zu verzeichnen war (Abbildung 14C und Tabelle 1).



**Abbildung 14C: Geringste *Nf1* Expression bei *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen:** Real-Time PCR an synthetisierter cDNA aus Knochenmark-Makrophagen (Knochenmarkzellen stimuliert für 10 Tage mit L-Medium). N=5. Die Werte für *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> (bezogen auf GAPDH) wurden auf 100% normalisiert. Der Mittelwert ist angegeben.

**Tabelle 1.**

Alter (Monate)	<i>Icsbp</i> <sup>-/-</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/-</sup>	<i>Icsbp</i> <sup>-/-</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/+</sup>	<i>Icsbp</i> <sup>+/+</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/-</sup>	<i>Icsbp</i> <sup>+/+</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/+</sup>
8,4	61,6	102,8	60,7	100,0
7,6	33,0	34,6	44,4	100,0
7,0	29,7	50,7	65,5	100,0
3,0	9,9	80,7	51,4	100,0
2,5	68,3	23,7	-	100,0
<b>Mittelwert (%<i>Nf1</i>)</b>	<b>40,5</b>	<b>58,5</b>	<b>55,5</b>	<b>100</b>

**Tabelle 1: Einzelwerte der Real-Time Experimente an cDNA aus Knochenmark-Makrophagen.** %*Nf1*-Einzelwerte zu Abbildung 14C. Die Werte für *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> (bezogen auf GAPDH) wurden auf 100% normalisiert.

## 5.II.2. Prä-Leukämischer Phänotyp:

### Zusätzliche Nf1-Haploinsuffizienz führt in den *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer gesteigerten Myelopoese

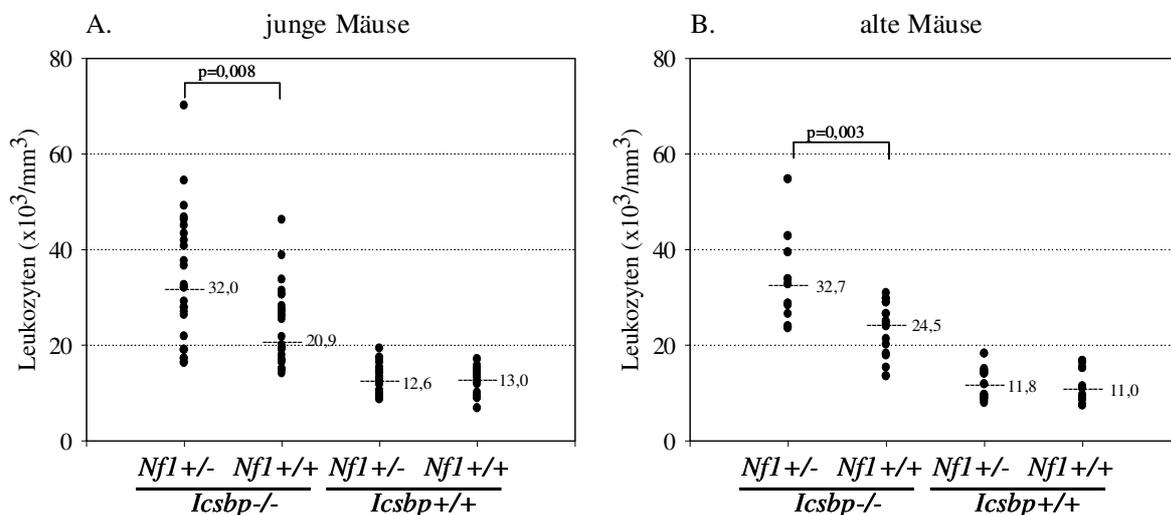
Vor der Analyse der Leukämiefälle wurde der Effekt der verstärkt reduzierten *Nf1* Expression bei jungen Mäusen (2-4 Monate alt (junge Kohorte)) ohne ausgebildete Leukämien untersucht. Zur Studie möglicher Progressionen mit zunehmendem Alter wurden ebenso ältere, nicht-leukämische Mäuse (7-9 Monate alt (alte Kohorte)) analysiert.

Diese Mäuse wurden als prä-leukämische Mäuse bezeichnet. Im Folgenden wird ihr Phänotyp beschrieben.

#### 5.II.2.1. Höchste Leukozytenzahl im peripheren Blut junger *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse .

Anzahl nimmt nicht mit zunehmendem Alter der Mäuse zu.

In den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen fand sich, wie gezeigt, die deutlichste Reduktion der *Nf1* Expression. Ein reduzierte *Nf1* Expression sollte, übertragen auf Proteinebene, aufgrund der verminderten Ras-GTP Hydrolyse in einer deregulierten bzw. erhöhten Zellproliferation resultieren.



**Abbildung 15: Höchste Leukozytenzahl im peripheren Blut von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen.** Den Mäusen wurde peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Gesamtzahl an Leukozyten gemessen. Die jungen Mäuse (A) waren 2-4 Monate alt, das Alter der älteren Tiere (B) lag zwischen 7-9 Monaten. N=26 junge Mäuse (alle Genotypen), N=16 alte Mäuse (alle Genotypen). Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Um den Effekt der zusätzlichen Nf1-Haploinsuffizienz bei Icsbp-Defizienz bzw. der verstärkt reduzierten *Nf1* Expression auf die Hämatopoese zu untersuchen, wurde daher, als Indiz für eine gesteigerte Zellteilung, die Gesamtzahl der Leukozyten im peripheren Blut bestimmt.

Dazu wurde jungen (2-4 Monate alten) und, zur Beobachtung des Verlaufes der Hämatopoese über die Zeit, auch älteren (7-9 Monate alten) *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen und den Mäusen aus den Kontrollgruppen Blut aus der Schwanzvene entnommen und mit einem automatischen Blutzählgerät analysiert.

*Icsbp<sup>-/-</sup>* Mäuse bilden eine CML-ähnliche MPD aus, gekennzeichnet u.a. durch eine erhöhte Leukozytenzahl im peripheren Blut (Holtschke et al., 1996) (bestätigt in Abbildung 15A und 15B).

Zu beobachten war, dass Nf1-Haploinsuffizienz allein nicht zum Anstieg der Leukozytenzahl führte (Vergleich: *Icsbp<sup>+/+</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* mit *Icsbp<sup>+/+</sup>Nf1<sup>+/+</sup>*:  $p=0,876$  jung;  $p=0,812$  alt).

Das Interesse galt insbesondere dem Vergleich zwischen den *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* und den *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäusen. Schon bei jungen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen zeigte sich eine zu den *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäusen signifikant erhöhte Leukozytenzahl im peripheren Blut dieser Mäuse ( $p=0,008$ ) (Abbildung 15A). Der signifikante Unterschied blieb mit zunehmendem Alter der Mäuse bestehen ( $p=0,008$  jung zu  $p=0,003$  alt), er verstärkte sich jedoch nicht (Median<sub>jung</sub>: 32,0 zu Median<sub>alt</sub>: 32,7) (Abbildung 15B).

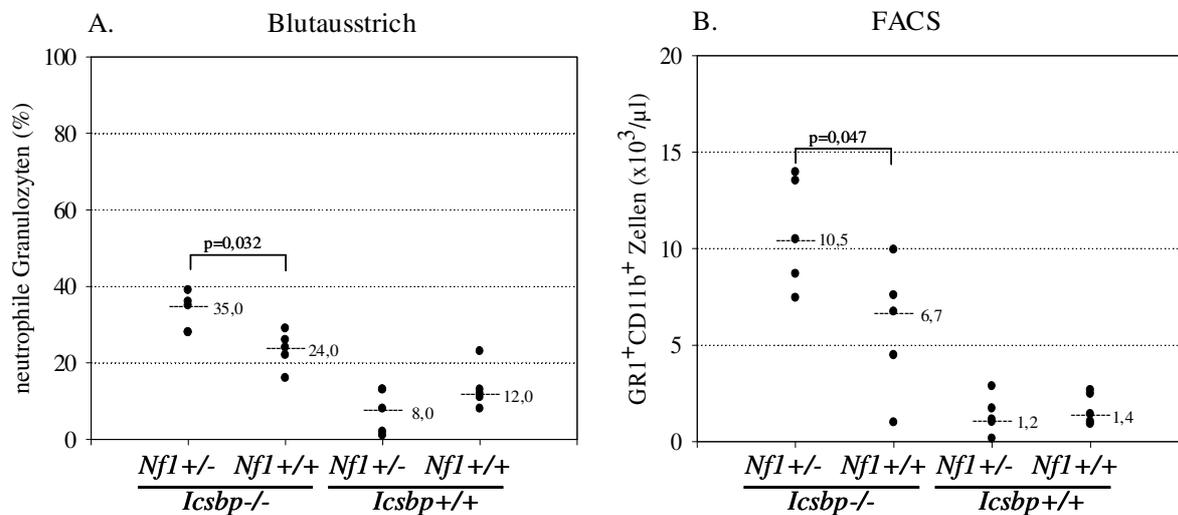
### **5.II.2.2. Die Erhöhung der Leukozytenzahl basiert auf einer Vermehrung der Granulozyten**

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der Leukozytenzahl auf einem allgemeinen Anstieg aller Leukozyten oder der Vermehrung einer einzelnen Zellpopulation beruhte, wurde das periphere Blut der Mäuse mittels May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutaussstrichen auf den prozentualen Anteil von neutrophilen Granulozyten bzw. Lymphozyten und, mittels zellspezifischen FACS-Färbungen, auf die Gesamtzahl an Granulozyten bzw. B220<sup>+</sup> Lymphozyten analysiert. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahlen (pro  $\mu$ l) wurden die prozentualen FACS-Werte über die Gesamtleukozytenzahl der jeweiligen Mäuse kalkuliert.

Wie bereits publiziert (Holtschke et al., 1996) war in den Icsbp-defizienten Mäusen, im Vergleich zu den wildtypischen Icsbp Mäusen, sowohl der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten (Abbildung 16A) als auch die Gesamtzahl an Granulozyten (Abbildung 16B) erhöht.

Nf1-Haploinsuffizienz allein machte sich im peripheren Blut der *Icsbp<sup>+/+</sup>* Mäuse weder im prozentualen Anteil noch in der Gesamtzahl an Granulozyten bemerkbar

(Vergleich: *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>-/-</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,31 Blutausstrich; p=0,754 FACS) (Abbildung 16A und 16B).



**Abbildung 16: Höchster prozentualer Anteil bzw. höchste Anzahl an Granulozyten im peripheren Blut von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen.** A) Blutausstrich, May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Es wurden je Genotyp 5 Ausstriche von unterschiedlichen Mäusen präpariert und je 100 Zellen „blind“ gezählt. B) FACS mit peripherem Blut. GR1-CD11b-Färbung für Granulozyten. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahlen (pro µl) wurden die prozentualen FACS-Werte über die Gesamtleukozytenzahl der jeweiligen Mäuse kalkuliert. Alter der Mäuse: 4 Monate. N=5. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

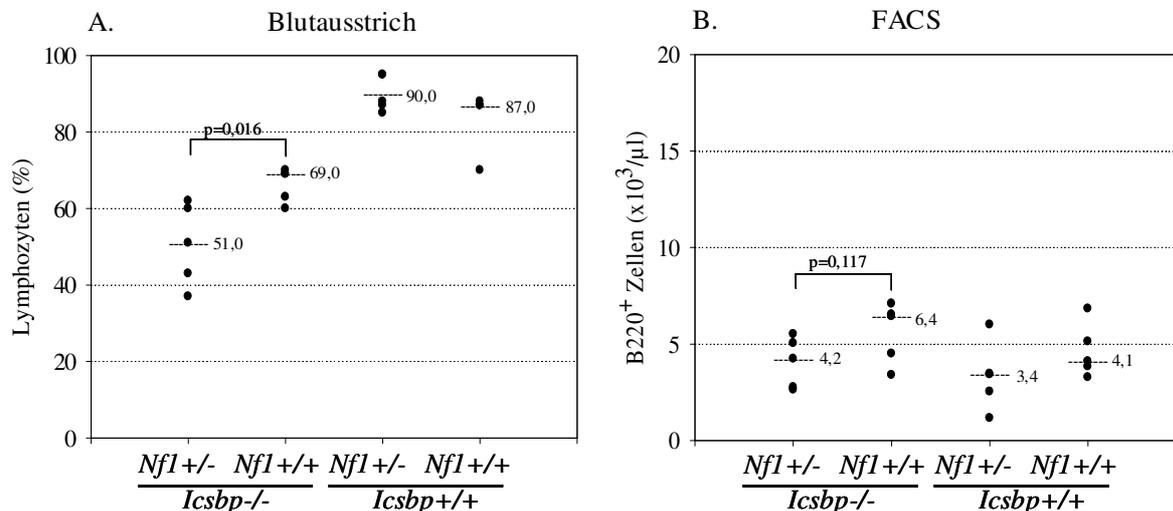
Unter der Kombination von Nf1-Haploinsuffizienz und *Icsbp*-Defizienz bei den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen zeigte sich im peripheren Blut der höchste prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten als auch die höchste Gesamtzahl an Granulozyten. Die Granulozytenwerte der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse waren noch über die Granulozytenwerte der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse hinaus erhöht (p=0,032 Blutausstrich; p=0,047 FACS) (Abbildung 16A und 16B).

Die Analyse der Lymphozyten ergab (Abbildung 17A und 17B): In den *Icsbp*-defizienten Mäusen zeigte sich eine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an Lymphozyten (Vergleich *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,008) bei statistisch nicht signifikanter Änderung in der Gesamtzahl an B220<sup>+</sup> Lymphozyten (Vergleich *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,347).

Zwischen *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen bestand bzgl. des Lymphozytenanteils bzw. der B220<sup>+</sup> Lymphozytengesamtzahl kein signifikanter Unterschied (p=0,31 Blutausstrich, p=0,175 FACS).

Bei *Icsbp*-Defizienz führte die zusätzliche Nf1-Haploinsuffizienz jedoch zu einer signifikanten Abnahme in dem prozentualen Anteil an Lymphozyten

(Vergleich *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p=0,016$ ). Die Gesamtzahl an B220<sup>+</sup> Lymphozyten reduzierte sich aber, aufgrund der insgesamt erhöhten Anzahl an Leukozyten, nicht signifikant (Vergleich *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p=0,117$ ).



**Abbildung 17: Abnahme des prozentualen Anteils aber keine Änderung in der Gesamtanzahl an Lymphozyten im peripheren Blut von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen.** A) Blutausstrich, May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Es wurden je Genotyp 5 Ausstriche von jeweils unterschiedlichen Mäusen präpariert und je 100 Zellen „blind“ gezählt. B) FACS mit peripherem Blut. B220-(Gr1-)Färbung. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahlen (pro μl) wurden die prozentualen FACS-Werte über die Gesamtleukozytenzahl der jeweiligen Mäuse kalkuliert. Alter der Mäuse: 4 Monate. N=5. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Aus den Ergebnissen ergibt sich daher, dass die erhöhte Anzahl an Leukozyten im Blut der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse auf die erhöhte Anzahl an Granulozyten zurückzuführen ist.

### 5.II.2.3. Erhöhtes Milzgewicht und erhöhte Milzzellzahl bereits bei jungen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen

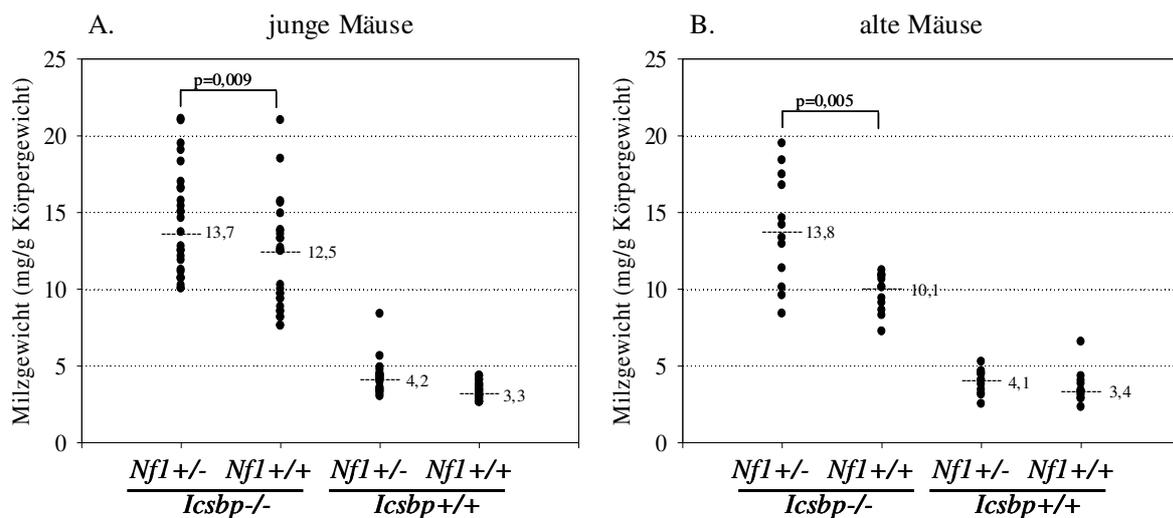
Die Ergebnisse aus dem peripheren Blut lieferten erste Anzeichen für eine gesteigerte Myelopoese in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen. Experimente an der Milz, einem peripheren hämatopoetischen Organ, sollten diesen Befund untermauern.

Einen indirekten Beweis für eine verstärkte Infiltration der Milz mit hämatopoetischen Zellen und damit für eine möglicherweise deregulierte Hämatopoese liefern bereits die Milzgewichte. Daher wurden im weiteren zunächst die Milzgewichte von jungen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse und von Mäusen der Kontrollgruppen ermittelt. Zur Studie über den Zeit- bzw. Altersverlauf wurden ebenso die Milzgewichte von älteren prä-leukämischen Mäusen bestimmt.

Auch hier zeigten sich wiederum die Auswirkungen der *Icsbp*-Defizienz: *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten, aufgrund der CML-ähnlichen MPD, eine verstärkte Infiltration der Milz mit Zellen und hatten somit höhere Milzgewichte (Holtschke et al., 1996) (bestätigt in Abbildung 18A und 18B).

Ein Effekt allein basierend auf der *Nf1*-Haploinsuffizienz war ebenfalls zu beobachten: *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse hatten signifikant höhere Milzgewichte als *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p < 0,00001$  jung;  $p = 0,114$  alt (p für die alten Mäuse nicht signifikant vermutlich aufgrund hoher Varianzen in den Werten bei relativ geringer N-Zahl)).

*Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>-Mäuse, mit der Kombination von *Icsbp*-Defizienz und *Nf1*-Haploinsuffizienz, wiesen jedoch die größten Milzen auf. Es bestand ein signifikanter Unterschied zu den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen ( $p = 0,009$  jung,  $p = 0,005$  alt). Die Milzgewichte vergrößerten sich jedoch nicht überproportional zum Mausgewicht mit zunehmendem Alter (Median<sub>jung</sub>: 13,7 zu Median<sub>alt</sub>: 13,8) (Abbildung 18A und 18B).



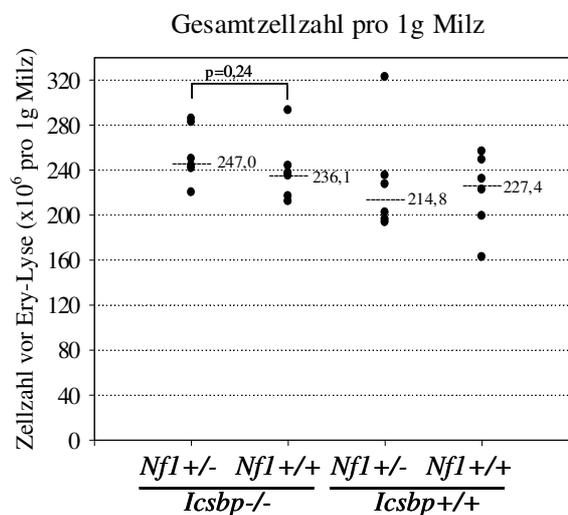
**Abbildung 18: Höchste Milzgewichte bei *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen. Milzgewichte steigen nicht mit zunehmendem Alter.** Die Gewichte der einzelnen Mäuse und der entnommenen Milzen wurden ermittelt. Die jungen Mäuse (A) waren 2-4, die älteren Tiere (B) 7-9 Monate alt. Durch Angabe des Milzgewichtes in mg/g Körpergewicht wurde der Einfluss des individuellen Körpergewichts normalisiert. N=25 für die jungen Mäuse, N=12 für die älteren Mäuse. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Zur Überprüfung der Proportionalität des Milzgewichtes zu der ihr enthaltenen Zellanzahl, wurden Milzzell-Suspensionen hergestellt, die Gesamtzellzahl (Zellzahl vor Lyse der Erythrozyten) ermittelt und auf 1 Gramm Milz berechnet.

Aus Abbildung 19 geht hervor, trotz unterschiedlicher Milzgewichte war die Gesamtzellzahl pro 1 Gramm Milz für alle hier verglichenen Genotypen gleich (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p=0,24$ ; *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p=0,18$ ).

D.h. die Milzzellzahl steigt proportional mit dem Milzgewicht und somit ist seinerseits das Milzgewicht ein direkter Marker für die Milzzellzahl.

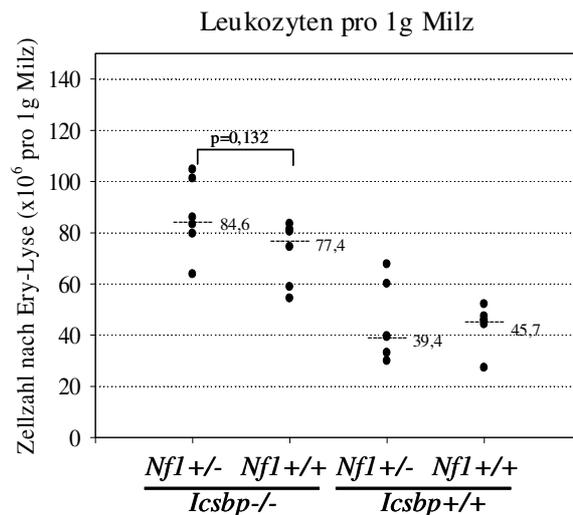
Übertragen auf die Milzgewichte bedeutete dies: Die *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse mit den größten Milzengewichten haben auch die höchsten Milzzellzahlen. Die Ursachen hierfür liegen vermutlich in einer deregulierten Hämatopoese bzw. Myelopoese und dadurch verstärkten Infiltration.



**Abbildung 19: Das Milzgewicht ist ein direktes Maß für die Milzzellzahl.** Das Gewicht der Milzen wurde mit einer Präzisionswaage ermittelt. Milzzell-Suspensionen wurden hergestellt und die Gesamtzellzahl vor der Erythrozyten-Lyse automatisch per Zellzählgerät bestimmt. Die Anzahl der Milzzellen wurde auf 1 Gramm Milz berechnet. Alter der Mäuse: 4-5 Monate. N=6. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

#### 5.II.2.4. Höchste Leukozytenzahl in der Milz von jungen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen

Die erhöhte Milzzellzahl in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen kann auf einer Zunahme der Anzahl an Erythrozyten oder der Anzahl an Leukozyten basieren. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden von den Milzzell-Suspensionen aus dem vorigen Versuch, die Erythrozyten lysiert und die Anzahl an Leukozyten pro 1 Gramm Milz ermittelt.



**Abbildung 20: Gleiche Anzahl an Leukozyten pro 1 Gramm Milz zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen.** Die Milzgewichte wurden ermittelt, Milzzell-Suspensionen hergestellt und die Erythrozyten lysiert. Die Anzahl an Leukozyten wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes ermittelt und auf 1 Gramm Milz berechnet. Mäuse: 4-5 Monate alt. N=6. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

*Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse haben eine höhere Anzahl an Leukozyten in der Milz als *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäuse (Holtschke et al., 1996) (bestätigt in Abbildung 20). *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten keine erhöhte Leukozytenzahl in der Milz (Vergleich: *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,818).

Zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen ist die Anzahl der Leukozyten pro 1 Gramm Milz tendenziell erhöht (Median<sub>*Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup></sub>: 84,6 zu Median<sub>*Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup></sub>: 77,4), aufgrund der geringen Probenzahl (N=5) und zudem der hohen Varianz ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied (p=0,132) (Abbildung 20).

Berücksichtigte man jedoch die Unterschiede in den Milzgewichten zwischen den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen, so ergab sich daraus, bei den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen mit den um ca. 10% (bis 37% bei den 7-9 Monate alten Mäusen) größeren Milzen, eine dadurch bedingte, deutliche Erhöhung der Leukozytenzahl pro ganzer Milz. Demnach beruhte die Erhöhung der Milzgewichte in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen auf einer gesteigerten Infiltration mit Leukozyten.

### **5.II.2.5. Erhöhter Anteil neutrophiler Granulozyten in den Lymphknoten von prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen**

Die bisherigen Ergebnisse für die prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten eine erhöhte Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut und in der Milz. Im peripheren Blut deuteten die Befunde auf eine gesteigerte Myelopoese hin, ausschlaggebend war hier die erhöhte Granulozytenzahl.

Um eine Verschiebung in der prozentualen Verteilung der myeloischen bzw. lymphatischen Zellen in den hämatopoetischen Organen zu detektieren, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Einzelzell-Suspensionen aus Knochenmark, Milz und Lymphknoten der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse und der Mäuse der Kontrollgruppen verwendet.

Wie bereits publiziert (Holtschke et al., 1996) war für die *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäuse die Prozentzahl an GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Granulozyten im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphknoten erhöht und der Anteil B220<sup>+</sup> Lymphozyten im Knochenmark und in der Milz reduziert (bestätigt in Abbildung 21).

Zwischen *Icsbp*<sup>+/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen bestand in der prozentualen Verteilung der GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten bzw. B220<sup>+</sup> Lymphozyten kein Unterschied (Abbildung 21).

Beim Vergleich der prozentualen Zellverteilung der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse und der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> fanden sich für die B220<sup>+</sup> Zellen weder im Knochenmark, noch in der Milz, noch im Lymphknoten Unterschiede. Auch für die Verteilung der GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen fanden sich im Knochenmark und in der Milz keine Unterschiede. Jedoch in den Lymphknoten der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse war der prozentuale Anteil GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophiler Granulozyten zum Anteil in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen um mehr als das Doppelte erhöht (Mittelwert: 11,5 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>; Mittelwert: 5,2 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>) (Abbildung 21).

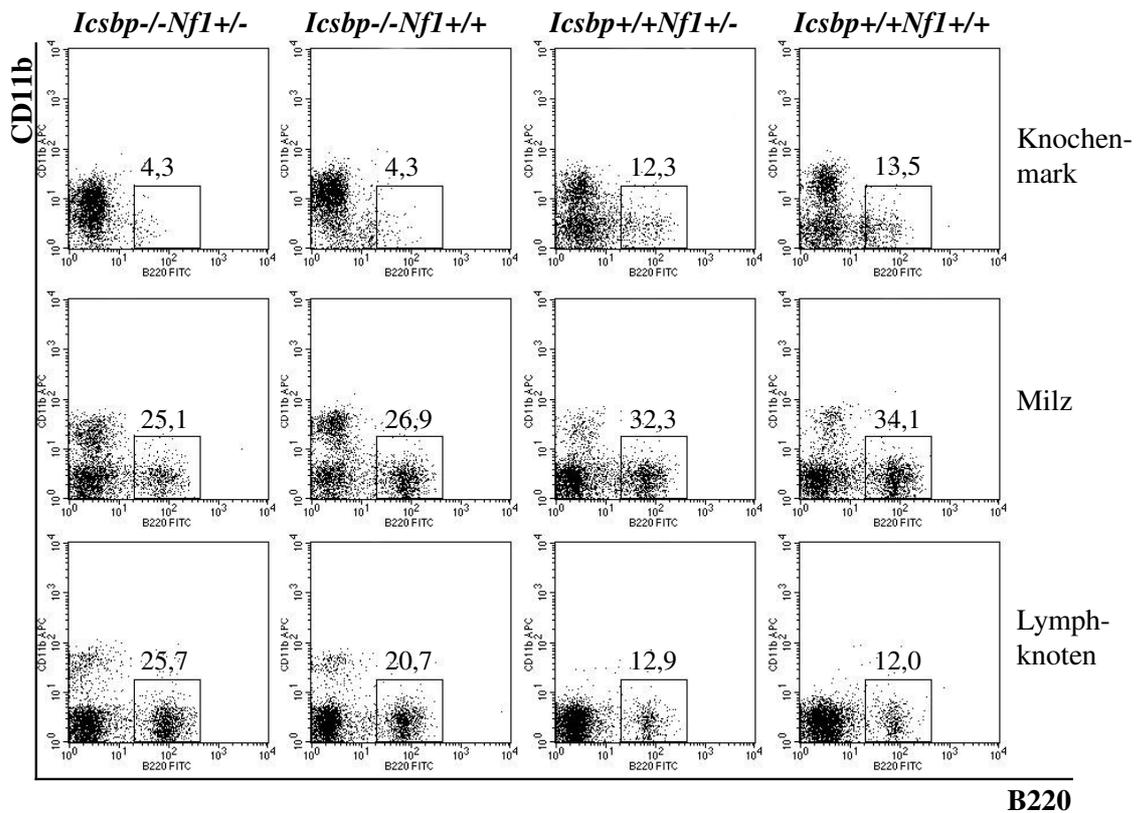
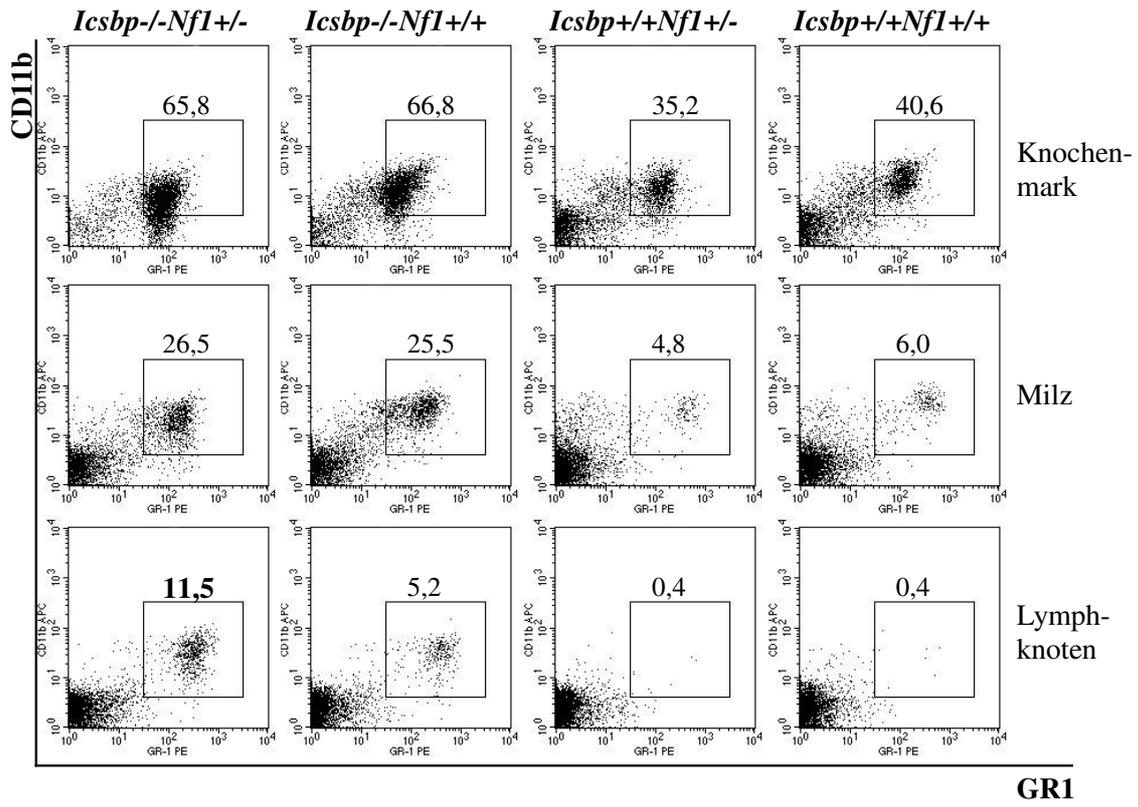


Abbildung 21: Erhöhter Anteil neutrophiler Granulozyten in den Lymphknoten von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen. s. Seite 77.

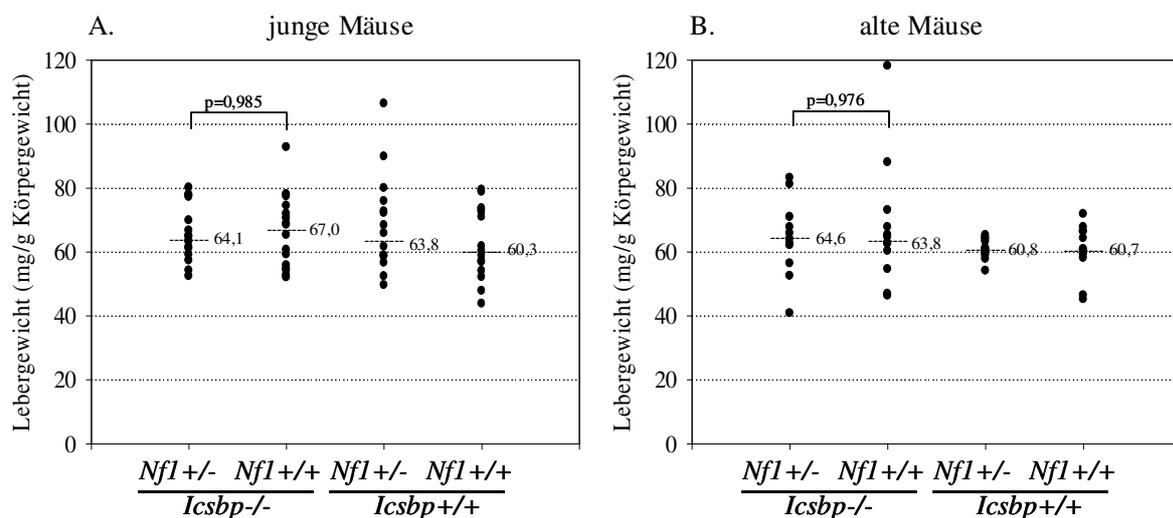
**Abbildung 21: Erhöhter Anteil neutrophiler Granulozyten in den Lymphknoten von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen.** FACS-Färbung: GR1-CD11b-B220-Färbung für GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten und B220<sup>+</sup> Lymphozyten. Dargestellt: % Anteil vitaler Zellen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert. Mäuse: 4 Monate alt. N=5.

Somit zeigen sich, neben den Ergebnissen aus dem peripheren Blut und der Milz, auch in den Lymphknoten der jungen, prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse Anzeichen für eine gesteigerte Myelopoese bzw. verstärkte Infiltration.

Zudem wurden FACS-Analysen für Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), dendritische Zellen (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), B1-Zellen (CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) durchgeführt. Es zeigten sich jedoch keine weiteren Unterschiede in den Zellverteilungen zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen (Daten nicht gezeigt).

### 5.II.2.6. Die Lebern der prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigen keine Anzeichen einer Infiltration

Es ist bekannt, dass neben der Milz und den Lymphknoten auch die Leber, als potentielles hämatopoetisches Organ, von myeloischen Zellen infiltriert werden kann. Nach Beobachtung der unterschiedlichen Milzgrößen, wurden daher auch die Lebern auf Gewichtsunterschiede, die auf eine verstärkte Zellinfiltration hinweisen könnten, untersucht.



**Abbildung 22: Keine Anzeichen einer gesteigerten Infiltration in der Leber.** Die Gewichte der einzelnen Mäuse und der entnommenen Lebern wurden ermittelt. Die jungen Mäuse (A) waren 2-4, die älteren Tiere (B) 7-9 Monate alt. Durch Angabe des Lebergewichtes in mg/g Körpergewicht wurde der Einfluss des individuellen Körpergewichts normalisiert. N=15 junge Mäuse, N=11 älteren Mäuse. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Die Lebern wurden den getöteten Mäusen entnommen und die Gewichte per Präzisionswaage ermittelt. Wiederum wurden, um einen Verlauf über das zunehmende Alter aufzeichnen zu können, auch bei älteren Mäusen die Lebergewichte bestimmt.

Die Lebergewichte unterschieden sich nicht zwischen den hier verglichenen Genotypen (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p=0,985$  jung und  $p=0,976$  alt; *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p=0,446$  jung und  $p=0,755$  alt) (Abbildung 22). Eine überproportionale Zunahme des Lebergewichts zum Körpergewicht mit dem Alter konnte ebenso nicht beobachtet werden (*Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>: Median<sub>jung</sub>: 64,1 zu Median<sub>alt</sub>: 64,6) (Abbildung 22).

Somit wirkt sich weder *Icsbp*-Defizienz noch die *Nf1*-Haploinsuffizienz auf das Lebergewicht von prä-leukämischen Mäusen aus.

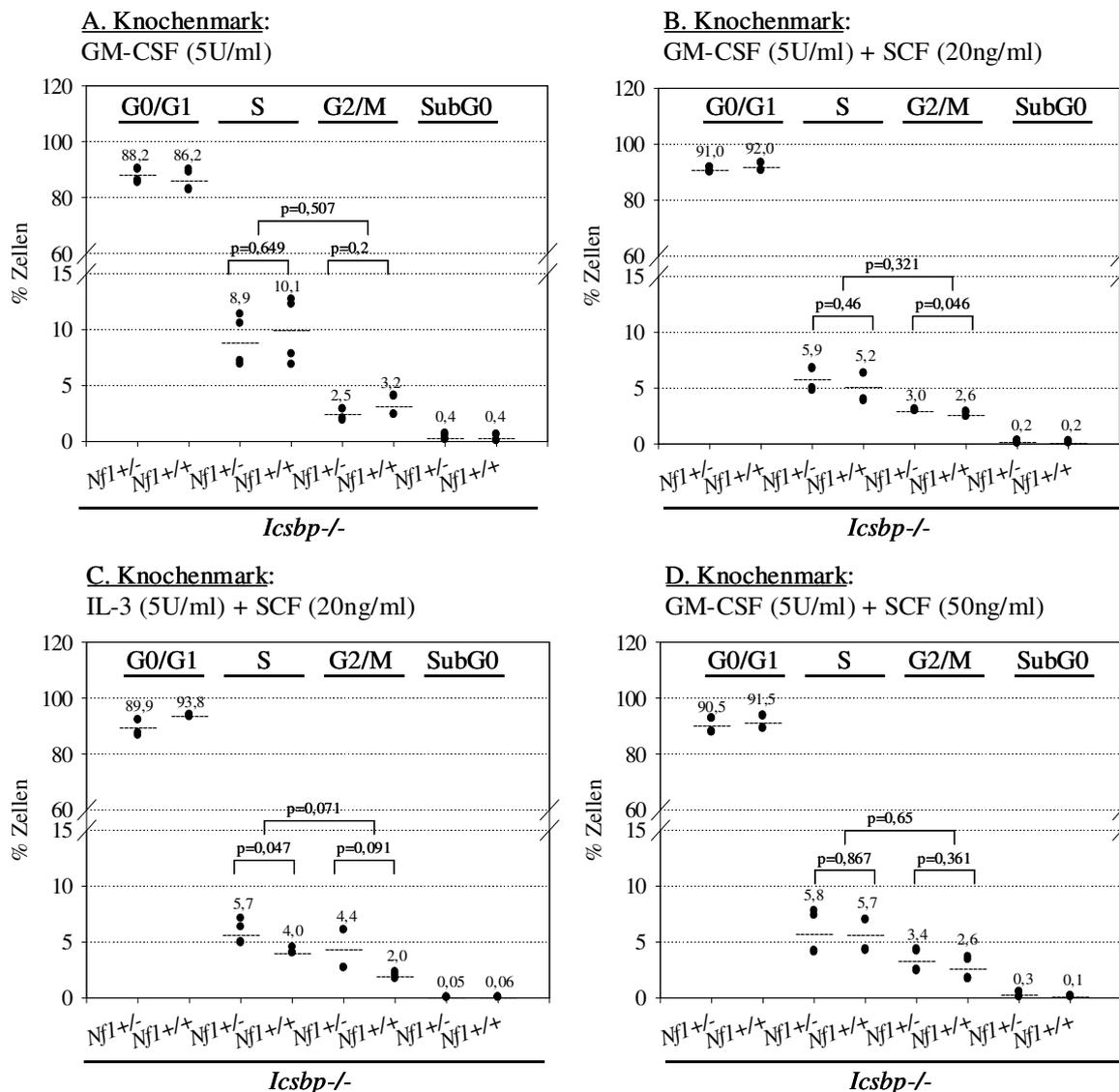
#### **5.II.2.7. Verteilung von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Zellen über die Zellzyklusphasen**

Wie bereits erwähnt ist *Nf1* eine Ras-GAP und reguliert über die Menge an zur Verfügung stehendem, aktivem Ras-GTP u.a. die Zellproliferation. Bei reduzierter *Nf1* Expression (vorliegend in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen; Abbildung 14A und 14C S.65,67) sollte daher, in Anlehnung an die Ergebnisse mit murinen und humanen NF1-defizienten hämatopoetischen Zellen (Bollag et al., 1996; Largaespada et al., 1996; Le et al., 2004), mehr aktives Ras-GTP vorhanden und die Zellproliferationsrate erhöht sein. Indizien hierfür sind möglicherweise die erhöhte Anzahl von Leukozyten bzw. Granulozyten in der Milz, im peripheren Blut und in den Lymphknoten der prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse.

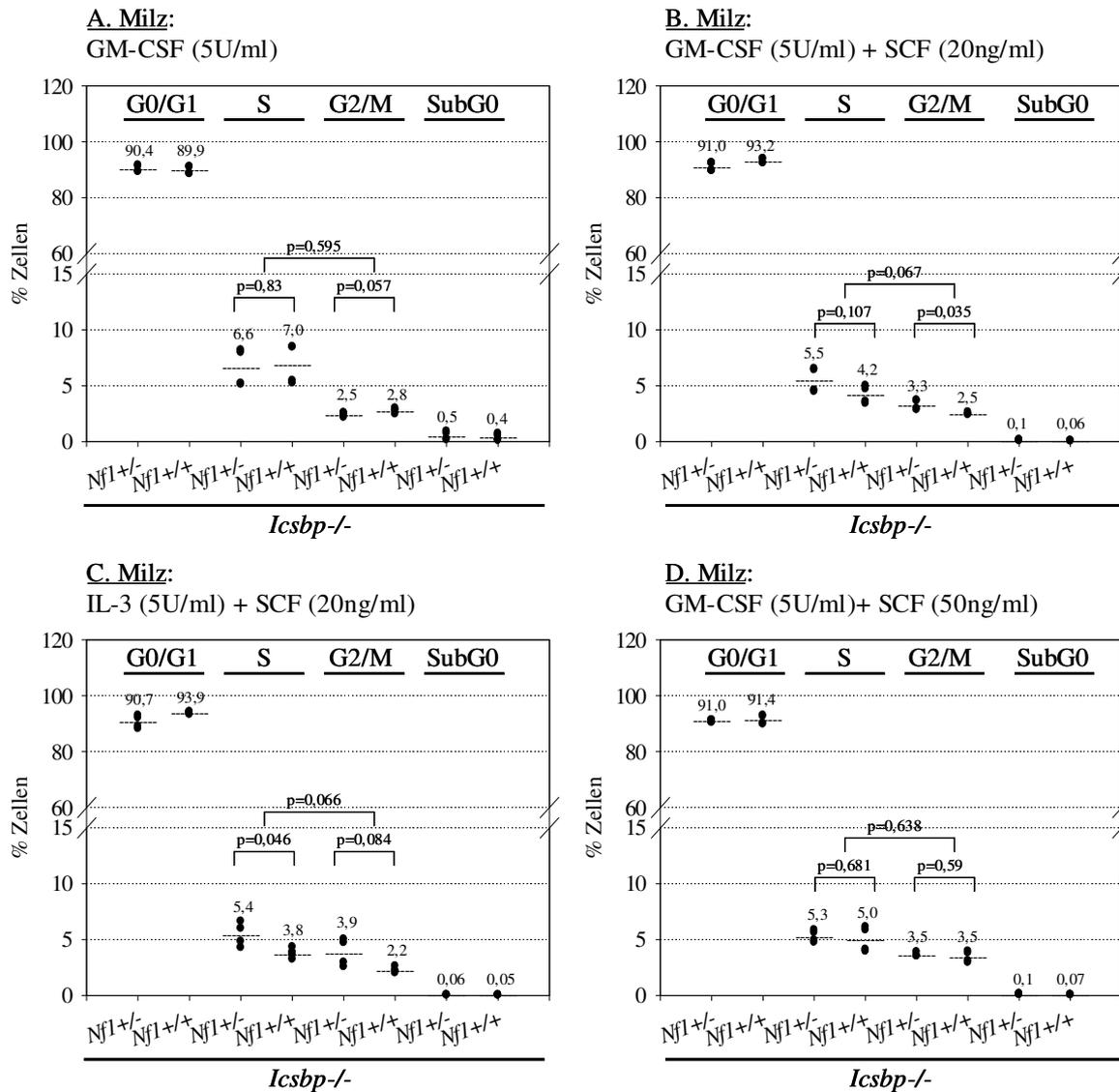
Zur Untersuchung von Unterschieden in den Zellzyklusphasen wurden aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen Knochenmark- und Milzzell-Suspensionen hergestellt. Die Zellsuspensionen wurden für 10 Tage mit unterschiedlichen, die myeloische Zellentwicklung begünstigenden Zytokin-Kombinationen stimuliert. Grundlage für die Zytokin-Zusammenstellung waren auch die Ergebnisse zur Zytokin-abhängigen (GM-CSF, SCF, IL-3) Hypersensitivität von *Nf1*-defizienten hämatopoetischen Zellen (Emanuel et al., 1991; Zhang et al., 1998). Am 10. Tag der Stimulation wurde der Zellzyklus mittels Propidium-Iodid (PI) analysiert. Die Bindung von PI an die DNA erlaubt dabei die Analyse der Zellzyklus-Zustände einer Zellpopulation mittels Messung der PI-Fluoreszenz per Durchflusszytometrie. Unter Stimulation mit GM-SCF bzw. GM-CSF kombiniert mit einer hohen Dosis SCF (50ng/ml) wurde weder für Knochenmark- noch für Milzzellen von den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen eine signifikante Verschiebung der Zellzyklusphasen detektiert (Abbildung 23A und 23D bzw. 24A und 24D). Möglicherweise ist, aufgrund der Zytokinhyperresponsivität der

Zellen, bei der hohen SCF-Konzentration kein Unterschied im Proliferationsverhalten mehr detektierbar.

Hingegen wurde eine signifikant erhöhte G2/M Phase ( $p=0,046$  Knochenmark;  $p=0,035$  Milz) und Tendenzen für eine erhöhte S-Phase jedoch sowohl für Knochenmark- als auch für Milzzellen von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen nach Stimulation mit GM-CSF und einer geringen Dosis SCF (20ng/ml) beobachtet. Unter Berücksichtigung beider proliferations-anzeigenden Phasen (S-Phase und G2/M-Phase) ergab sich jedoch insgesamt kein signifikanter Unterschied ( $p=0,321$  Knochenmark;  $p=0,067$  Milz) (Abbildung 23B bzw. 24B).



**Abbildung 23: Verteilung der Zellzyklusphasen nach Zytokin-Simulation von Knochenmarkszellen.** Knochenmarkszell-Suspensionen wurden für 10 Tage mit den angegebenen Zytokin-Kombinationen stimuliert (mGM-CSF, mIL-3, rSCF). Am 10. Tag wurden die Zellzyklusphasen über PI-Inkorporation mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Alter der Mäuse: 4-5 Monate. N=4. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Numerisch angegeben ist der jeweilige Median (Linie). Statistik: Student's T Test.



**Abbildung 24: Verteilung der Zellzyklusphasen nach Zytokin-Simulation von Milzzellen.** Milzzell-Suspensionen wurden für 10 Tage mit den angegebenen Zytokin-Kombinationen stimuliert (mGM-CSF, mIL-3, rSCF). Am 10. Tag wurden die Zellzyklusphasen über PI-Inkorporation mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Alter der Mäuse: 4-5 Monate. N=4. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Numerisch angegeben ist der jeweilige Median (Linie). Statistik: Student's T Test.

Nach Zugabe von IL-3 und der geringen Dosis SCF (20ng/ml) konnte, im Gegenzug, eine signifikant erhöhte S-Phase sowohl für die Zellen aus dem Knochenmark als auch aus der Milz von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen beobachtet werden ( $p=0,047$  Knochenmark;  $p=0,046$  Milz), sowie eine tendenzielle Erhöhung der G2/M-Phase. Wiederum konnte unter Bezugnahme beider proliferations-anzeigenden Zyklusphasen insgesamt kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p=0,071$  Knochenmark;  $p=0,066$  Milz) (Abbildung 23C und 24C).

Somit lagen zwar, unter Stimulation mit 5U/ml GM-CSF (bzw. IL-3) und 20ng/ml SCF, Tendenzen für eine erhöhte S- bzw. G2/M-Phase und damit für eine gesteigerte Proliferation in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen vor, ein insgesamt signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten wurde jedoch nicht festgestellt.

Kürzere Dauer der Zytokin-Stimulation (Tag 5) sowie Stimulation über einen längeren Zeitraum (Tag 18) ergaben ebenso keine signifikanten Unterschiede in den Zellzyklusphasen (Daten nicht gezeigt).

Mit gleichem Versuchsansatz wurden ebenso über Inkorporation von H<sup>3</sup>-Thymidin die S-Phasen ermittelt. Auch mit diesem Ansatz konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Knochenmark- und Milzzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

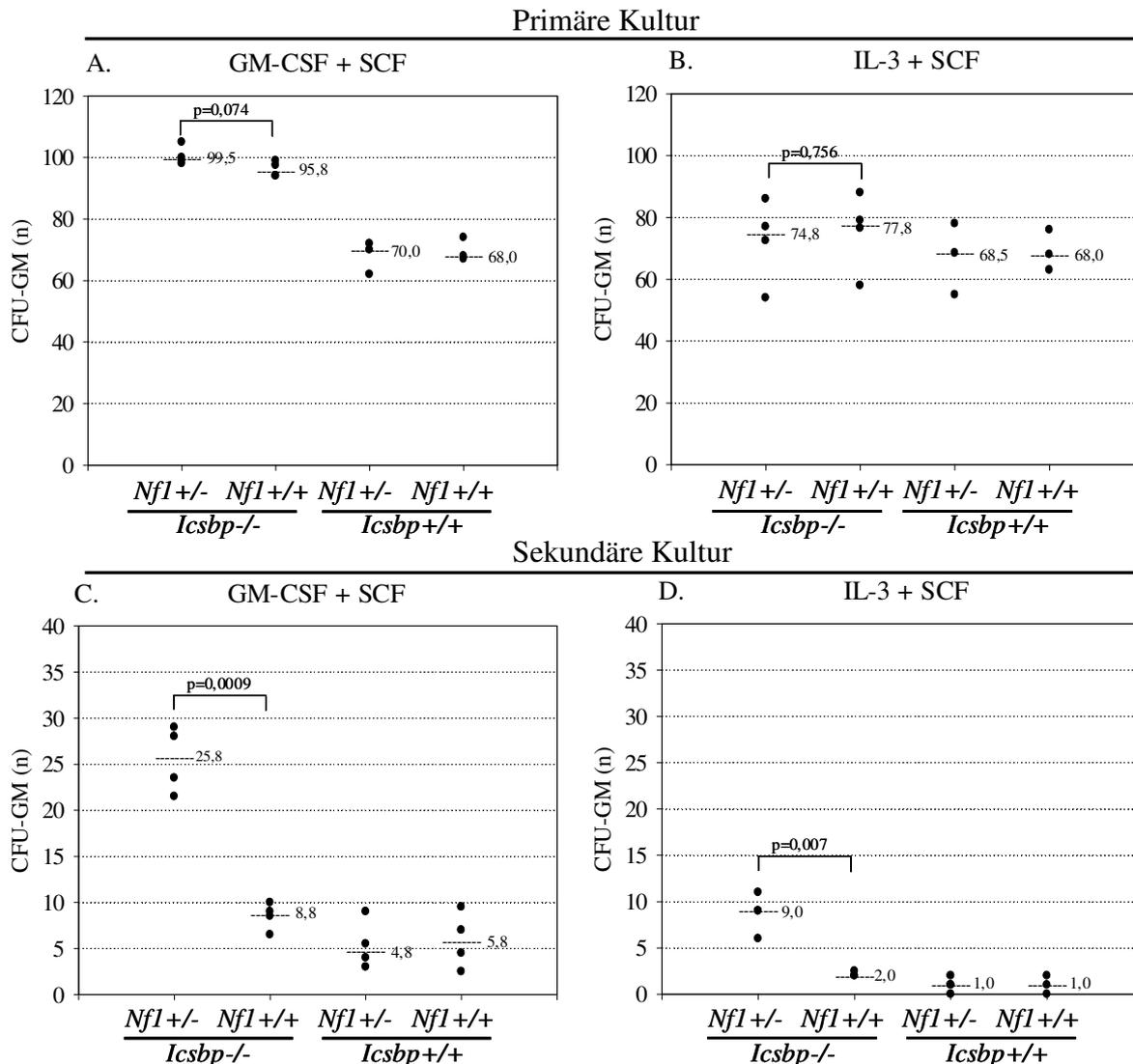
#### **5.II.2.8. Höchste CFU-GM Kolonienanzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>-Knochenmarkzellen**

Wie gezeigt konnte eine tendenzielle Erhöhung der G2/M- und S-Phasen, nicht aber ein signifikanter Unterschiede im Proliferationsverhalten insgesamt zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Knochenmark- bzw. Milzzellen beobachtet werden, obgleich eine erhöhte Anzahl von Leukozyten bzw. Granulozyten in der Milz, im peripheren Blut und in den Lymphknoten zu verzeichnen war.

Möglich ist, dass die gesteigerte Myelopoese in den prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen auf einer erhöhten Proliferationsrate einer geringzahligen (Vorläufer-) Zellpopulation beruht und daher, bei Analyse des Gesamtzellmaterials aus Knochenmark bzw. Milz, keine statistisch signifikanten Unterschiede determiniert werden konnten.

Die Untersuchung des Wachstums von Methylcellulose-Kolonien in CFU-Assays („colony forming unit“-Assays) ist ein geeignetes Instrument zur Bestimmung des Proliferationspotentials einer zahlenmäßig kleinen Vorläuferzellpopulation. Über die Anzahl an CFU-Kolonien (jeweils bestehend aus mindestens 50 meist differenzierten Zellen) können Rückschlüsse auf die Anzahl und das Proliferationsverhalten bestimmter, undifferenzierter Vorläuferzellen gezogen werden.

Im weiteren wurden demnach Knochenmarkzell-Suspensionen hergestellt, Zellen in definierter Anzahl und unter Zugabe von Zytokinen (5 U/ml GM-CSF bzw. IL-3 mit 20 ng/ml SCF, siehe 5.II.2.7) in Methylcellulose (MC) ausplattiert und die CFU-GM (CFU aus granulozytären und monozytären Zellen) Kolonienanzahl bestimmt.



**Abbildung 25: Höchste CFU-GM Kolonienanzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Knochenmarkszellen.** CFU-Assay mit Knochenmarkszellen (Mäuse 2,5-4 Monate alt) unter Stimulation mit Zytokinen (5 U/ml mGM-CSF; 5 U/ml mL-3; 20 ng/ml rSCF). A) und B) primäre Kultur:  $3,3 \times 10^4$  Zellen pro MC-Platte, Zytokine wie angegeben. Dargestellt ist die Gesamt-CFU-GM Kolonienanzahl pro MC-Platte, gezählt am Tag 7 nach der Plattierung (n). Eine Kolonie besteht hierbei mindestens aus 50 Einzelzellen. N=3-4 (Zellen je von 2 Mäusen gepoolt). C) und D) Sekundäre Kultur: Zellen von der primären Kultur wurden am Tag 7 von den MC-Platten heruntergewaschen, gezählt, und in einer Zellzahl von  $3,3 \times 10^4$  Zellen pro MC-Platte erneut plattiert. Zytokine wie angegeben. Die Gesamt-CFU-GM Kolonienanzahl wurde am Tag 10 nach der Plattierung ermittelt (n). N=3-4 (Zellen je von 2 Mäusen gepoolt). MC=Methylcellulose. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

In der primären Kultur bestätigte sich, unter Stimulation mit GM-CSF und SCF, eine erhöhte CFU-GM Anzahl aus Knochenmarkszellen von *Icsbp*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu der CFU-GM Anzahl aus Knochenmarkszellen von *Icsbp*<sup>+/+</sup> Mäusen (Scheller et al., 1999) (bestätigt in Abbildung 25A).

Hingegen war, bei Stimulation mit den Zytokinen IL-3 in Kombination mit SCF, die CFU-GM Anzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen zu der CFU-GM Anzahl aus *Icsbp*<sup>+/+</sup> Knochenmarkzellen nicht signifikant erhöht (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,428) (Abbildung 25B).

Nf1-Haploinsuffizienz allein führte nicht zu einer Zunahme der CFU-GM Anzahl (Vergleich *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> zu *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,682 GM-CSF und SCF bzw. p=0,826 IL-3 und SCF) (Abbildung 25A und 25B).

In der primären Kultur zeigte, bei *Icsbp*-Defizienz, eine zusätzliche Nf1-Haploinsuffizienz keine Auswirkungen auf die CFU-GM Anzahl. Weder unter Stimulation mit GM-CSF und SCF noch unter Zugabe von IL-3 und SCF war die CFU-GM Anzahl zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> signifikant erhöht (p=0,074 GM-CSF und SCF bzw. p=0,756 IL-3 und SCF) (Abbildung 25A und 25B).

In der primären Kultur zeigten sich demnach keine erhöhten CFU-GM Kolonienzahlen für die stimulierten Knochenmarkzellen aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen. Möglicherweise liegt daher die Ursache für die gesteigerte Myelopoese nicht in einer erhöhten Proliferationsrate sondern in einem erhöhten Selbsterneuerungspotential und/oder einer reduzierten Apoptoserate der Zellen. Beides würde sich vermutlich in einer längeren Kultivierbarkeit der Zellen darstellen. Denkbar ist jedoch auch, dass für die erhöhten *Icsbp*<sup>-/-</sup> CFU-GM Zahlen der primären Kultur andere Progenitoren verantwortlich sind als für das Ausbilden der gesteigerten Myelopoese in den prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen und somit die *Icsbp*<sup>-/-</sup> bedingte GM-CSF Hypersensitivität (Scheller et al., 1999) unter primären Kulturbedingungen das Koloniebildungsvermögen dieser speziellen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Progenitor-Population überdeckt. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden die Zellen der primären Kultur von den MC-Platten heruntergewaschen und in definierter Anzahl unter Zytokin-Stimulation erneut, als sekundäre Kultur, ausgesät (Abbildung 25C und 25D).

In der sekundären Kultur war die CFU-GM Kolonienanzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen nicht erhöht zu der Anzahl der CFU-GM aus *Icsbp*<sup>+/+</sup> Knochenmarkzellen (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,189 GM-CSF und SCF bzw. p=0,173 IL-3 und SCF) (Abbildung 25C und 25D). D.h. der Proliferationsvorteil basierend allein auf der *Icsbp*-Defizienz zeigt sich nicht mehr unter sekundären Kulturbedingungen.

Wie in der primären Kultur bestand auch in der sekundären Kultur kein Unterschied in der CFU-GM Anzahl zwischen *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> (p=0,811 GM-CSF und SCF bzw. p=1,0 IL-3 und SCF) (Abbildung 25C und 25D).

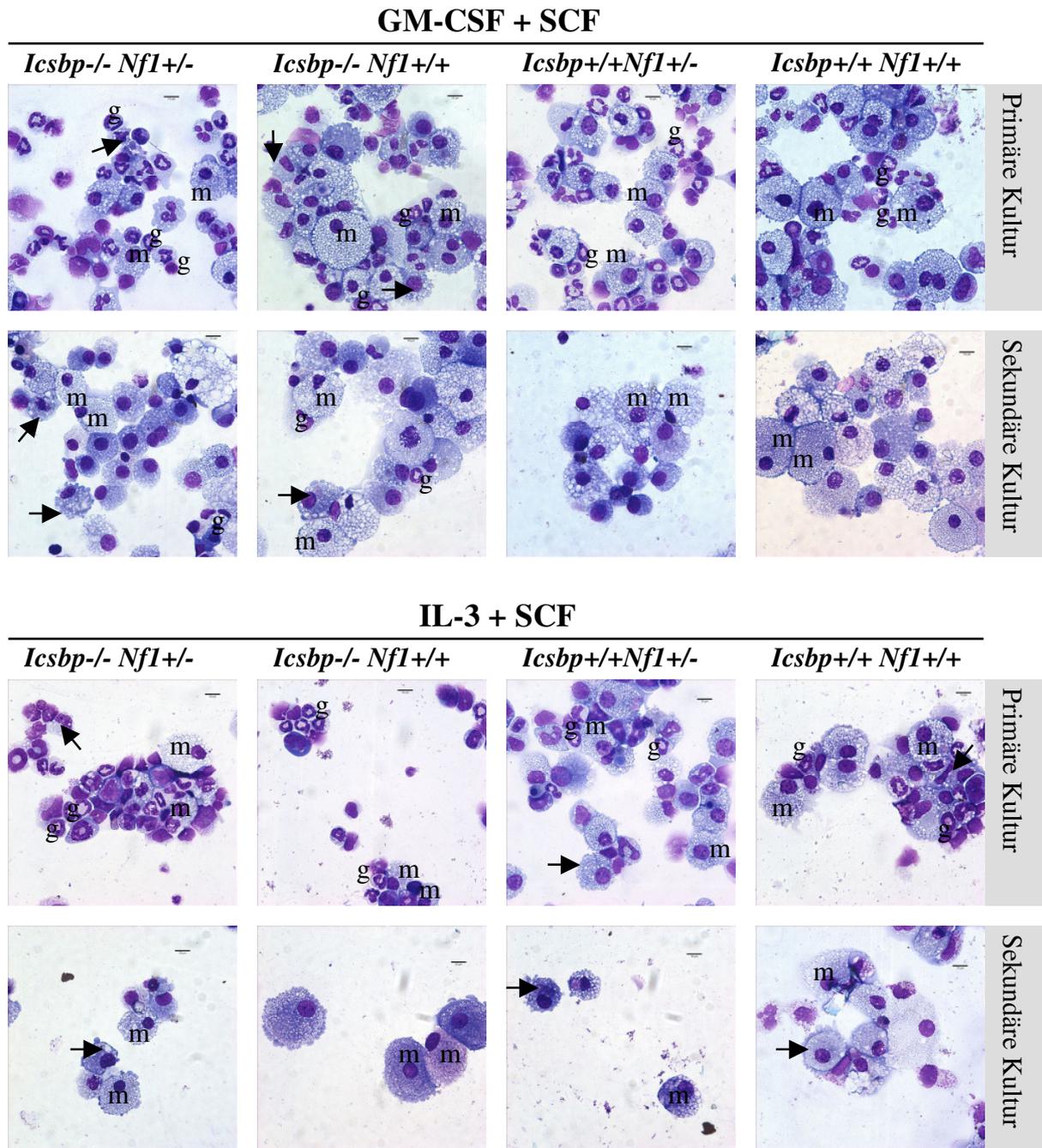
In der sekundären Kultur zeigte sich jedoch ein Effekt der zusätzlichen Nf1-Haploinsuffizienz auf dem *Icsbp*<sup>-/-</sup> Hintergrund. Sowohl unter Stimulation mit GM-CSF und SCF als auch unter der Zytokinkombination IL-3 mit SCF zeigt sich eine zu der CFU-GM Anzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup> *Nf1*<sup>+/+</sup> signifikant erhöhte CFU-GM Kolonienanzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup> *Nf1*<sup>+/-</sup> Knochenmarkzellen (p=0,0009 GM-CSF und SCF bzw. p=0,007 IL-3 und SCF) (Abbildung 25C und 25D). *Icsbp*<sup>-/-</sup> *Nf1*<sup>+/-</sup> Knochenmarkzellen beinhalten demnach das größte Potential (= höchste Anzahl an Vorläuferzellen z.B. durch geringer Apoptoserate, erhöhtes Selbsterneuerungspotential, höhere Überlebensrate) zur Bildung von sekundären CFU-GM Kolonien.

Um den Phänotyp der ausdifferenzierten, koloniebildenden Zellen sowie der vereinzelt, auf den MC-Platten befindlichen Zellen zu bestimmen und damit möglicherweise Rückschlüsse auf die für die erhöhte *Icsbp*<sup>-/-</sup> *Nf1*<sup>+/-</sup> CFU-GM Anzahl verantwortlichen Vorläuferzellen ziehen zu können, wurden die Zellen von den MC-Platten gewaschen, auf einen Objektträger zentrifugiert (Zytospin) und May-Grünwald-Giemsa gefärbt.

Bei den Zellen der primären Kultur handelte es sich, sowohl nach Stimulation mit GM-CSF und SCF als auch nach Zugabe von IL-3 und SCF, hauptsächlich um Makrophagen (Abbildung 26, m) und Granulozyten (Abbildung 26, g). Ein Unterschied zwischen den Genotypen war nicht zu erkennen. Zudem waren Zellen mit Einbuchtungen der äußeren Zellmembran und/oder „dendritischen“ Zellausläufern zu sehen (Abbildung 26, Pfeile).

Zellen der sekundären Kultur waren, unter beiden Zytokinkombinationen, überwiegend Makrophagen (Abbildung 26, m). Granulozyten waren nur noch vereinzelt vorhanden (Abbildung 26, g). Wiederum traten die Zellen mit den Einbuchtungen der äußeren Zellmembran und/oder „dendritischen“ Zellausläufern auf (Abbildung 26, Pfeile).

Die gesuchten Vorläuferzellen entwickeln sich somit, unter Stimulation mit o.g. Zytokinen, vermutlich in myeloische Zellen mit Tendenzen zu monozytären Zellformen.

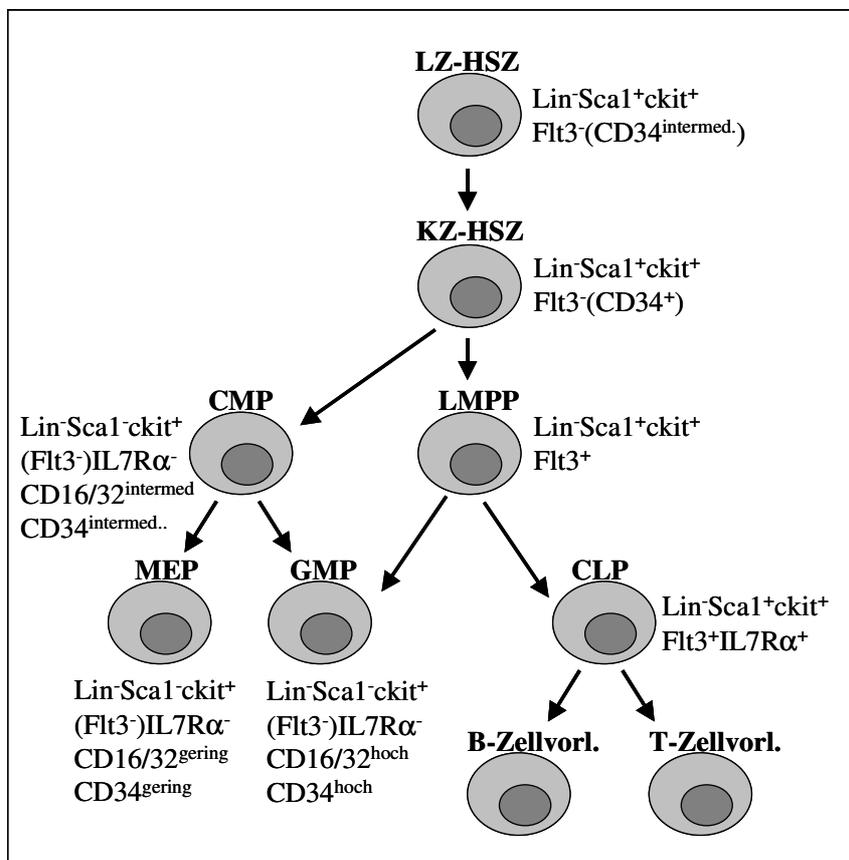


**Abbildung 26: Zellen der sekundären Kultur sind hauptsächlich Makrophagen. Zudem zeigen sich Zellen mit „dendritischen“ Zellausläufern.** Die Zellen aus der primären bzw. der sekundären Kultur wurden von den MC-Platten gewaschen und Zytospins hergestellt. Diese wurden May-Grünwald-Giemsa gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Primäre Kultur: Tag 7 nach Plattierung. Sekundäre Kultur: Tag 10 nach Plattierung. Vergrößerung: 1:1000. m= Makrophagen; g= Granulozyten, Pfeile= Zellen mit Zelleinbuchtungen und/oder „dendritischen“ Zellausläufern (exemplarisch bezeichnet).

### 5.II.2.9. Gleichverteilung der hämatopoetischen Progenitor-Populationen zwischen *Icsbp*<sup>-/-Nf1</sup><sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-Nf1</sup><sup>+/+</sup> Mäusen

Die erhöhte CFU-GM Kolonienanzahl aus *Icsbp*<sup>-/-Nf1</sup><sup>+/-</sup> Knochenmarkszellen respektive die gesteigerte Myelopoese sind vermutlich auf eine bislang un spezifizierte Vorläuferzellpopulation, mit Potential zur Differenzierung in myeloische Zellen, zurückzuführen.

Im Knochenmark von Mäusen existieren eine Vielzahl von hämatopoetischen Progenitor-Populationen (z.B. CMPs, LMPPs und GMPs), die sich in myeloische Zellformen weiterentwickeln können und daher als gesuchte Vorläuferzellpopulation in Frage kommen (Abbildung 27, detaillierte Ausführungen zur Entwicklung der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark finden sich in der Abbildungsbeschriftung).



**Abbildung 27: Modell zur Entwicklung der hämatopoetischer Zellen im Knochenmark.** Die frühesten hämatopoetischen, multipotenten Progenitoren im Knochenmark sind die Langzeit-hämatopoetischen Stammzellen (LZ-HSZ), aus denen die weiterhin multipotenten Kurzzeit(KZ)-HSZ entstehen. Diese entwickeln sich zum einen zu den oligopotenten CMPs („common myeloid progenitors“), die dann die MEPs (Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren) oder GMPs (Granulozyten-Makrophagen Progenitoren) ausbilden. Zum anderen gehen aus den KZ-HSZ die LMPPs („lymphoid primed multipotent progenitors“) hervor. Diese multipotenten LMPPs können sich zu Vorläufern der lymphatischen Zellentwicklung, den CLPs („common lymphoid progenitors“) aber auch zu GMPs, also Vorläufern der myeloischen Zellentwicklung, entwickeln. Aus den CLPs gehen die Vorläufer der B- bzw. T-Zellen hervor. Die zur FACS-Analyse der Progenitor-Populationen verwendeten Zellmarker sind angegeben. (Marker geklammert): nicht zur FACS-Analyse verwandt. Modell modifiziert nach (Adolfsson et al., 2005). FACS-Färbungen modifiziert nach (Kondo et al., 2003; Adolfsson et al., 2005).

Mit den folgenden FACS-Analysen sollte demnach die Progenitor-Population identifiziert werden, die bei den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen, aufgrund der Kombination von *Icsbp*-Defizienz und zusätzlicher *Nf1*-Haploinsuffizienz, dereguliert ist und daher vermehrt vorkommt.

Daher wurden zunächst, mittels MACS-Technologie, Linien-Marker negative (*Lin*<sup>-</sup>) Knochenmarkszellen isoliert, diese *Lin*<sup>-</sup> Zellen dann jeweils spezifisch für die zu betrachtende Vorläuferzellpopulation mit monoklonalen Antikörpern angefärbt (Färbungen beschrieben in Abbildung 27 und 28) und im FACS ausgewertet.

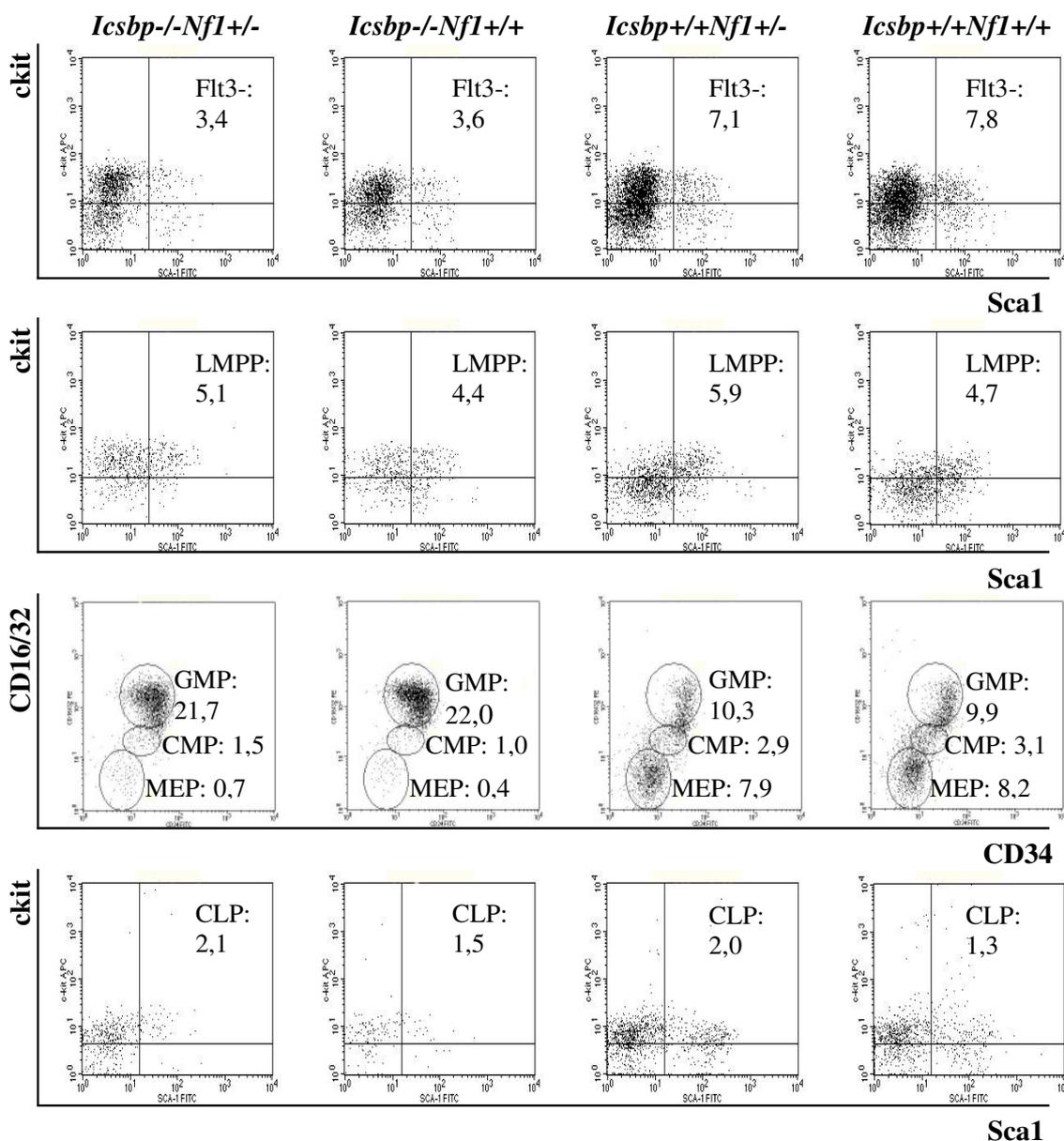


Abbildung 28: Gleichverteilung der hämatopoetischen Progenitor-Populationen zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen. s. Seite 88.

**Abbildung 28: Gleichverteilung der hämatopoetischen Progenitor-Populationen zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen.** Knochenmarkzellen aus 2,5-3 Monate alten Mäusen wurden mittels MACS-Technologie Linien-depletiert. Die Lin<sup>-</sup> Zellen wurden mit monoklonalen Antikörpern zellspezifisch gefärbt und per FACS analysiert. Flt3<sup>-</sup> Population (umfasst die LZ-HSZ und KZ-HSZ): Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>; LMPPs: Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>; CMPs: Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>IL7Rα<sup>-</sup>CD16/32<sup>intermed.</sup>CD34<sup>intermed.</sup>; GMPs: Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>IL7Rα<sup>-</sup>CD16/32<sup>hoch</sup>CD34<sup>hoch</sup>; MEPs: Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>IL7Rα<sup>-</sup>CD16/32<sup>gering</sup>CD34<sup>gering</sup>; CLPs: Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>ckit<sup>+</sup>IL7Rα<sup>+</sup>. Färbungen verändert nach (Kondo et al., 2003; Adolfsson et al., 2005). Daten: % Anteil gatedeter Zellen kalkuliert über den Anteil Lin<sup>-</sup> Zellen. N=3 (N=2 für die CLPs). Angegeben ist jeweils der Mittelwert.

Beim Vergleich der Progenitor-Populationen aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen mit denen aus *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen, zeigten sich, allein basierend auf der *Icsbp*-Defizienz, deutliche Unterschiede: Der Anteil der LZ-HSZ- und KZ-HSZ-Populationen (in Abbildung 28 zusammengefasst als Flt3<sup>-</sup> Population) war in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen deutlich reduziert (Mittelwerte: 3,6 zu 7,8). Zudem war sowohl die CMP-Population (Mittelwerte: 1,0 zu 3,1) als auch die MEP-Population (Mittelwerte: 0,4 zu 8,2) unter *Icsbp*-Defizienz verringert. Bei den LMPPs und den CLPs fanden sich keine Unterschiede. Die GMP-Population war, wie publiziert (Terszowski et al., 2005), bei den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen stark vergrößert (Mittelwerte: 22,0 zu 9,9, Abbildung 28).

Bzgl. der Verteilung der Vorläuferzellpopulationen fanden sich zwischen *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen keine Unterschiede (Abbildung 28).

Entgegen der Vermutungen zeigten sich auch beim Vergleich der Vorläuferzellpopulationen von den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen keine Unterschiede (Abbildung 28).

Die zusätzliche Nf1-Haploinsuffizienz auf dem Hintergrund der *Icsbp*-Defizienz machte sich demnach nicht in der Verteilung der hier betrachteten Lin<sup>-</sup> hämatopoetischen Progenitor-Populationen bemerkbar.

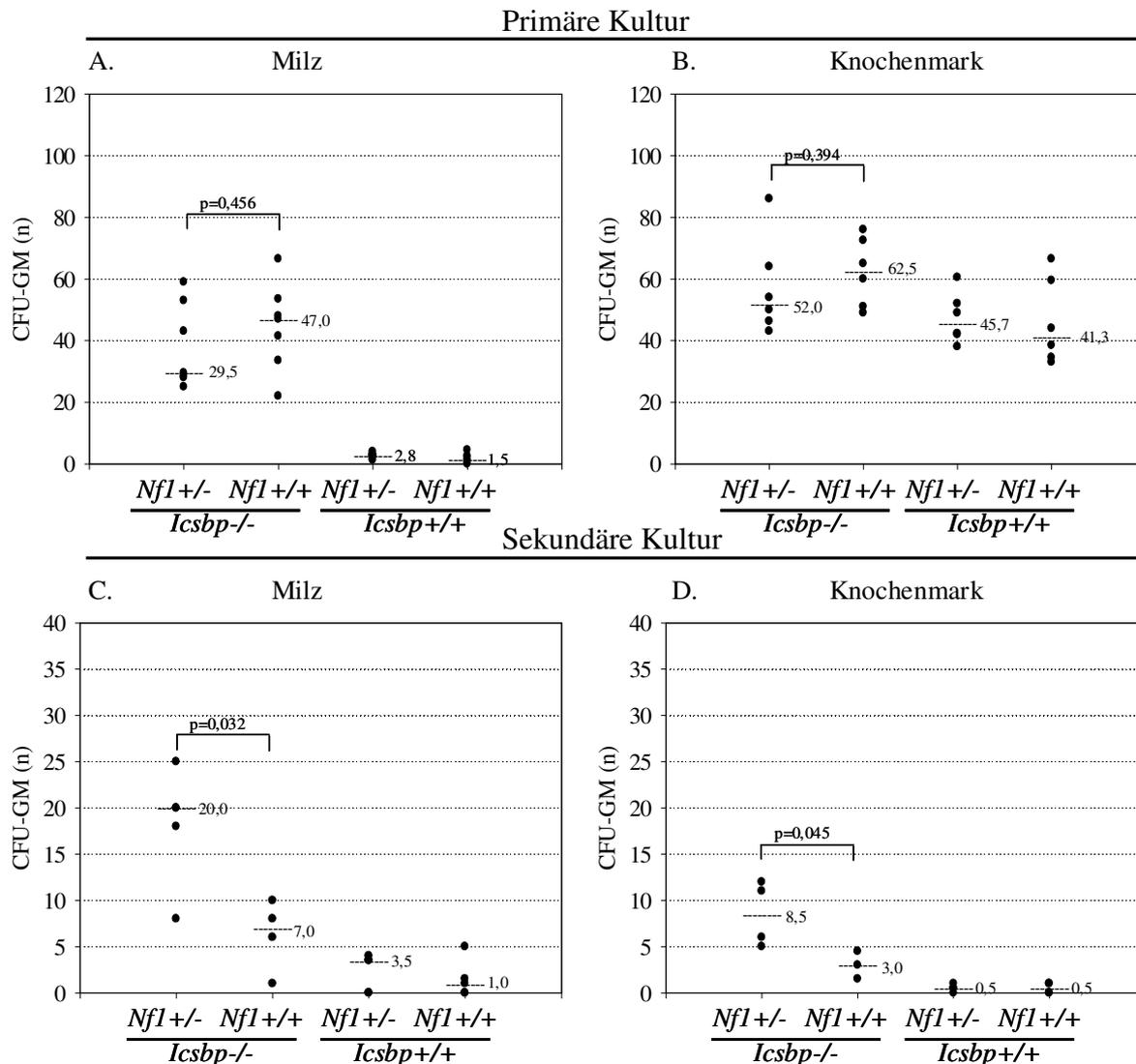
#### 5.II.2.10. Höchste CFU-GM Kolonienanzahl auch aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Milzzellen

Innerhalb der untersuchten hämatopoetischen Vorläuferzellpopulationen aus dem Knochenmark konnten keine Unterschiede zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen festgestellt werden. Es ist daher möglich, dass die gesteigerte Myelopoese in den prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen auf einer bislang nicht betrachteten, möglicherweise auch in der Peripherie existierenden, deregulierten Vorläuferzellpopulation basiert.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden daher CFU-Assays primärer und sekundärer Kultur auch mit Milzzellen, unter Stimulation mit GM-CSF, durchgeführt.

In der primären Kultur zeigte sich für die Milzzellen eine erhöhte CFU-GM Kolonienanzahl zwischen *Icsbp*<sup>-/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup> (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,001) (Abbildung 29A und 29B). Eine statistisch signifikante Erhöhung für die *Icsbp*<sup>-/-</sup> CFU-GM

Anzahl aus Knochenmarkszellen wurde jedoch, aufgrund der großen Varianz der *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Werte, nicht beobachtet (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p=0,065$ ) (Abbildung 29A und 29B).



**Abbildung 29: Höchste CFU-GM Kolonienanzahl auch aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Milzzellen.** CFU-Assay mit Knochenmark- und Milzzellen (Mäuse 2,5-4 Monate alt) unter Stimulation mit mGM-CSF (5U/ml). A) und B) primäre Kultur:  $3,3 \times 10^4$  Zellen pro MC-Platte. Dargestellt ist die Gesamt-CFU-GM Kolonienanzahl pro MC-Platte, gezählt am Tag 7 nach der Plattierung (n). Eine Kolonie besteht hierbei mindestens aus 50 Einzelzellen. N=6-7 (unabhängige Ansätze; Zellen je von 2 Mäusen gepoolt). C) und D) Sekundäre Kultur: Zellen von der primären Kultur wurden am Tag 10 von den MC-Platten heruntergewaschen, gezählt, und in einer Zellzahl von  $3,3 \times 10^4$  Zellen pro MC-Platte erneut plattiert. Die Gesamt-CFU-GM Kolonienanzahl wurde am Tag 15-18 nach der Plattierung ermittelt (n). N=3-4 (unabhängige Ansätze; Zellen je von 2 Mäusen gepoolt). MC= Methylcellulose. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

In der sekundären Kultur war die CFU-GM Anzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup> Milz- bzw. Knochenmarkzellen zu der CFU-GM Kolonienzahl aus *Icsbp*<sup>+/+</sup> Zellen erhöht (Median: 20,0 zu 7,0 Milz bzw. Median: 8,5 zu 3,0 Knochenmark). Es bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,063 Milz bzw. p=0,089 Knochenmark) (Abbildung 29C und 29D).

Weder in der primären noch in der sekundären Kultur zeigte sich für *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Zellen aus der Milz bzw. dem Knochenmark eine zu *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> signifikant unterschiedliche CFU-GM Kolonienzahl (Vergleich: *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,165/0,841 Milz bzw. p=0,699/1,0 Knochenmark) (Abbildungen 29A bis 29D).

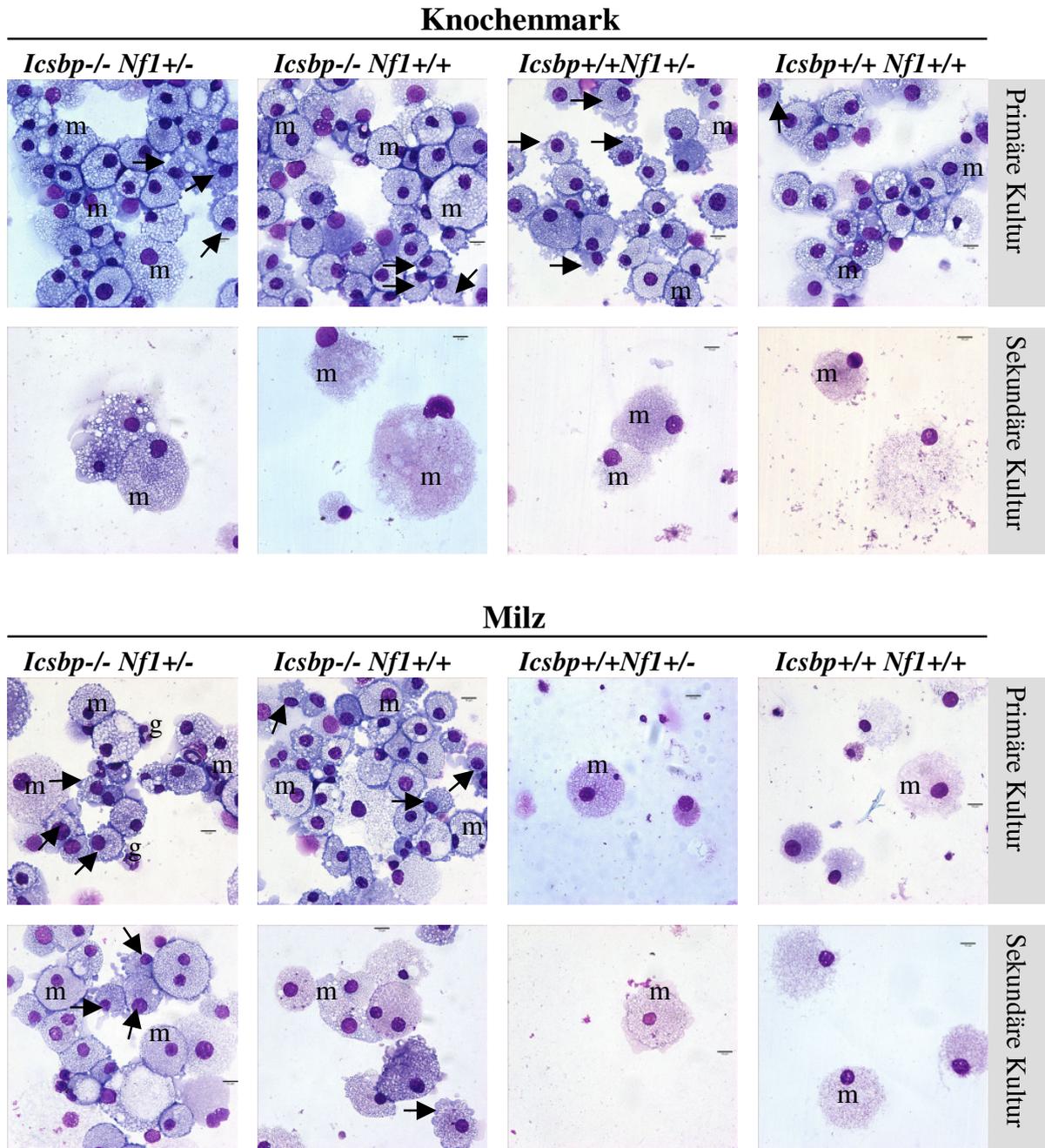
In der primären Kultur war die CFU-GM Anzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Milz- als auch Knochenmarkzellen zu der CFU-GM Anzahl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> vermindert (Median<sub>Milz</sub>: 29,5 zu 47,0; Median<sub>Knochenmark</sub>: 52,0 zu 62,5). Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,456 Milz bzw. p=0,394 Knochenmark) (Abbildung 29A und 29B).

In der sekundären Kultur der Zellen zeigten sich dann sowohl aus *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Knochenmark- als auch aus Milzzellen die höchste Anzahlen an CFU-GM Kolonien. Die *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> CFU-GM Kolonienzahlen aus Milz und Knochenmark waren demzufolge auch gegenüber den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> CFU-GM Zahlen signifikant erhöht (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,011 Milz bzw. p=0,045 Knochenmark) (Abbildung 29C und 29D).

Somit existieren die für die erhöhte CFU-GM Anzahl bzw. die gesteigerte Myelopoese in den prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen verantwortlichen Progenitoren im Knochenmark und auch in der Peripherie (Milz).

Nach dem Auszählen der CFU-GM Kolonien wurden erneut die Zellen von der Methylcellulose heruntergewaschen und auf Objektträger gebracht. Nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung wurde die Morphologie der Zellen begutachtet. Auffällig war, nach GM-CSF Stimulation (5 U/ml) differenzierten die Zellen fast ausschließlich zu Makrophagen (Abbildung 30, m). Zudem fanden sich, wie auch schon auf den Zytospins der ersten CFU-Assays (Abbildung 26, Pfeile), Zellen mit „dendritischen“ Zellausläufern und Einbuchtungen der äußeren Zellmembran (Abbildung 30, Pfeile). Ein Unterschied in Abhängigkeit vom Genotypen, dem Ursprung der Zellen (Knochenmark bzw. Milz) und der Phase der Plattierung (primäre bzw. sekundäre Kultur) war nicht zu erkennen.

Die gesuchten Vorläuferzellen entwickeln sich demnach, auch unter Stimulation mit GM-CSF, vermutlich in myeloische Zellen bzw. monozytäre Zellformen.



**Abbildung 30: Auch Milzzellen aus CFU-Assays zeigen hauptsächlich Makrophagen-Morphologie. Erneut finden sich Zellen mit „dendritischen“ Zellausläufern.** Die Zellen aus der primären bzw. sekundären Kultur wurden von den MC-Platten gewaschen und Zytospins hergestellt. Diese wurden May-Grünwald-Giemsa gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Primäre Kultur: Tag 7 nach Plattierung. Sekundäre Kultur: Tag 15-18 nach Plattierung. Vergrößerung: 1:1000. m= Makrophagen; g= Granulozyten, Pfeile= Zellen mit Zelleinbuchtungen und/oder „dendritischen“ Zellausläufern (exemplarisch bezeichnet).

### **5.II.2.11. Myeloische Suppressor Zellen treten in *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen**

#### **nicht vermehrt auf**

Myeloische Suppressor Zellen (GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> Zellen) bilden eine heterogene Lin<sup>+</sup> Progenitor-Population, die sowohl im Knochenmark als auch der Peripherie (z.B. in der Milz) vorkommt (Bronte et al., 2000). Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl ist sehr gering und liegt bei <4 % in der Milz und im peripheren Blut von gesunden Mäusen (Bronte et al., 2000; Serafini et al., 2006).

Bei Mäusen mit gestörter Zytokin-Homöostase, bedingt z.B. durch Tumorwachstum (Bronte et al., 2000; Gabilovich et al., 2001; Pelaez et al., 2001) oder in Folge von Infektionen (Cauley et al., 2000; Terrazas et al., 2001), kann sich die Anzahl an GR1<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> Zellen erhöhen. Sie akkumulieren dann in der Peripherie. Abhängig vom Zytokin-Stimulus ist die Wirkung auf das Immunsystem: aus den GR1<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> Progenitorzellen können inhibitorische Makrophagen oder dendritische (Vorläufer-)Zellen differenzieren, welche die Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten inhibieren respektive stimulieren (Bronte et al., 2000; Serafini et al., 2006)

Von in vitro Versuchen ist bekannt, dass diese GR1<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> Zellen 4 Wochen und länger in der Zellkultur gehalten werden können und in Methylcellulose CFU-Kolonien ausbilden (Bronte et al., 2000; Melani et al., 2003).

Damit entspricht diese Vorläuferzellpopulation mit einigen ihrer Eigenschaften der hier gesuchten Progenitor-Population.

In Folge wurde daher der Anteil an GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> myeloischen Suppressor Zellen in primären Knochenmark- bzw. Milzzellen und in den Zellen aus der primären und sekundären Kultur durchflusszytometrisch untersucht.

Die Ergebnisse aus den Knochenmarkzellen zeigten für die *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse und die Mäuse der Kontrollgruppen keine Unterschiede in der Verteilung der myeloischen Suppressor Zellen (Abbildung 31). D.h. weder die *Icsbp*-Defizienz, noch *Nf1*-Haploinsuffizienz, noch die Kombination dieser beiden Defizienzen hatten maßgeblichen Einfluss auf die Anzahl der GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> myeloischen Suppressor Zellen. Dies wurde in primären Knochenmarkzellen und in Zellen aus der primären und sekundären Kultur aus CFU-Assays nachgewiesen (Abbildung 31).

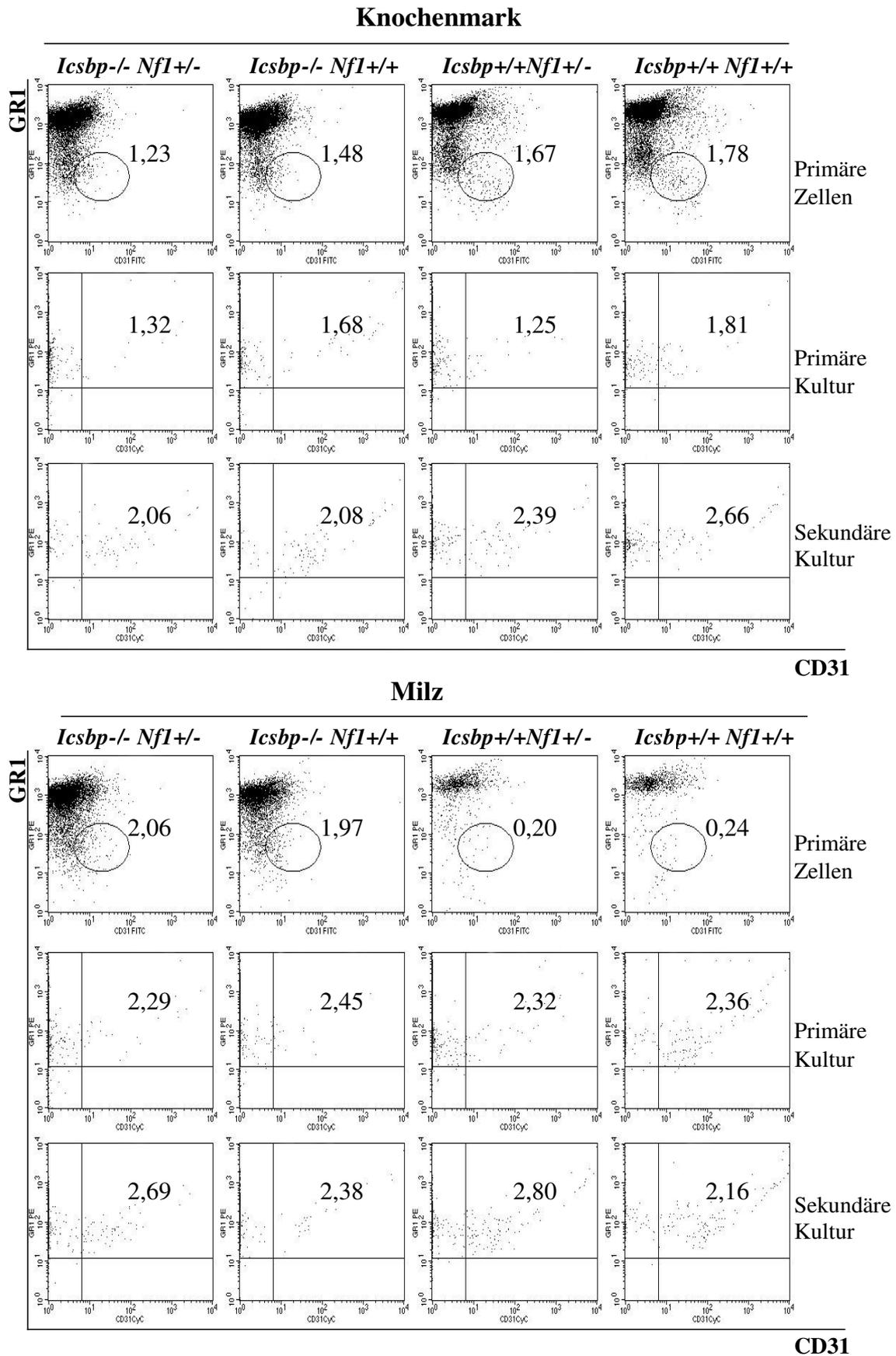


Abbildung 31: Myeloische Suppressor Zellen liegen nicht vermehrt im Knochenmark oder in der Milz von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen vor : s. Seite 94.

**Abbildung 31: Myeloische Suppressor Zellen liegen nicht vermehrt im Knochenmark oder in der Milz von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen vor.** FACS-Analyse von GR1<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> myeloischen Suppressor Zellen in primären Knochenmark- und Milzzellen und in den Zellsuspensionen aus der primären und sekundären Kultur der CFU-Assays. Mäuse: 2,5-4 Monate alt. N=3-4. CFU: 5U/ml GM-CSF, Tag 10-11 primäre Kultur, Tag 15-18 sekundäre Kultur. Daten: % Anteil GR1<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> Zellen. In den Dotblots sind die Zellen auf CD11b<sup>+</sup> gated. Die angegebenen Prozentzahlen bezeichnen den Anteil vitaler GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> Zellen. Angegeben ist der jeweilige Mittelwert.

In den primären Milzzellen von *Icsbp*-defizienten Mäusen war die Anzahl an GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> myeloischen Suppressor Zellen signifikant erhöht (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,029). Zusätzliche *Nf1*-Haploinsuffizienz erhöhte jedoch die Anzahl nicht weiter (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=1,0) (Abbildung 31). Für die Milzzellen aus der primären bzw. sekundären Kultur besteht bzgl. dem Anteil an GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> myeloischen Suppressor Zellen kein Unterschied unterhalb der Genotypen (Abbildung 31).

Damit ist die gesteigerte Myelopoese in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen nicht auf die GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> myeloische Suppressor Zellpopulation zurückzuführen.

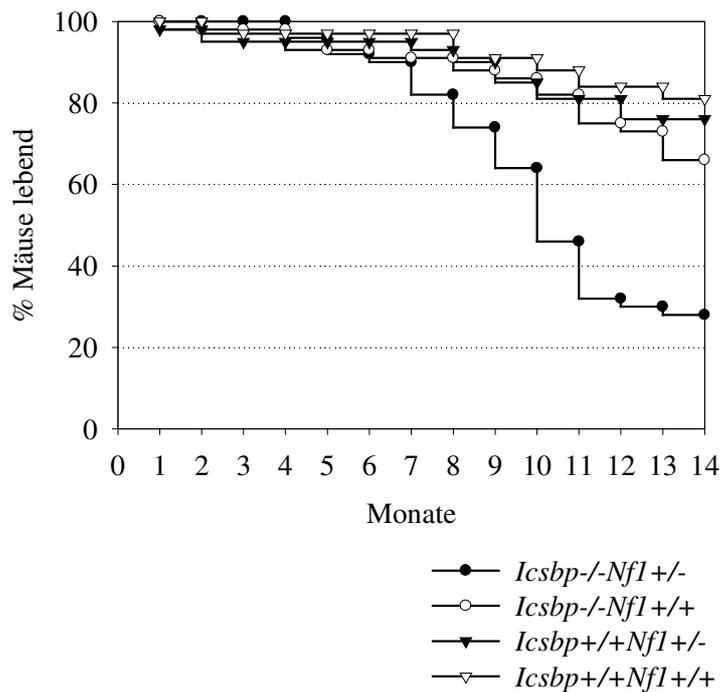
### 5.II.3. Leukämischer Phänotyp: Ausbilden von myeloischen Leukämien

#### 5.II.3.1. *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse sterben früher

Bisherige Ergebnisse zeigten eine gesteigerte Myelopoese, mit erhöhter Anzahl an Granulozyten in den Lymphknoten und im peripheren Blut und verstärkter Infiltration der Milz mit Leukozyten, in den prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen.

Aus bisher ungeklärten Gründen führt eine chronische gesteigerte Myelopoese, z.B. eine CML, häufig zu einem Übergang in eine akute, tödlich verlaufende leukämische Erkrankung. Um zu untersuchen, ob sich auch in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen tödliche Erkrankungen z.B. akute Leukämien ausbilden, wurden zunächst Kaplan-Meier Überlebenskurven erstellt und deren Verläufe analysiert.

Zur Ermittlung der Kaplan-Meier Überlebenskurven der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>, *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>, *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse in vergleichbarer Anzahl gezüchtet und über einen Zeitverlauf von 14 Monaten deren Todeszeitpunkt dokumentiert.



**Abbildung 32: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> sterben früher.** Vorzeitiger Abfall der Kaplan-Meier Überlebenskurve der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse. Nach 11 Monaten lebten nur noch 46% der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse im Vergleich zu mehr als 80% überlebender Mäuse in den Kontrollgruppen. N= 50 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse, N= 56 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse, N= 41 *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse, N= 32 *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse

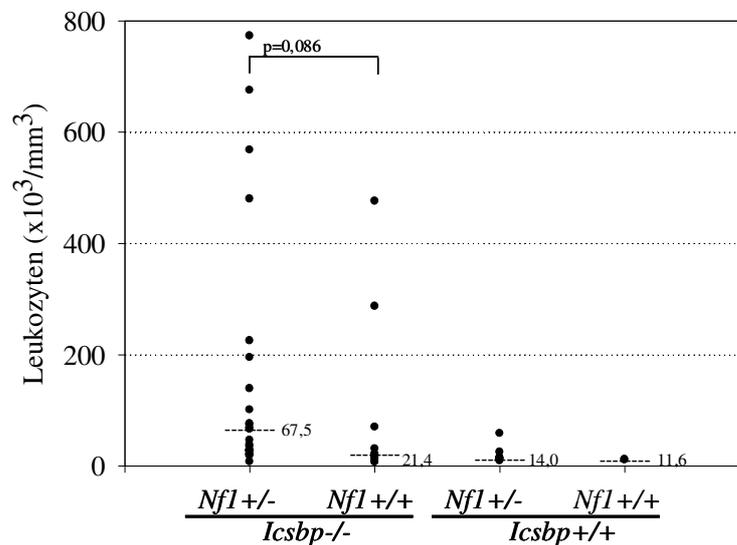
Aus den Beobachtungen ergab sich, die *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse sterben früher (Abbildung 32). Ab dem 8. Monat kam es zu einer Übersterblichkeit der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse. Nach 11 Monaten lebten noch 46% der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse im Vergleich zu mehr als 80% lebender *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>, *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> bzw. *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen. Nach 14 Monaten war die Anzahl der überlebenden Mäuse weiter gesunken. Es überlebten diesen Zeitpunkt nur 28% der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse im Vergleich zu 66% *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>, 76% *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und 81% lebender *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen (Abbildung 32).

### 5.II.3.2. Zunahme peripherer Leukozyten im Blut erkrankter *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse

Wie gezeigt, war die Anzahl der peripheren Leukozyten bereits im Blut junger prä-leukämischer *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse gegenüber den Kontrollgruppen erhöht (Abbildung 15 S. 68).

Zur Etablierung einer möglichen hämatopoetischen Ursache (z.B. das Ausbilden von akuten leukämischen Erkrankungen) für die Übersterblichkeit der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse wurden daher Mäusen mit schweren, terminalen Krankheitssymptomen (im weiteren als erkrankte Mäuse bezeichnet) - z.B. geschwollene submandibuläre Lymphknoten, aufgedunsener Bauch,

anhaltende Diarrhö, Dehydration, struppiges Fell, hervorquellende Augen, reduziertes Allgemeinbefinden, - peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen und dies mit einem automatischen Blutzählgerät auf den Gehalt an peripheren Leukozyten analysiert.



**Abbildung 33: Höchste Leukozytenzahl im peripheren Blut erkrankter *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse.** Den Mäusen wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Gesamtzahl an Leukozyten mit einem automatischen Blutzählgerät gemessen. N=26 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse, N=9 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse, N=8 *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse, N=2 *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlerte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Wie schon vor dem Auftreten der Erkrankungen zeigte sich auch hier der Einfluss der *Icsbp*-Defizienz auf die Leukozytenzahl. Die Leukozytenzahl der erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (Median: 21,4) war gegenüber der Leukozytenzahl der erkrankten *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (Median: 11,6) erhöht (Abbildung 33). Der Unterschied erreichte jedoch, vermutlich aufgrund der großen Streuung der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Werte und zudem der geringen Inzidenz bei *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen (N=2), keine statistische Signifikanz (p=0,145).

Sowie bei den prä-leukämischen Mäusen unterschied sich auch bei den erkrankten Tieren die Leukozytenzahl der *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse nicht von der Leukozytenzahl der *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (p=0,178) (Abbildung 33).

Die höchste Leukozytenzahl wiesen die erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse auf (Median: 67,5). Die Leukozytenzahl der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse war demzufolge auch gegenüber der Leukozytenzahl der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse erhöht (Median *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>: 67,5 zu Median *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: 21,4), eine statistische Signifikanz zeigte sich, aufgrund der großen Streuung der Werte, nicht (p=0,086).

Das Ausbilden von Leukämien geht oftmals mit einer drastischen Zunahme der peripheren Leukozyten einher. Daher wurden die Leukozytenzahlen (die Medianwerte) der älteren, prä-leukämischen Mäuse mit den Leukozytenzahlen der erkrankten Mäuse verglichen (Tabelle 2). Es fand sich keine Zunahme der Leukozytenzahl für die erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (Median<sub>ältere</sub>: 23,1 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 21,4), für die erkrankten *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse (Median<sub>ältere</sub>: 12,1 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 14,0) und für die erkrankten *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (Median<sub>ältere</sub>: 11,6 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 11,6).

Die Leukozytenzahl der erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse (Median: 67,5) war jedoch zu der Leukozytenzahl der älteren prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (Median: 34,2) erhöht (Tabelle 2). Dies kann auf ein, gegenüber den anderen Genotypen, überproportionales Auftreten von akuten Leukämien in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen hindeuten.

**Tabelle 2.**

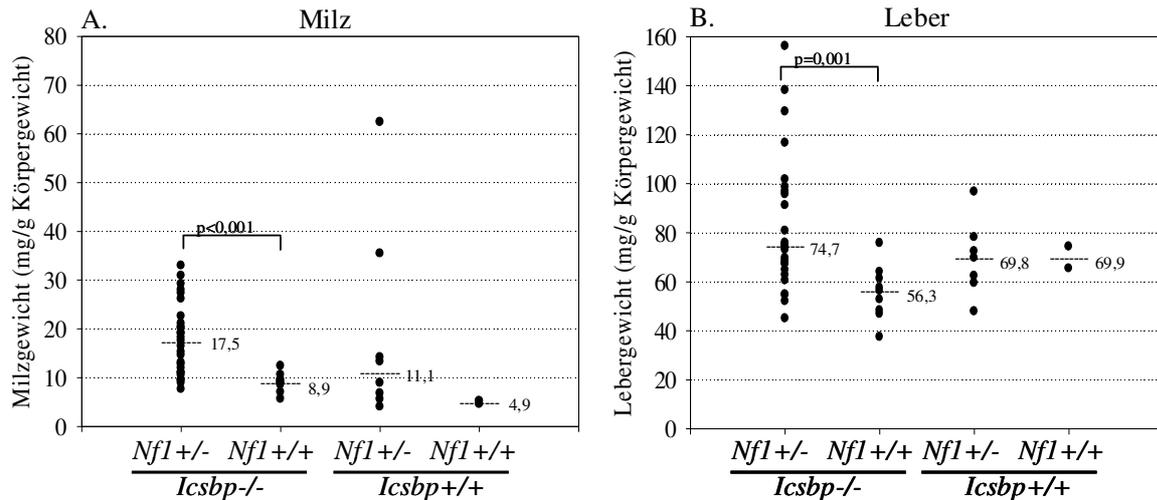
	Leukozytenzahl (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )		Milzgewicht (mg/g Körpergewicht)		Lebergewicht (mg/g Körpergewicht)	
	prä-leuk.	erkrankt	prä-leuk.	erkrankt	prä-leuk.	erkrankt
<i>Icsbp</i> <sup>-/-</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/-</sup>	34,2	67,5	13,8	17,5	64,6	74,7
<i>Icsbp</i> <sup>-/-</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/+</sup>	23,1	21,4	10,1	8,9	63,8	56,3
<i>Icsbp</i> <sup>+/+</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/-</sup>	12,1	14,0	4,1	11,1	60,8	69,8
<i>Icsbp</i> <sup>+/+</sup> <i>Nf1</i> <sup>+/+</sup>	11,6	11,6	3,4	4,9	60,7	69,9

**Tabelle 2: Erkrankte *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse haben eine zu den prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen erhöhte Leukozytenzahl und ein erhöhtes Milz- und Lebergewicht.** Angegeben sind die Medianwerte für die Leukozytenzahlen, die Milz- und die Lebergewichte. Prä-leuk. = prä-leukämisch (Werte der 7-9 Monate alten prä-leukämischen Mäuse). N-Zahlen wie in den korrespondierenden Abbildungen 15, 18, 22, 33, 34.

### 5.II.3.3. Zunahme des Milz- und Lebergewichtes bei den erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen

Die im peripheren Blut der erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen beobachtete, erhöhte Leukozytose ist möglicherweise begleitet von einer zusätzlich gesteigerten Infiltration der Milz und der Leber. Daher wurden auch bei den erkrankten, unselektierten Mäusen das Milz- und das Lebergewicht (in Relation zum Körpergewicht) bestimmt.

Wie schon für die prä-leukämischen Mäusen gezeigt, hatten auch die erkrankten *Icsbp*-defizienten Mäuse ein höheres Milzgewicht gegenüber den wildtypischen *Icsbp* Mäusen (Vergleich: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> mit *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>: p=0,036) (Abbildung 34A). Ein Unterschied in den Milzgewichten der erkrankten *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse und der erkrankten *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse wurde nicht beobachtet (p=0,178) (Abbildung 34A).

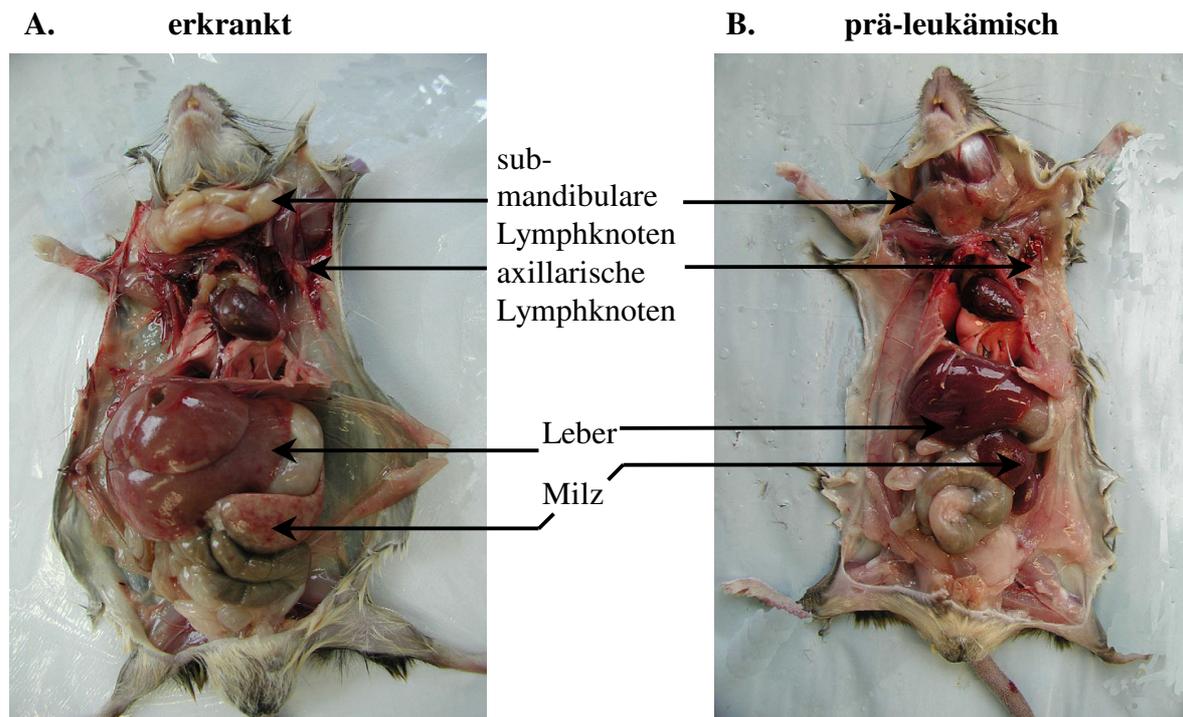


**Abbildung 34: Höchste Milz- und Lebergewichte auch bei den erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>-Mäusen.** Die Gewichte der erkrankten Mäuse und derer Milzen und Lebern wurde mit einer Präzisionswaage ermittelt. Die A) Milzgewichte bzw. b) Lebergewichte werden in mg/g Körpergewicht dargestellt. N=27 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>, N=9 *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>, N=8 *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup>, N= 2 *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse. Die Punkte bezeichnen einzelne Messwerte (Überlagerungen möglich). Angegeben ist der jeweilige Median (bezahlte Linie). Statistik: Mann-Whitney-U-Test.

Die höchsten Milzgewichte hatten die erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse. Sie waren demzufolge auch gegenüber den Milzgewichten der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse signifikant erhöht (Vergleich *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> mit *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup>:  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 34A).

Neben der gesteigerte Leukozytose kann, dadurch bedingt, eine gesteigerte Infiltration der (hämatopoetischen) Organe ein weiteres Indiz für das Ausbilden von Leukämien sein.

Beim Vergleich der Milz(median)gewichte der prä-leukämischen, älteren Mäusen mit den Werten der erkrankten Mäuse (Tabelle 2) ergab sich: Das Milzgewicht der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (Median<sub>ältere</sub>: 10,1 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 8,9). und der *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse (Median<sub>ältere</sub>: 3,4 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 4,9) änderte sich mit dem Auftreten von Erkrankungen nicht. Im Krankheitsfall stieg das Milzgewicht der *Icsbp*<sup>+/+</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse an (Median<sub>ältere</sub>: 4,1 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 11,1). Auch das Milzgewicht der erkrankten *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse war zu dem Milzgewicht der prä-leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse erhöht (Median<sub>ältere</sub>: 13,8 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 17,5) (Tabelle 2 und Abbildung 35).



**Abbildung 35: Vergrößerung der hämatopoetischen Organe bei erkrankten bzw. leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen.** Vergleich einer A) kranken/leukämischen mit einer B) prä-leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Maus. Die kranke/leukämische Maus zeigt eine deutliche Vergrößerung der Milz und der Leber. Beide Organe zeigen eindeutige Anzeichen für Infiltration mit Leukozyten (weiße Bereiche). Zudem sind die submandibulären und die axillaren Lymphknoten stark vergrößert.

Bezugnehmend auf die Lebergewichte gab es weder basierend auf der *Icsbp*-Defizienz ( $p=0,145$ ) noch auf der alleinigen *Nf1*-Haploinsuffizienz ( $p=0,889$ ) statistisch signifikante Unterschiede in den Lebergewichten der erkrankten Mäuse (Abbildung 34B).

Die höchsten Lebergewichte fanden sich, unter Kombination von *Icsbp*-Defizienz und *Nf1*-Haploinsuffizienz, bei den erkrankten *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen (Median: 74,7). Der Unterschied der Lebergewichte der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse zu den Lebergewichten der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäuse war signifikant ( $p=0,001$ ) (Abbildung 34B).

Beim Vergleich der Lebermediangewichte (Tabelle 2) zeigte sich, ausgenommen die erkrankten *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäuse, eine allgemeine Zunahme der Lebergewichte mit dem Ausbilden von Krankheiten. Auch die Lebergewichte der erkrankten *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse waren höher als die Lebergewichte der prä-leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse (Median<sub>ältere</sub>: 64,6 zu Median<sub>erkrankte</sub>: 74,7) (Tabelle 2 und Abbildung 35).

Somit war die Zunahme der Milzgewichte im Krankheitsstadium, z.B. bei den *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>*-Mäusen ein mögliches, weiteres Indiz für das Ausbilden von hämatopoetischen Erkrankungen als Ursache für die Übersterblichkeit. Aus der, im Krankheitsfall allgemeinen, genotyp-unabhängigen Vergrößerung der Leber ließen sich keine Rückschlüsse ziehen.

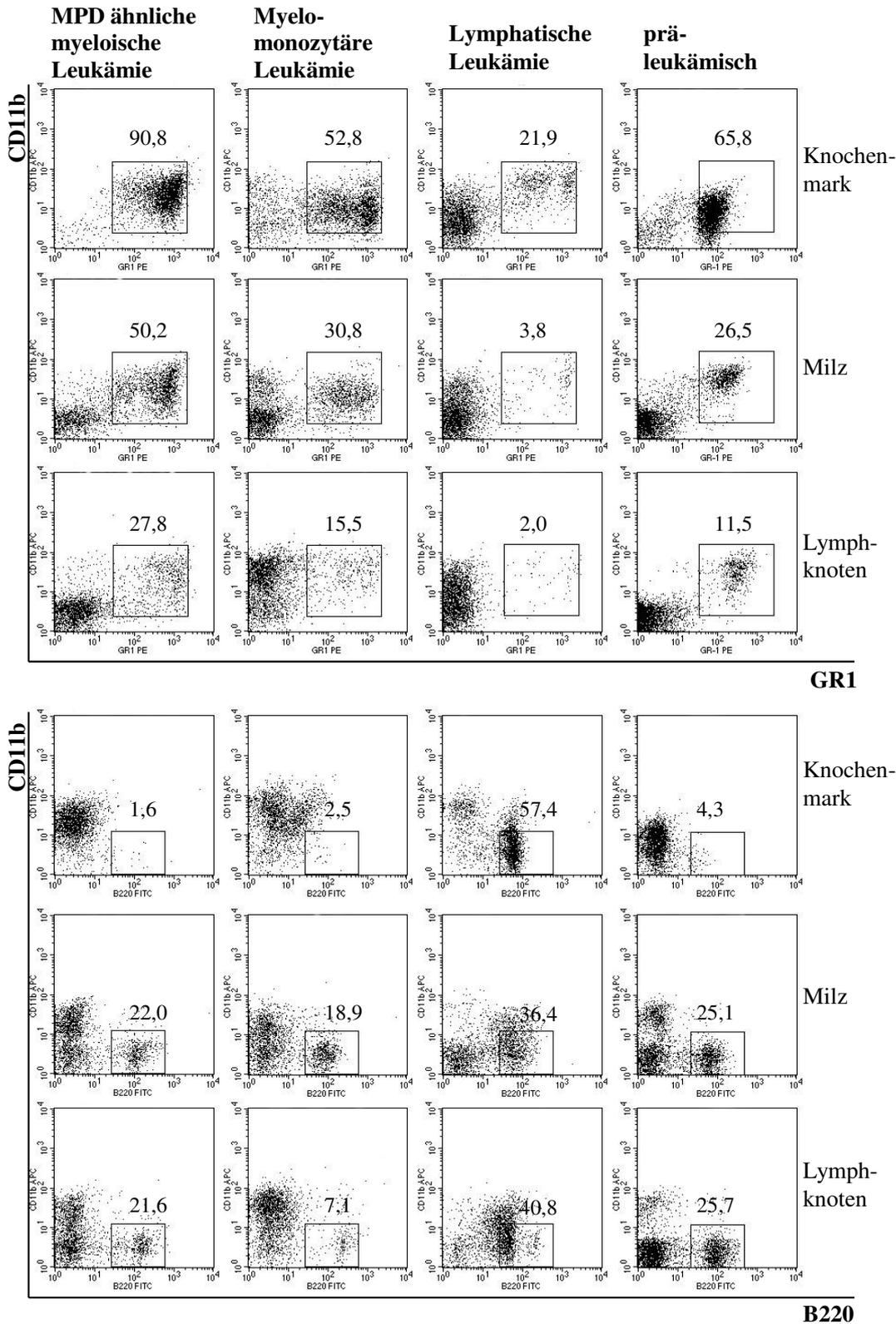
#### **5.II.3.4. *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>*- Mäuse bilden Leukämien aus**

Die gegenüber den prä-leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>*- Mäusen gesteigerte Leukozytose und verstärkte Infiltration der Milz in den schwer erkrankten *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>*- Mäusen waren mögliche erste Anzeichen für leukämische Erkrankungen. Zur genauen Diagnose wurden schließlich Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark, Milz und Lymphknoten hergestellt. Die Zellen wurden mit zellspezifischen Markern für Granulozyten (GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen) und B Lymphozyten (B220<sup>+</sup> Zellen) angefärbt, durchflusszytometrisch gemessen und die Verteilung der Zellpopulationen analysiert (Abbildung 36A). Zusätzlich wurden Zytospins von Knochenmarks- und Milzzellen angefertigt, May-Grünwald-Giemsa gefärbt und zur Diagnostik herangezogen. Dies ermöglichte eine Differenzierung der Leukämien nach Anzahl der Blasten und gab einen Überblick über die Verschiebungen in der Hämatopoese (Abbildung 36B). Zu diesem Zweck wurden auch Gewebeschnitte von Milz, Lymphknoten und Leber hergestellt, diese Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histopathologisch begutachtet (Abbildung 36C).

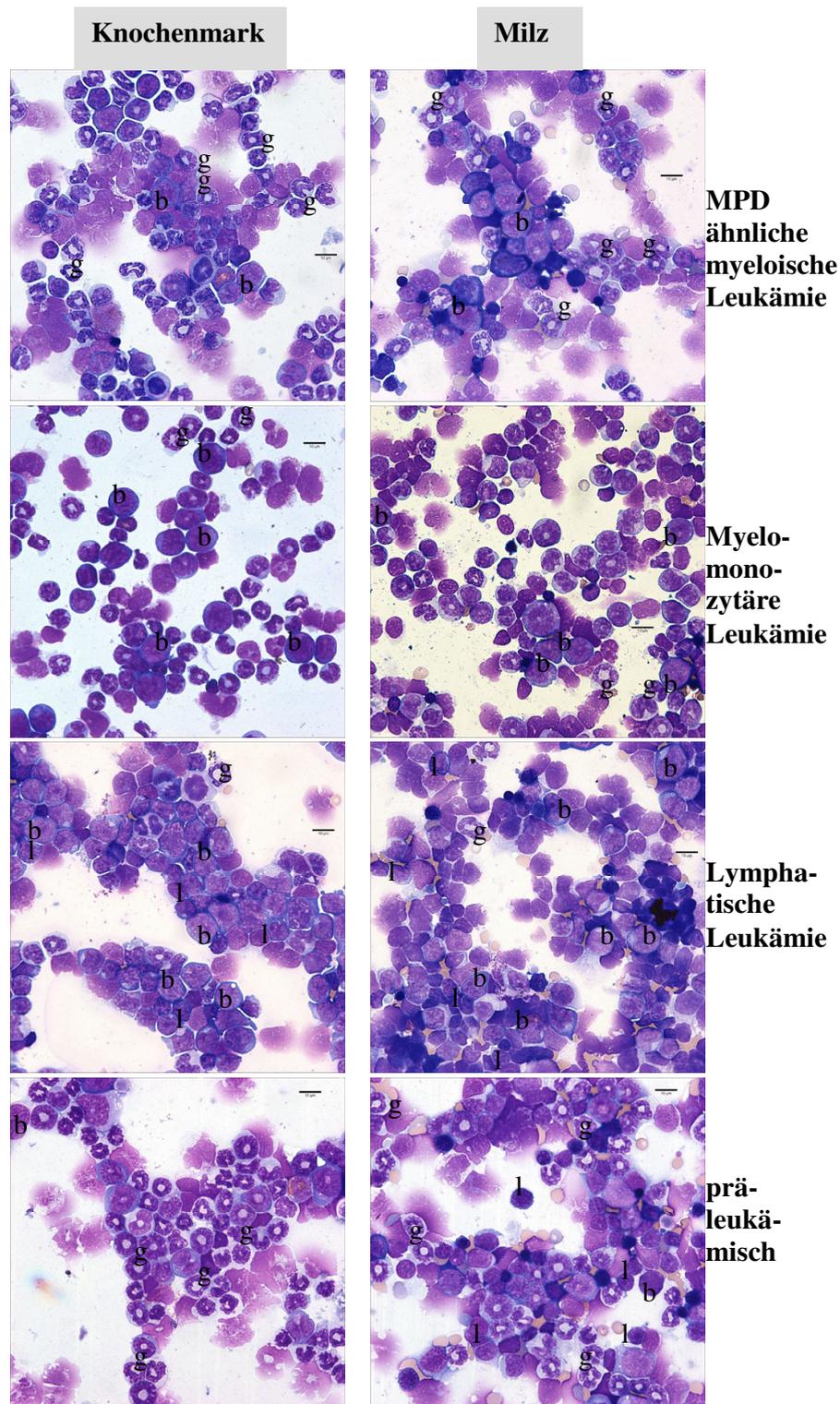
Aus der FACS-, der Zytospin- und der histopathologischen Analyse ging hervor:

*Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>*- Mäuse entwickelten Leukämien. Myeloische Leukämien, wie die MPD ähnliche myeloische Leukämie und die myelomonozytäre Leukämie, überwogen deutlich.

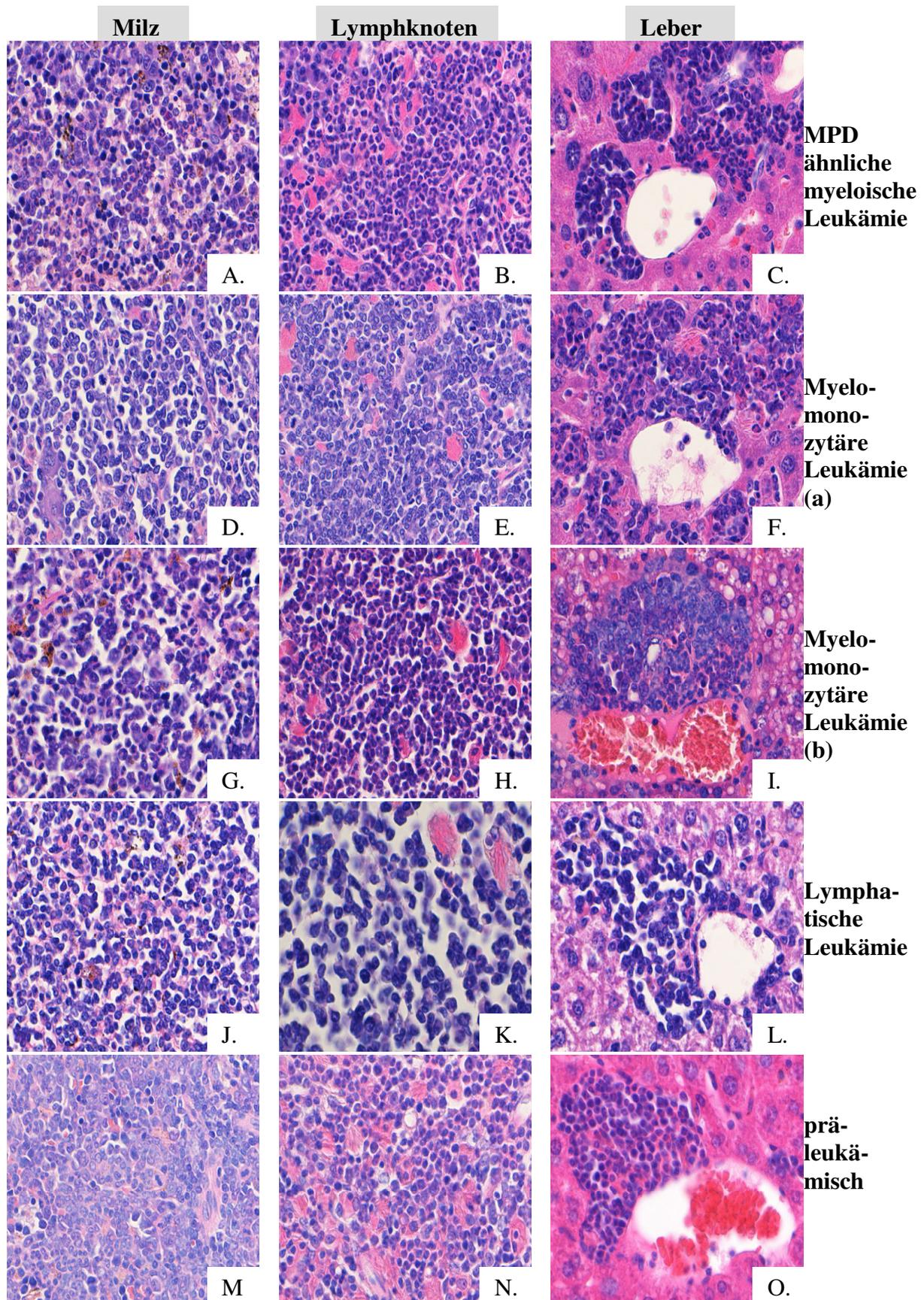
Bei Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie zeigte sich im Vergleich mit prä-leukämischen Mäusen eine Verschiebung zugunsten der GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten im Knochenmark, Milz und im Lymphknoten, sowie eine reduzierte Anzahl an B220<sup>+</sup> Lymphozyten insbesondere im Knochenmark (Abbildung 36A und 36B). Zudem war der Anteil der Blastenzellen im Knochenmark und in der Milz auf mehr als 5% (jedoch weniger als 20%) erhöht (Abbildung 36B). Histopathologisch betrachtet wies die Milz dieser Mäuse eine granulozytär und myeloblastisch gemischte, diffuse Infiltration auf (Abbildung 36C-A), die Lymphknoten zeigten eine massive Infiltration mit segment- und stabkernigen Granulozyten (Abbildung 36C-B). Zudem wurden 30-40% des Lebergewebes durch verschiedene neoplastische Zellen verdrängt (Abbildung 36C-C).



**Abbildung 36A:** *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse entwickeln Leukämien: MPD ähnliche myeloische Leukämie, myelomonozytäre Leukämie und lymphatische Leukämie (FACS-Analyse). FACS-Färbung: GR1-CD11b-B220-Färbung für GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten und B220<sup>+</sup> Lymphozyten. Dargestellt: % Anteil Zellen, gated über vitale Zellen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert. N=10 MPD ähnliche myeloische Leukämien, N=5 myelomonozytäre Leukämien, N=2 lymphatische Leukämien, N=5 prä-leukämisch (4 Monate alt).



**Abbildung 36B:** *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse entwickeln Leukämien: MPD ähnliche myeloische Leukämie, myelomonozytäre Leukämie und lymphatische Leukämie (Zytospin-Analyse). Knochenmark- und Milzzellen wurden per Zentrifugation auf einen Objektträger gebracht (Zytospin) und May-Grünwald-Giemsa gefärbt. MPD ähnliche myeloische Leukämie: Mehr als 5% Blasten in Knochenmark und Milz jedoch weniger als 20%, Granulozytenzahl erhöht. Myelomonozytäre Leukämie: Anzahl der Blasten in Knochenmark und Milz stark erhöht (mehr als 20%), Anzahl reifer Granulozyten sowohl im Knochenmark als auch in der Milz vermindert. Lymphatische Leukämie: Anzahl der Blasten über 20%, Anhäufung lymphatischer Zellen. Vergrößerung: 1:1000. Blasten (b), Granulozyten (g), lymphatische Zellen (l) exemplarisch betitelt.



**Abbildung 36C:** *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse entwickeln Leukämien: MPD ähnliche myeloische Leukämie, myelomonozytäre Leukämie und lymphatische Leukämie (Histopathologie). s. Seite 104.

**Abbildung 36C: *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse entwickeln Leukämien: MPD ähnliche myeloische Leukämie, myelomonozytäre Leukämie und lymphatische Leukämie (Histopathologie).**  
MPD ähnliche myeloische Leukämie: Abbildungen 36C-A bis C. A) diffuse Infiltration der Milz mit Granulozyten und gemischten Myeloblasten. B) massive Infiltration der Lymphknoten mit segment- und stabkernigen Granulozyten, sowie hochgradige kristalloide Ablagerungen. C) Infiltration der Leber mit neoplastischen Zellen. Myelomonozytäre Leukämie (Ausprägung a und b): Abbildungen 36C-D bis -I. D) Infiltration der Milz mit überwiegend leukoblastischen Zellen. E) Lymphknoten mit blastischen Vorläuferzellen infiltriert. F) Verdrängung der Leber durch Zellinfiltrate aus 40-50% Myeloblasten, 30-40% stabkernigen Granulozyten und Rest segmentkernigen Granulozyten. G) Milz infiltriert von Myeloblasten und segmentkernigen und stabkernigen Granulozyten. H) massive Infiltration der Lymphknoten mit stab- und segmentkernigen Granulozyten, sowie Myeloblasten. I) ebenso Infiltration der Leber mit sowohl stab- als auch segmentkernigen Granulozyten und Myeloblasten. Lymphatische Leukämie: Abbildungen 36C-J bis L. J) Milz massiv infiltriert von Lymphozyten und von lymphozytären Zellen ohne eindeutiges Differenzierungsmuster sowie von großzelligen Blasten. Massive extramedulläre Hämatopoese nachweisbar. K) hochgradige Infiltration der Lymphknoten mit Lymphozyten, lymphozytären Zellen und Blastenzellen. L) ebenso Infiltration der Leber mit Lymphozyten, lymphozytären Zellen und Blasten. Prä-leukämischer Phänotyp: Abbildungen 23C-M bis O. geringgradige Infiltration M) der Milz, N) der Lymphknoten und der O) der Leber mit Granulozyten und blastischen Zellen. Gewebeschnitte von Milz, Lymphknoten und Leber, Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Vergrößerung: 1:400.

Mäuse mit myelomonozytärer Leukämie wiesen, aufgrund der mehr oder weniger reduzierten Differenzierung der Zellen und dem jeweilig entsprechend erhöhtem Anteil an Blastenzellen, eine relativ heterogene Verteilung der Zellpopulationen auf. Die FACS-Analyse ergab: Die Anzahl an GR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten im Knochenmark war reduziert. Zudem war die Anzahl der B220<sup>+</sup> Lymphozyten in allen untersuchten hämatopoetischen Organen vermindert (Abbildung 36A). Die Zytospins zeigten: Der Anteil der Blastenzellen war im Knochenmark und in der Milz stark erhöht (mehr als 20%) und der Anteil reifer Granulozyten reduziert (Abbildung 36B). Histopathologisch betrachtet wies die Milz hochgradige Infiltrationen mit Blastenzellen auf (Abbildungen 36C-D/G) z.T. begleitet von einer Infiltration mit stab- und segmentkernigen Granulozyten (Abbildung 36C-G). Ebenso waren die Lymphknoten und die Leber entweder ausschließlich mit einer immensen Zahl an Myeloblasten infiltriert (Abbildungen 36C-E/F), oder nebst der Blastenzellen lagen segment- und stabkernige Granulozyten gehäuft vor (Abbildungen 36C-H/I).

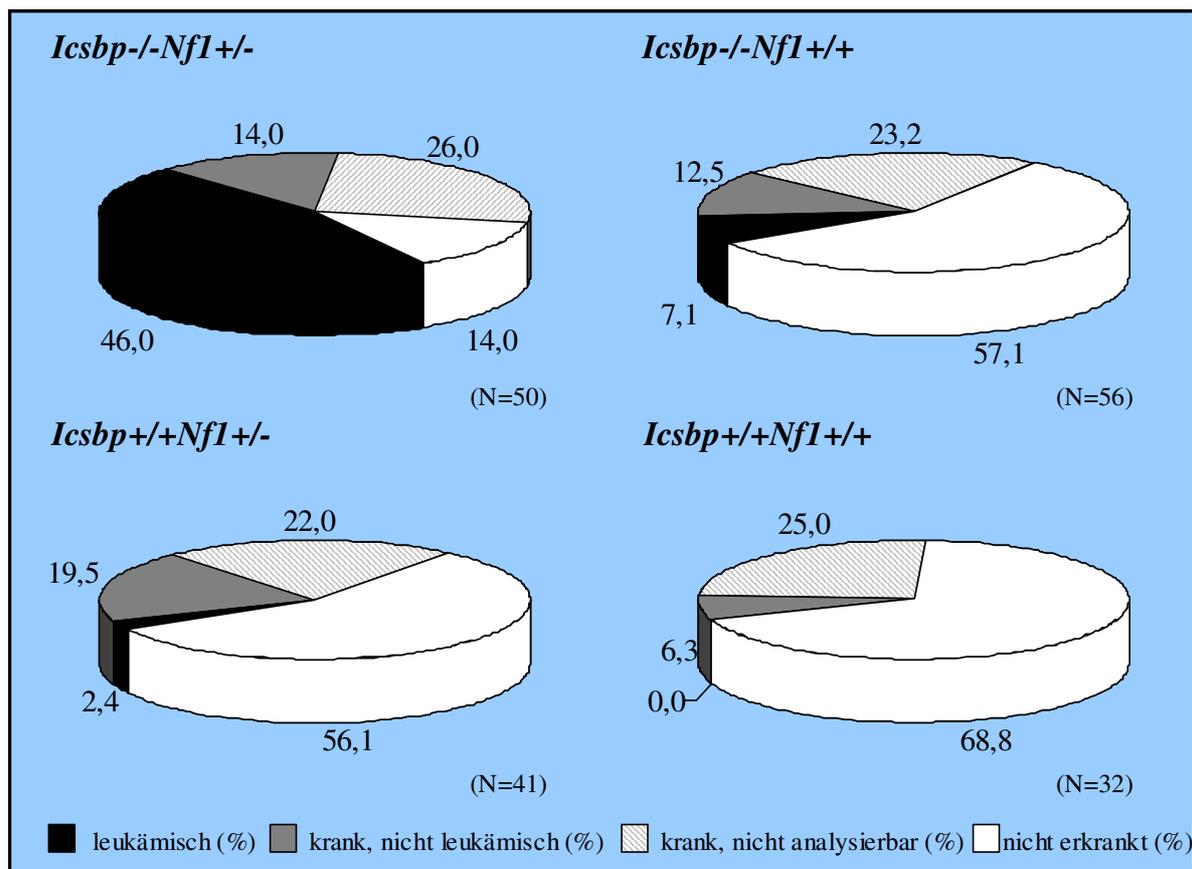
Die Entwicklung von lymphatischen Leukämien in den Mäusen zeigte sich im FACS über eine starke Zunahme der B220<sup>+</sup> Lymphozyten im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphknoten unter Reduktion der GR1<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten in den hämatopoetischen Organen (Abbildung 36A). Wie die Zytospins zeigten, war die Anzahl der Blastenzellen auf über 20% erhöht, zudem waren Knochenmark und Milz massiv von Lymphozyten infiltriert (Abbildung 36B).

Auch die gefärbten Gewebeschnitte bewiesen massive Infiltrationen der Milz (Abbildung 36C-J), der Lymphknoten (Abbildung 36C-K) und der Leber (Abbildung 36C-L) mit Lymphozyten, lymphozytären Zellen ohne eindeutiges Differenzierungsmuster und Blastenzellen.

Vereinzelt entwickelten Mäuse biphänotypische Leukämien, beobachtet über Infiltration der hämatopoetischen Organe mit mehr als 20% Blastenzellen und einer großen Anzahl B220<sup>+</sup> Zellen und CD11<sup>+</sup> Zellen bzw. B220<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> koexprimierender Zellen, sowie Leukämien ohne Ausreifung, gekennzeichnet über mehr als 20% Blastenzellen und nur vereinzelt noch vorhandene differenzierte Zellen (Daten nicht gezeigt).

### 5.II.3.5. 46% aller *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse erkrankten an Leukämien

Zur Überprüfung einer Korrelation zwischen dem Ausbilden von Leukämien und der Kombination von *Icsbp*-Defizienz und *Nf1*-Haploinsuffizienz wurde, im Folgenden, die Entwicklung von Leukämien in Abhängigkeit vom Genotypen ausgewertet.



**Abbildung 37: 46% aller *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse entwickeln Leukämien.** Ausbildung von Leukämien in Abhängigkeit vom Genotypen. N gibt die Anzahl aller Mäuse dieses Genotypes an, die über 19 Monate beobachtet wurden. Die Statistiken zeigen die prozentuale Verteilung an erkrankten leukämischen, erkrankten nicht leukämischen, erkrankten, nicht analysierbaren und nicht erkrankten, unauffälligen Mäusen je Genotyp.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 60-70% über den Zeitraum von 19 Monaten unauffälliger, nicht erkrankter Mäuse, erkrankten lediglich 14% der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse nicht (Abbildung 37).

6-20% der Mäuse erkrankten, bildeten aber keine Leukämie aus (Abbildung 37). Die Todesursachen dieser erkrankten, aber nicht leukämischen Mäuse waren vielfältig. Vereinzelt wurden von uns intra-abdominale Tumore festgestellt. Auch eitrige Peritonitits, Myokardfibrose und Infektionen wurden als nicht-leukämische Todesursache diagnostiziert. Innerhalb aller Genotypen erkrankten ca. 25% der Mäuse, welche nicht analysiert werden konnten, denn diese Tiere verstarben über Nacht oder an arbeitsfreien Tagen.

Es bildeten sich lediglich in 7,1% der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäuse (4 von 56) und in 2,4% der *Icsbp<sup>+/+</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse (1 von 41) Leukämien aus (Abbildung 37). Keine der *Icsbp<sup>+/+</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäuse zeigte ein leukämisches Krankheitsbild (Abbildung 37).

Jedoch 46% der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse (23 von 50) erkrankten an Leukämien (Abbildung 37).

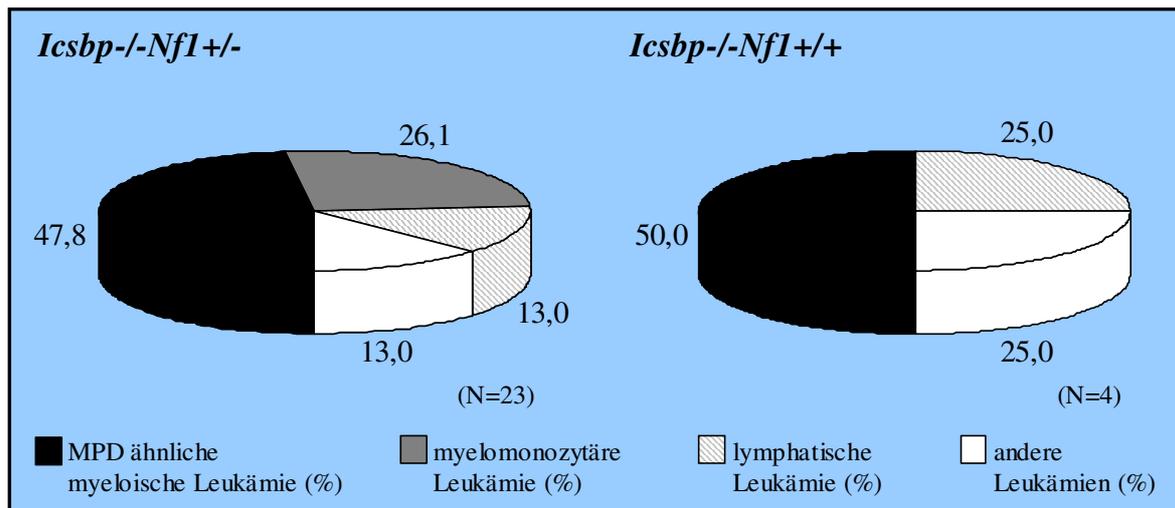
### 5.II.3.6. Myeloische Leukämien überwiegen

Die Hälfte aller *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse bildeten Leukämien aus. Um zu untersuchen, ob es aufgrund der gesteigerten Myelopoese in den prä-leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen daher auch eine Prädisposition für myeloische Leukämien gab, wurde die Verteilung der Leukämietypen in den *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* und *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäusen analysiert:

Die einzige leukämische *Icsbp<sup>+/+</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Maus erkrankte an myelomonozytärer Leukämie (aufgrund der geringen N-Zahl nicht in der Statistik von Abbildung 38 erfasst).

Von den 4 leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup>* Mäusen erkrankten 50% (2 von 4) an MPD ähnlicher myeloischer Leukämie, 25% (1 von 4) an lymphatischer Leukämie und bei 25% (1 von 4) konnte eine Leukämie ohne Ausreifung (andere Leukämien) diagnostiziert werden (Abbildung 38).

Hingegen 73,9% der leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse (17 von 23) entwickelten myeloische Leukämien, zusammengesetzt aus 47,8% an Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämien (11 von 23) und 26,1% an Mäusen mit myelomonozytärer Leukämie (6 von 23) (Abbildung 38). 13% der leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse (3 von 23) bildeten eine lymphatische Leukämie aus und 13% (3 von 23) erkrankten an anderen Leukämieformen (Abbildung 38).



**Abbildung 38: 73,9% der leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse bilden myeloische Leukämien aus.** Verteilung der Leukämietypen unter den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> und *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäusen. N gibt die Anzahl aller leukämischen Mäuse dieses Genotypes an. Die Statistiken zeigen die prozentuale Verteilung an Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie, mit myelomonozytärer Leukämie, mit lymphatischer Leukämie und an Mäusen mit diversen anderen Leukämieformen (z.B. Leukämie ohne Ausreifung, biphänotypische Leukämie).

Basierend auf der Kombination von *Icsbp*-Defizienz und *Nf1*-Haploinsuffizienz in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen, bildete demnach die in den prä-leukämischen Mäusen beobachtete gesteigerte Myelopoese die Grundlage für das spätere Ausbilden von primär myeloischen, akuten Leukämien.

### 5.II.3.7. Hohe Leukozytenzahl, hohes Milz- und Lebergewicht bei blastenreichen Leukämien

Zur Analyse möglicher Korrelationen ist in Tabelle 3 eine Übersicht über alle leukämischen Mäuse und deren Genotyp, Geschlecht, Alter, Art der Leukämie und vorkommende genetische Veränderung dargestellt.

Es zeigte sich, dass die, gegenüber der MPD ähnlichen myeloischen Leukämie, blastenreicheren myelomonozytären, lymphatischen und biphänotypischen Leukämien mit einer höheren Leukozytenzahl im peripheren Blut und einer stärkeren Infiltration von Milz und Leber assoziiert waren (Tabelle 3).

Im Median war die Leukozytenzahl von *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen mit myelomonozytärer Leukämie um ein 4,8faches höher als die Leukozytenzahl der Mäuse mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie, das Milzmediangewicht war um ein 1,7faches und das Lebermediangewicht um das 1,3fache erhöht (Tabelle 3).

Beim Vergleich der Medianwerte der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse mit lymphatischer bzw. biphänotypischer Leukämie mit den Medianwerten der an MPD ähnlicher myeloischer

Leukämie erkrankten Mäuse, zeigte sich eine massive Zunahme der Leukozytenzahl um das 24fache. Die Milzmediangewichte waren um das 1,4 bzw 1,6fache erhöht und das Lebermediangewicht um das 1,4-1,5fache (Tabelle 3).

Insgesamt demonstrierte dies eine erhöhte Malignität der blastenreicheren Leukämien.

Genotyp	Maus	Geschlecht	Alter (Monate)	Art der Leukämie	Leukozyten ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Milz (g)	Leber (g)	SKY	Array CGH	Verlust des <i>Nf1</i> WT-Transkripts/ <i>Nf1</i> WT-Allels
<i>Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup></i>	4121	m	10,4	MPD ähnliche myeloische Leukämie	n.b.	0,28	1,60	n.b.	n.b.	n.b.
"	4450	m	11,8	MPD ähnliche myeloische Leukämie	27,5	0,36	1,75	n.b.	n.b.	-/-
"	4266	m	12,1	MPD ähnliche myeloische Leukämie	28,1	0,55	2,17	n.b.	n.b.	-/-
"	4281	m	12,1	MPD ähnliche myeloische Leukämie	27,6	0,31	2,54	n.b.	normal	-/-
"	4926	m	8,2	MPD ähnliche myeloische Leukämie	66,5	0,72	2,68	keine klonalen Aberrationen	normal	-/-
"	4928	m	8,2	MPD ähnliche myeloische Leukämie	68,5	0,90	2,78	keine klonalen Aberrationen	normal	-/-
"	4267	m	11,3	MPD ähnliche myeloische Leukämie	n.b.	0,41	3,12	n.b.	n.b.	-/-
"	4767	w	9,4	MPD ähnliche myeloische Leukämie	27,9	0,50	1,56	n.b.	n.b.	-/n.b.
"	4271	w	10,7	MPD ähnliche myeloische Leukämie	20,9	0,27	1,70	keine klonalen Aberrationen	normal	n.b.
"	4708	w	15,0	MPD ähnliche myeloische Leukämie	34,7	0,30	1,92	n.b.	n.b.	(+)/(+)
"	4427	w	14,7	MPD ähnliche myeloische Leukämie	46,4	0,52	4,41	n.b.	n.b.	+/+
<b>MEDIAN</b>			<b>11,3</b>	<b>MPD ähnliche myeloische Leukämie</b>	<b>28,1</b>	<b>0,40</b>	<b>2,20</b>	<b>0 von 3</b>	<b>0 von 4</b>	<b>2 von 9</b>
"	4447	m	10,2	myelomonozytäre Leukämie	195,0	1,13	3,53	n.b.	n.b.	n.b.
"	4448	m	8,5	myelomonozytäre Leukämie	7,6	0,81	1,91	keine klonalen Aberrationen	n.b.	n.b.
"	4757	m	9,8	myelomonozytäre Leukämie	38,0	0,78	3,54	n.b.	41;XY;+X	(+)/(+)
"	3761	m	12,2	myelomonozytäre Leukämie	225,0	1,09	5,16	keine klonalen Aberrationen	normal	(+)/(+)
"	4273	w	10,2	myelomonozytäre Leukämie	74,0	0,55	1,40	keine klonalen Aberrationen	n.b.	n.b.
"	4122	w	11,0	myelomonozytäre Leukämie	480,0	0,57	2,00	keine klonalen Aberrationen	normal	n.b.
<b>MEDIAN</b>			<b>10,2</b>	<b>myelomonozytäre Leukämie</b>	<b>134,5</b>	<b>0,80</b>	<b>2,80</b>	<b>0 von 4</b>	<b>1 von 3</b>	<b>2 von 2</b>
"	3782	m	12,3	lymphatische Leukämie	826,0	0,70	2,87	n.b.	n.b.	n.b.
"	4430	w	14,9	lymphatische Leukämie	675,0	0,54	3,04	n.b.	40;XX;+9A	+/+
"	4115	w	10,8	lymphatische Leukämie	76,3	0,89	3,36	n.b.	42;XX;+14;+17	(+)/(+)
<b>MEDIAN</b>			<b>12,3</b>	<b>lymphatische Leukämie</b>	<b>675,0</b>	<b>0,70</b>	<b>3,00</b>	<b>n.b.</b>	<b>2 von 2</b>	<b>2 von 2</b>
"	4765	m	10,7	biphänotypische Leukämie	1148,0	0,67	5,57	n.b.	n.b.	(+)/(?)
"	4453	w	11,2	biphänotypische Leukämie	568,0	0,87	4,29	n.b.	39;X;-X	+/+
<b>MEDIAN</b>			<b>11,8</b>	<b>biphänotypische Leukämie</b>	<b>675,0</b>	<b>0,70</b>	<b>3,20</b>	<b>n.b.</b>	<b>1 von 1</b>	<b>2 von 2</b>
"	4289	w	13,6	Leukämie ohne Ausreifung	773,0	0,51	2,73	n.b.	normal	n.b.
"	3529	m	11,1	(Lymphom)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/+</sup></i>	3502	m	17,4	MPD ähnliche myeloische Leukämie	70,1	0,32	1,74	n.b.	n.b.	n.b.
"	4922	w	12,0	MPD ähnliche myeloische Leukämie	30,9	0,29	2,28	n.b.	n.b.	n.b.
"	4921	w	7,1	lymphatische Leukämie	476,0	1,20	4,44	n.b.	n.b.	n.b.
"	4435	m	14,2	Leukämie ohne Ausreifung	287,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Icsbp<sup>+/+</sup>Nf1<sup>+/-</sup></i>	4712	w	8,4	myelomonozytäre Leukämie	58,5	1,96	3,04	n.b.	n.b.	-/-

**Tabelle 3: Übersicht über alle Leukämiefälle: Genotyp, Geschlecht, Alter, Art der Leukämie, genetische Veränderungen.**

Leukozyten, bestimmt mittels automatischem Zellzählgerät, aus peripherem Blut. SKY: spektrale Karyotypisierung, Array CGH: Microarray-basierende comparative Genomhybridisierung. m = männlich, w = weiblich. Verlust des *Nf1* WT-Transkripts/WT-Allels: + = Verlust, - = kein Verlust, (+) = maskierter Verlust. (?) = nicht eindeutig. n.b. = nicht bestimmt

### 5.II.3.8. Korrelationen von sekundären genetischen Veränderungen und leukämischen Phänotypen

In leukämischen Zellen finden sich häufig chromosomale, genetische und/oder epigenetische Veränderungen, wie z.B. Chromosomentranslokationen, Inversionen, Duplikationen, Deletionen, Insertionen und/oder abweichende Methylierungsstrukturen, einhergehend mit Veränderungen von Expressionsraten.

Um zu untersuchen, ob sich die Leukämien der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse hier allein auf der Kombination von Icsbp-Defizienz und Nf1-Haploinsuffizienz, und damit u.a. auf der additiv reduzierten *Nf1* Expression, ausbildeten, oder zusätzliche, sekundäre chromosomale bzw. genetische Veränderungen in den Zellen stattfanden, wurden SKY- (spektrale Karyotypisierung) und Array CGH (Microarray-basierende comparative Genomhybridisierung)-Analysen an Knochenmarkszellen bzw. -DNA der leukämischen Mäuse durchgeführt.

Die SKY-Analyse zeigte: Es wurden an keinem (N=7) der präparierten Chromosomen-Sets aus dem Knochenmark der leukämischen Mäuse *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse größere chromosomale Aberrationen festgestellt (Tabelle 3).

Die CGH-Analyse ergab für alle Proben von *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie eine unveränderte Kopienzahl auf Chromosomenebene.

2 der 3 DNA-Proben von Mäusen mit myelomonozytärer Leukämie zeigten ebenso eine unveränderte Kopienzahl. Bei 1 Maus mit myelomonozytärer Leukämie wurde eine Erhöhung der Chromosomenanzahl von 40 auf 41 Chromosomen festgestellt, bei Verdoppelung des X Chromosoms (41; XY, +X).

Zusammenfassend konnte, von allen analysierten *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen mit myeloischen Leukämien, an nur 1 Maus mit myelomonozytärer Leukämie (1 von 7) eine Veränderung der Chromosomenkopienzahl (Verdoppelung des X Chromosoms) bestimmt werden (Tabelle 3).

Hingegen zeigten sich bei 2 von 2 Proben von Mäusen mit lymphatischer Leukämie eine Veränderung in der Kopienzahl der Chromosomen. Maus 4115 zeigt eine Verdoppelung der Chromosomen 14 und 17 (42, XX, +14, +17) und für Maus 4430 wurde eine erhöhte Kopienzahl auf dem Chromosom 9 Bande A bestimmt (40, XX, +9A).

Zudem wurde bei Maus 4453 mit biphänotypischer Leukämie eine Reduktion um ein X Chromosom detektiert (39, XX, -X) (Tabelle 3).

Das Ausbilden der myeloischen Leukämien in den *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen beruhte somit vornehmlich auf den primären genetischen Veränderungen (Icsbp-Defizienz kombiniert mit

Nf1-Haploinsuffizienz) und war nicht gebunden an, über SKY oder Array CGH-detektierbare, sekundäre chromosomale oder genetische Veränderungen.

### **5.II.3.9. Verlust des *Nf1* WT-Transkripts basiert auf einem LOH von *Nf1* und ist abhängig vom Leukämietyp**

Für die *Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse wurde gezeigt, dass es in etwa 50% aller Tumorzellen (aus Lungen-Adenocarcinomen, Lymphomen, Phaeochomozytomen) und in allen myeloischen Leukämien zu einem Verlust der *Nf1* Heterozygotität (LOH) kommt und somit in diesen Zellen eine biallele Inaktivierung dieses Gens vorliegt (Jacks et al., 1994).

Zudem kommt es auch in Knochenmarkzellen von ca. 50% der untersuchten Kinder mit Neurofibromatose 1 und ausgebildeten, malignen myeloischen Neoplasien zu einem ein LOH von *Nf1* (Shannon et al., 1994; Side et al., 1997).

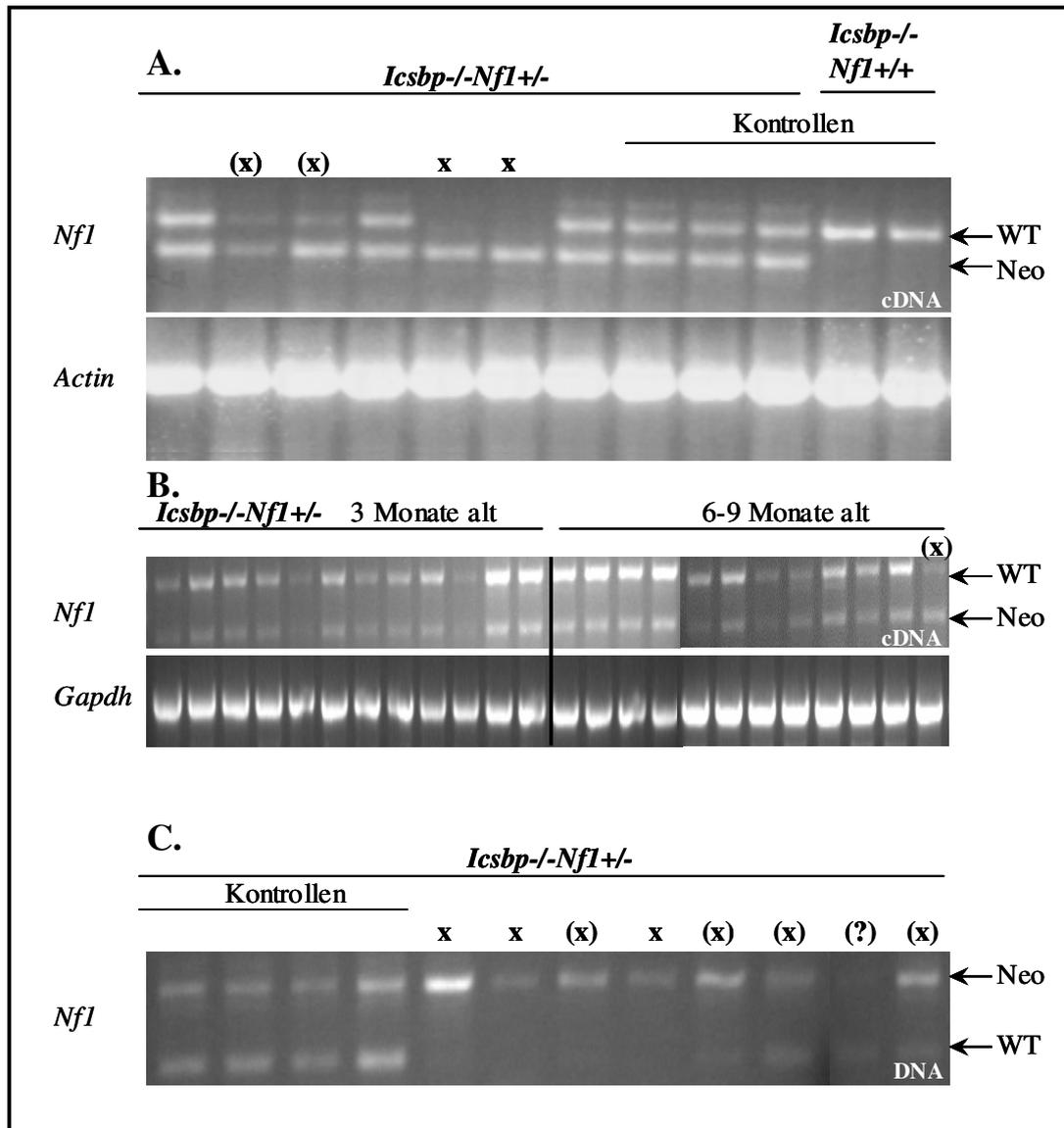
Um zu untersuchen, ob die Ausbildung der Leukämien in den *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen auch auf dem totalen Verlust des *Nf1* WT-Transkripts beruhte, wurde zunächst RT-PCR an RNA aus Knochenmarkzellen dieser Mäuse durchgeführt (Abbildung 39A).

Dazu wurde eine RT-PCR mit drei Primern etabliert, so dass sowohl das Transkript von dem *Nf1* Allel mit der Neo-Insertion als auch, wenn noch vorhanden, das *Nf1* Transkript vom WT-Allel detektiert werden konnte (Lage der Primer siehe Abbildung 5 S. 26).

In Abbildung 39A zeigt sich (exemplarisch) der Verlust des *Nf1* WT-Transkripts (angezeigt durch X) bei zwei Leukämiefällen der *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse. Zudem fanden wir in zwei Proben (angezeigt durch (X)) einen maskierten Verlust (s. nächster Abschnitt) des *Nf1* WT-Transkripts. Hier war die WT-Bande schwächer als die Neo-Bande (Abbildung 39A).

Insgesamt zeigte sich bei 53% (8 von 15) der analysierten, leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse ein Verlust des *Nf1* WT-Transkripts (davon bei 62,5% maskiert (s.u.) und bei 37,5% vollständig) (Tabelle 3).

Da für die RT-PCR RNA aus Gesamtknochenmark und nicht aus einer isolierten, malignen Zellpopulation verwendet wurde, war es möglich, dass, bei zu hoher Amplifikation, ein Verlust des *Nf1* WT-Transkripts in den leukämischen Zellen durch ein weiter vorhandenes *Nf1* WT-Transkript aus nicht malignen Zellen maskiert wurde. Zur sicheren Identifizierung dieses sogenannten maskierten Verlusts des *Nf1* WT-Transkripts wurde daher zusätzlich RT-PCR mit seriell verdünnter cDNA durchgeführt und der Verlust der WT-Bande semiquantitativ über die Verdünnungsschritte beobachtet. Diese Versuche bestätigten die in Abbildung 39A dargestellten Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 39: Verlust des *Nf1* WT-Transkripts basiert auf einem LOH von *Nf1* und ist abhängig vom Leukämietyp.** A) RT-PCR an cDNA aus dem Knochenmark leukämischer *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse: 511 bp-Fragment für das *Nf1* WT- und 340 bp-Fragment für das *Neo*-Transkript. Kontrollen: RNA aus dem Knochenmark nicht-leukämischer *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> bzw. *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/+</sup> Mäuse. Exemplarische Darstellung. B) RT-PCR an cDNA aus dem Knochenmark prä-leukämischer 3 bzw. 6-9 Monate alter *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäuse: 511 bp-Fragment für das *Nf1* WT- und 340 bp-Fragment für das *Neo*-Transkript. C) PCR an genomischer DNA von leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen. 194 bp-Fragment für das *Nf1* WT-Alell und 340 bp-Fragment für das *Nf1* Allel mit der Insertion des Neomycin-Gens. Kontrollen: genomische DNA aus leukämischen *Icsbp*<sup>-/-</sup>*Nf1*<sup>+/-</sup> Mäusen ohne Verlust des *Nf1* WT-Transkripts. Exemplarische Darstellung. X: Verlust des *Nf1* WT-Transkripts/-Allels. (X): maskierter Verlust des *Nf1* WT-Transkripts/-Allels, WT-Bande schwächer als Neo-Bande. (?): nicht eindeutig. RT-PCR mit Actin- bzw. GAPDH-Primern zur Überprüfung der cDNA-Mengen.

Zur Analyse des zeitlichen Auftretens des *Nf1* WT-Transkript-Verlustes und Ermittlung einer möglichen zeitlichen und funktionellen Korrelation zur Ausbildung der Leukämien wurde die RT-PCR auch an RNA aus Knochenmarkszellen jüngerer (3 Monate alt) und älterer (6-9 Monate alt), prä-leukämischer Mäuse durchgeführt (Abbildung 39B).

Keine der 12 getesteten 3 Monate alten und nur 1 der 12 überprüften 6-9 Monate alten *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse zeigte einen (maskierten) Verlust des *Nf1* WT-Transkripts. Von den insgesamt 24 betrachteten Mäusen wären aber laut Statistik (46% der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* entwickelten Leukämien, davon zeigten 53% einen *Nf1* WT-Transkriptverlust) 6 (bzw. 3 je Altersgruppe) Mäuse mit einem Verlust des *Nf1* WT-Transkripts zu erwarten gewesen. Somit scheint ein *Nf1* WT-Transkriptverlust erst sehr spät in den Mäusen, möglicherweise erst kurz vor dem Ausbilden der Leukämien, aufzutreten.

Mittels PCR an genomischer DNA aus leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen konnte dann bewiesen werden, dass der Verlust des *Nf1* WT-Transkripts auf einer biallelen Inaktivierung, demnach einem LOH von *Nf1*, beruht. (Abbildung 39C). Bei allen analysierten Mäusen stimmten die PCR-Ergebnisse an DNA mit den RT-PCR Ergebnissen an RNA überein (Tabelle 3).

Zusammenfassend ergab sich: Bei 53% aller analysierten, leukämischen *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse konnte ein *Nf1* WT-Transkriptverlust festgestellt werden. Die reduzierte *Nf1* Expression beruhte auf einem LOH von *Nf1*.

Da vor dem Auftreten der Leukämien kein *Nf1* WT-Transkriptverlust verzeichnet werden konnte, ist zu vermuten, dass der LOH von *Nf1* in enger zeitlicher und funktionaler Korrelation mit dem Ausbilden der Leukämien steht.

Jedoch wurde auch ohne einen detektierten LOH von *Nf1* das Ausbilden von Leukämien in den *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäusen beobachtet. Dabei zeigte sich eine vom Leukämietyp abhängige Korrelation: So wiesen alle analysierten *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse mit lymphatischer, biphänotypische und auch myelomonozytärer Leukämie, und auch die einzige *Icsbp<sup>+/+</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Maus mit myelomonozytärer Leukämie, in den Knochenmarkzellen einen LOH von *Nf1* auf (Tabelle 3).

Lediglich 22,2% (2 von 9) der *Icsbp<sup>-/-</sup>Nf1<sup>+/-</sup>* Mäuse mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie, und zwar bei den beiden Mäusen mit dem für diese Leukämiegruppe höchstem Alter, wiesen einen LOH von *Nf1* auf (Tabelle 3).