

6. Diskussion

Eine CML verläuft über progressive Krankheitsphasen. Der chronischen Phase folgt die Akzelerationsphase, die terminale Phase wird als Blastenkrise oder akute leukämische Phase bezeichnet und führt unbehandelt zum Tod des Patienten (Spiers, 1977; Kantarjian et al., 1987; Kantarjian und Talpaz, 1988).

Die Phasenwechsel der CML bzw. das Ausbilden der akuten Phase ist häufig mit genetischer Instabilität verbunden, in deren Folge Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden (zur Übersicht: Sattler und Salgia, 1997; Shet et al., 2002; Calabretta und Perrotti, 2004). Welche Faktoren und Prozesse jedoch genau einen Phasenwechsel und schließlich das Ausbilden der akuten leukämischen Phase (bzw. der akuten Leukämien) bewirken, ist nicht im Detail geklärt.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte durch determinierte Deregulation eines Onkogens bzw. eines Tumorsuppressorgens auf dem Hintergrund der *Icsbp*-Defizienz eine gezielte Induktion von akuten Leukämien erreicht werden. *Icsbp*^{-/-} Mäuse bildeten die Grundlage für die Untersuchungen, da diese Mäuse eine CML-ähnliche MPD ausbilden und der Wechsel zur akuten leukämischen Phase in diesen Mäusen nur sehr selten erfolgt (Holtschke et al., 1996).

6.1. Keine Kooperation von *Icsbp*-Defizienz und *Bcl-2* Überexpression bei der Induktion von Leukämien

In dem ersten Ansatz wurde *Icsbp*-Defizienz mit deregulierter Expression (Überexpression) des Onkogens *BCL-2* kombiniert. Es sollte geklärt werden, ob *Icsbp*-Defizienz und *BCL-2* Überexpression einen Synergieeffekt zur systematischen Induktion von akuten Leukämien erzielen. Grundlage dieses Ansatzes waren die publizierten Ergebnisse, dass bei Anwesenheit von ICSBP dieser Transkriptionsfaktor die Expression des anti-apoptotischen Proteins *BCL-2* (sowie *BCL-X_L*) reprimiert und somit die über die CML-spezifische, konstitutive Tyrosinkinase *BCR/ABL* gesteuerte Leukämogenese inhibiert (Gabriele et al., 1999; Burchert et al., 2004; Middleton et al., 2006), gleichzeitige Überexpression von *BCR/ABL* und *BCL-2* in myelomonozytären Zellen hingegen bei 50% der Mäuse zur Ausbildung von akuten Leukämien führt (Jaiswal et al., 2003).

Zur Überexpression von *BCL-2* im *Icsbp*^{-/-} hämatopoetischen System wurden retroviral transduzierte, *BCL-2* überexprimierende *Icsbp*^{-/-} Knochenmarkzellen in letal bestrahlte, wildtypische Rezipienten-Mäuse transplantiert. Zur Kontrolle wurden sowohl *BCL-2*

überexprimierende *Icsbp*^{+/+} Knochenmarkzellen, als auch jeweils *Icsbp*^{-/-} bzw. *Icsbp*^{+/+} Knochenmarkzellen, transduziert mit dem „leeren“ retroviralen *Mieg3* Konstrukt (*Mieg3* Kontrollmäuse), transplantiert.

Leukämiefälle wurden anhand der erhöhten Blastenzahl, der erhöhten peripheren Leukozytenzahl, des vergrößerten Milz- und Lebergewichtes und der Verteilung der *EGFP*⁺*GR1*⁺*CD11b*⁺ Granulozyten bzw. *EGFP*⁺*B220*⁺ Lymphozyten diagnostiziert. Der Bezug zur *EGFP* Expression gab dabei an, dass es sich um einen Effekt der transplantierten, *EGFP*⁺ Zellen handelte, denn *EGFP* wurde ebenso auf dem retroviralen *Mieg3* Konstrukt, verknüpft über eine interne ribosomale Eintrittsstelle, exprimiert.

Die Ergebnisse zeigten: In den *BCL-2* überexprimierenden Mäusen entwickelten sich Leukämien, jedoch mit geringer Inzidenz: Lediglich 6,5% (2 von 31) der *Bcl-2 Icsbp*^{-/-} Mäuse und 13,3% (2 von 15) der *Bcl-2 Icsbp*^{+/+} Mäuse bildeten Leukämien aus. Eine gesteigerte Myeloproliferation wurde in 6,5% (2 von 31) der *Bcl-2 Icsbp*^{-/-} Mäuse und 13,3% (2 von 15) der *Bcl-2 Icsbp*^{+/+} Mäuse diagnostiziert. Die überwiegende Mehrheit der Mäuse (60-80%) starb jedoch altersbedingt oder an den Folgen der Transplantation (z.B. mangelnde Rekonstitution, Strahlungsschäden).

In den *Mieg3* Kontrollmäusen konnte kein Ausbilden von leukämischen Erkrankungen oder eine gesteigerte Myeloproliferation beobachtet werden. Dies demonstrierte die funktionelle Wirksamkeit der *Bcl-2* Überexpression: D.h. das Ausbilden von Leukämien oder einer gesteigerten Myeloproliferation beruhte unmittelbar auf der deregulierten, erhöhten *BCL-2* Expression und nicht auf den Folgen der retroviralen Transduktion der Knochenmarkzellen (Insertionsmutagenese durch zufällige Insertion des retroviralen Konstrukts (Baum et al., 2003)) bzw. der Transplantation (z.B. den Folgen der letalen Bestrahlung).

Die Leukämiefälle standen jedoch nicht im direkten Zusammenhang mit dem *Icsbp*-Verlust, denn auch in den *BCL-2 Icsbp*^{+/+} Mäusen bildeten sich, sogar mit höherer Frequenz, Leukämien aus. Es wurde demnach kein Synergieeffekt von *Icsbp*-Defizienz und *BCL-2* Überexpression zur gezielten Induktion von akuten Leukämien beobachtet. D.h. allein die Hemmung der Apoptose in *Icsbp*-defizienten Zellen führt nicht zur Ausbildung von Leukämien.

Vermutlich erhöhen zusätzliche, sekundäre chromosomale oder genetische Veränderungen in den *BCL-2* überexprimierenden Zellen die Leukämieinzidenz. Bereits bekannt ist, dass *BCL-2* mit verschiedenen Faktoren Synergien eingeht und erst mit dem Zusammenwirken

Leukämien mit erhöhter Frequenz auftreten (Strasser et al., 1990; Donnell Mc und Korsmeyer, 1991; Strasser und Harris, 1993; Traver et al., 1998; Kogan et al., 2001).

Die höhere Inzidenz an Leukämiefällen bei den BCL-2 *Icsbp*^{+/+} Mäusen lässt sich vermutlich über die unterschiedliche Zusammensetzung der Knochenmarkzellen der *Icsbp*^{-/-} bzw. *Icsbp*^{+/+} Mäuse und somit auch in der unterschiedlichen Zusammensetzung der stimulierten, transplantierten Zellen erklären: Knochenmarkzellen aus *Icsbp*^{-/-} Mäusen haben u.a. einen geringeren Anteil früher hämatopoetischer Stammzellen (CMPs und Flt3- Zellen, Abbildung 28 S.87). Bildet eine dieser frühen Vorläuferzell-Populationen die Leukämie-induzierende Targetzell-Population, erklärt sich, aufgrund der geringeren Anzahl dieser Zellen im *Icsbp*^{-/-} Ansatz und damit der reduzierten statistischen Wahrscheinlichkeit zur malignen Transformation, der geringere Anteil an Leukämiefällen in den Bcl-2 *Icsbp*^{-/-} Mäusen.

Das Auftreten sowohl myeloischer als auch lymphatischer Leukämien unterstreicht die Hypothese, dass für die Leukämieentwicklung, bei hier vorliegendem Kontext, eine frühe, multipotente Zellpopulation verantwortlich ist.

6.II. Nf1-Haploinsuffizienz führt zur Ausbildung von Leukämien in *Icsbp*-defizienten Mäusen

In dem zweiten Ansatz zur Analyse der gezielten Induktion von akuten Leukämien wurde *Icsbp*-Defizienz mit deregulierter Expression des Tumorsuppressorgens *Nf1* (Nf1-Haploinsuffizienz) kombiniert.

Die Expression von *Nf1* wird zudem direkt von dem Transkriptionsfaktor *Icsbp* positiv reguliert (Zhu et al., 2004; Huang et al., 2006; Huang et al., 2007). Möglich ist daher, dass die Ausbildung der CML-ähnlichen MPD in den *Icsbp*^{-/-} Mäusen auf einer reduzierten *Nf1* Expression beruht. Es sollte daher untersucht werden, ob bei Kombination von fehlender transkriptioneller Aktivierung über *Icsbp* und zusätzlicher Nf1-Haploinsuffizienz, eine (additiv) verstärkt reduzierte *Nf1* Expression in den *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäusen vorliegt, und ob diese hinreichend ist zur systematischen Induktion von akuten Leukämien in *Icsbp*-defizienten Mäusen.

Die z.Zt. allgemein gültige Meinung ist, dass ein vollständiger *Nf1* Expressionsverlust, bedingt durch eine biallele Inaktivierung (z.B. LOH, somatische Mutationen) von *Nf1*, zur Induktion von Leukämien notwendig ist: Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass in Patienten mit Neurofibromatose I ein *NFI* Allel nicht intakt ist, in Krebszellen dieser Patienten dann jedoch beide Allele inaktiviert vorliegen (Xu et al., 1992; Shannon et al., 1994; Colman et al., 1995; Miles et al., 1996; Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997; Side et al., 1997; Side et al., 1998). Die Bedeutung der biallelen *Nf1* Inaktivierung für die Krebsentwicklung wurde in den *Nf1*^{+/-} Mäusen und durch adoptive Transfersversuche mit *Nf1*^{-/-} Zellen bestätigt (Jacks et al., 1994; Largaespada et al., 1996; Le et al., 2004). Denn Nf1-Verlust resultiert in einer Erhöhung des Ras-GTP-Levels und damit gesteigerter Proliferation und verminderten Apoptose (Basu et al., 1992; DeClue et al., 1992; Kim et al., 1995; Bollag et al., 1996; Guha et al., 1996; Largaespada et al., 1996; Lau et al., 2000; Sherman et al., 2000).

Zudem zeigt sich eine Hypersensitivität gegenüber dem Zytokin GM-CSF sowohl bei NF1-defizienten als auch bei *Icsbp*-defizienten hämatopoetischen Zellen (Emanuel et al., 1991; Zhang et al., 1998; Scheller et al., 1999; Birnbaum et al., 2000; Kim et al., 2007) So ist vermutlich, neben der Funktion von *Icsbp* als Transkriptionsaktivator von *Nf1*, auch die Funktion als Regulator der myeloischen Entwicklung und somit der *Icsbp*^{-/-} spezifische, zelluläre Phänotyp (d.h. erhöhte Anzahl an Granulozyten und myeloischen Vorläuferzellen) bei der Ausbildung der akuten Leukämien entscheidend.

6.II.1. Negativ additiver Effekt von Icsbp-Defizienz und Nf1-Haploinsuffizienz auf die Nf1 Expression

Eine additiv verstärkte Reduktion der *Nf1* Expression, aufgrund der Kombination von *Icsbp*-Defizienz und *Nf1*-Haploinsuffizienz, im Kontext mit dem *Icsbp*^{-/-} spezifischen, zellulären Phänotypen sollte eine systematische Induktion von akuten Leukämien in den *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäusen bewirken.

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde daher zunächst in primären Knochenmark- bzw. Milzzellen überprüft, ob die *Nf1* Expression basierend auf der *Nf1* Heterozygotität tatsächlich reduziert ist und somit eine *Nf1*-Haploinsuffizienz vorliegt. Zudem wurde die *Nf1* WT-Transkriptmenge in *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Makrophagen bestimmt und ermittelt, ob aufgrund der *Icsbp*-Defizienz und zusätzlichen *Nf1*-Haploinsuffizienz eine (additiv) verstärkte Reduktion der *Nf1* Expression vorliegt.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse zur reduzierten *Nf1* Expression in *Nf1* heterozygoten Mäusen (Jacks et al., 1994): Die quantitativen Real-Time Experimente ergaben gegenüber dem homozygot wildtypischen *Nf1* Allelstatus eine deutliche Reduktion der *Nf1* Expression in den *Nf1*^{+/-} Knochenmark- bzw. Milzzellen.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der *Icsbp*^{-/-} bzw. *Icsbp*^{+/+} Knochenmark- bzw. Milzzellen erlaubte jedoch, aufgrund zell-spezifischer *Nf1* Expressionsraten, keinen direkten Vergleich der *Nf1* WT-Transkriptmengen aller Genotypen. Daher wurden Knochenmark-Makrophagen kultiviert und weitere Real-Time Experimente durchgeführt.

Aufgrund der fehlenden transkriptionellen Aktivierung zeigte sich in den *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/+} Knochenmark-Makrophagen eine durchschnittliche Reduktion der *Nf1* WT-Transkriptmenge von ca. 40% gegenüber der *Nf1* WT-Transkriptmenge der *Icsbp*^{+/+}*Nf1*^{+/+} Knochenmark-Makrophagen. Die Ergebnisse aus den Knochenmark- bzw. Milzzellen für die *Nf1* Heterozygotität bestätigten sich. Auch in den *Icsbp*^{+/+}*Nf1*^{+/-} Knochenmark-Makrophagen war die *Nf1* WT-Transkriptmenge gegenüber *Icsbp*^{+/+}*Nf1*^{+/+} um ca. 45% reduziert.

Zudem zeigte sich ein kooperativer Effekt von *Nf1*-Haploinsuffizienz und *Icsbp*-Defizienz, welcher zu einer additiv verstärkten Reduktion der *Nf1* Expression führte. Die *Nf1* WT-Transkriptmenge in *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Knochenmark-Makrophagen war mit einer durchschnittlichen Reduktion von ca. 60% am stärksten reduziert.

6.II.2. Prä-leukämischer Phänotyp: Konsequenzen der geringen *Nf1* Expression in *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäusen

Die zusätzliche *Nf1*-Haploinsuffizienz führte auf dem *Icsbp*^{-/-} Hintergrund zu Veränderungen im hämatopoetischen System: Vermutlich basierend auf der (additiv) verstärkt reduzierten *Nf1* Expression in Kombination mit dem *Icsbp*^{-/-} spezifischen, zellulären Phänotypen wurde eine gegenüber den *Icsbp*^{-/-} Mäusen nochmals gesteigerte Granulozytose und Myelopoese in den prä-leukämischen *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäusen beobachtet. Dies zeigte sich in einer erhöhten Anzahl an Leukozyten, insbesondere neutrophiler Granulozyten, im peripheren Blut, in den Lymphknoten und in der Milz. Die vergrößerten Milzen der *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäuse markierten dabei eine verstärkte Infiltration mit Zellen und sind ein Kennzeichen für eine MPD (Hasle et al., 2003), die Lebern waren nicht betroffen.

Aufgrund der verstärkt reduzierten *Nf1* Expression ist eine erhöhte RAS-GTP Proteinmenge und somit eine gesteigerte Proliferation der Zellen zu erwarten (erhöhter Ras-GTP Proteinlevel bei *Nf1*-Defizienz: Basu et al., 1992; DeClue et al., 1992; Kim et al., 1995; Bollag et al., 1996; Guha et al., 1996; Largaespada et al., 1996; Lau et al., 2000; Sherman et al., 2000). In Zytokin-stimulierten Knochenmarkzellen bzw. Milzzellen liess sich jedoch keine deutliche Veränderung der Zellzyklusphasen oder eine veränderte Proliferationsrate beim Vergleich der *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} und *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/+} Genotypen beobachten. Vermutlich beruhte die gesteigerte Myelopoese auf einer anteilmäßig sehr kleinen Progenitor-Population, so dass der Effekt der gesteigerten Proliferation im Gesamtzellansatz aus Knochenmark und Milz maskiert wurde.

Zur Bestimmung des Proliferationspotentials einer zahlenmäßig kleinen Vorläuferzellpopulation wurde das Wachstums von Methylcellulose-Kolonien in CFU-Assays untersucht. Die Anzahl der CFU-Kolonien ist dabei ein indirektes Maß für das Proliferationsverhalten, die Apoptoseresistenz und das Selbsterneuerungspotentials dieser Vorläuferzellen.

Es zeigte sich: Knochenmark- und Milzzellen der *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäuse hatten ein erhöhtes Potential zur Bildung von in vitro Kolonien (CFU-GM). Diese Eigenschaft präsentierte sich jedoch erst in der sekundären Kultur und liess daher vermuten, dass die gesteigerte Myelopoese möglicherweise nur bedingt auf einer erhöhten Proliferation beruhte. Möglich ist, dass vor allem ein ausgeprägtes Selbsterneuerungspotential und eine verstärkte Apoptoseresistenz der verantwortlichen Vorläuferzellpopulation die gesteigerte Myelopoese erklären. Denkbar ist jedoch auch, dass für die erhöhten *Icsbp*^{-/-} CFU-GM Zahlen der

primären Kultur andere Progenitoren (z.B. die für die CML-ähnliche MPD der *Icsbp*^{-/-} Mäuse verantwortlichen GMPs, s.u.) verantwortlich sind als für das Ausbilden der gesteigerten Myelopoese und der Leukämien in den *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen und somit diese (GMP) Progenitoren unter primären Kulturbedingungen das Koloniebildungsvermögen der speziellen *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} (*Lin*⁺) Progenitor-Population überdeckt.

Um zu untersuchen, ab welcher Stufe der hämatopoetischen Entwicklung Veränderungen zu beobachten waren bzw. zur Identifikation der verantwortlichen, deregulierten Vorläuferzellpopulation, wurden bekannte, frühe hämatopoetische Vorläuferzell-Populationen (CMP, GMP, CLP, MEP, LMPP, Flt3-) auf ihre Verteilung unter den verschiedenen Genotypen analysiert. Es ergaben sich jedoch keine Unterschiede in der prozentualen Häufigkeit der Vorläuferzellpopulationen zwischen den *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} und *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/+} Genotypen.

Dies stimmte überein mit den Ergebnissen, dass *Nfl* nicht in den frühen myeloischen Progenitor-Populationen CMPs (RT-PCR, Daten nicht gezeigt) und GMPs (GEO Datenbank: GSM27216) exprimiert wird. Da die GMPs für das Ausbilden der CML-ähnlichen MPD in den *Icsbp*^{-/-} Mäusen die verantwortliche Vorläuferzellpopulation bilden (Terszowski et al., 2005), beruht diese MPD damit nicht auf einer reduzierten Expression von *Nfl*.

Nfl konnte jedoch im Knochenmark und in der Milz, bestehend aus hauptsächlich reifen hämatopoetischen Zellen, nachgewiesen werden. Daher war zu vermuten, dass eine reifere, *Lin*⁺ myeloische Vorläuferzell-Population, die möglicherweise bei *Icsbp*-Defizienz angereichert ist und in der die *Nfl* Expression unter Wildtyp-Bedingungen erhöht ist, die verantwortliche Target-Zellpopulation bildet. Die *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} bedingte, (additiv) verstärkt reduzierte *Nfl* Expression in dieser Population ist dann verantwortlich für die gesteigerte Myelopoese und das Ausbilden von Leukämien.

Die primären *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Knochenmark- bzw. Milzzellen bildeten in den CFU-Assays hauptsächlich Makrophagen und Zellen mit „dendritischen“ Zellausläufern aus. Aufgrund dieses Differenzierungsbildes, des Auftretens der Progenitoren in der Peripherie (Milz) und der langen Kultivierbarkeit wurden auch die reiferen, *Lin*⁺ myeloischen Suppressorzellen (GR1⁺CD11b⁺CD31⁺ Zellen) als Targetzell-Population in Betracht gezogen (Bronte et al., 2000; Melani et al., 2003; Serafini et al., 2006). Es ergaben sich jedoch keine Unterschiede in der prozentualen Verteilung dieser Zellen zwischen den relevanten Genotypen. Somit verbarg sich auch hinter dieser Progenitorzell-Population vermutlich nicht der Leukämie-induzierende

Kandidat. Ein möglicher Versuchsansatz zur Identifizierung der Targetzell-Population ist das Durchführen von CFU-Assays mit verschiedensten, aufgereinigten hämatopoetischen (Lin^+) Vorläuferzellen und die Bestimmung des Ras-GTP-Levels bzw. der Proliferationsrate in diesen prozentual kleinen Zellpopulationen. Da der Phänotyp jedoch gänzlich unbekannt ist, bleibt dies eine theoretischer Überlegung.

Ein zusätzlich bemerkenswerter Punkt ist, dass die Myelopoese nicht mit dem Alter der Mäuse zunahm. Es wurde kein gradueller Anstieg der Leukozytenzahl oder des Milzgewichtes von 3 Monate alten, prä-leukämischen Mäusen zu 7-9 Monate alten, prä-leukämischen Mäusen beobachtet. Denkbar ist, dass zusätzliche (epi)genetische Veränderungen (beispielsweise eine biallele Inaktivierung von *Nf1*) zur somit relativ spontanen Progression der MPD zur Leukämie notwendig waren, oder erst ein bestimmter Schwellenwert an deregulierten Vorläuferzellen überschritten werden musste (Zhang et al., 2001).

6.II.3. Kooperative Leukämogenese

Eine reduzierte *Nf1* Expression führte per se nicht zur Ausbildung von akuten Leukämien: In den *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/+}* bzw. *Icsbp^{+/+}Nf1^{+/-}* Mäusen war die *Nf1* Expression um 40-45% reduziert, dennoch traten lediglich in 7,1% bzw. 2,4% der Mäuse Leukämien auf.

Erst in den *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen, mit additiv verstärkter Reduktion der *Nf1*-Expression um 60%, kam es zur gezielten Induktion von akuten Leukämien. In diesen Mäusen lag die Leukämieinzidenz bei 46%.

Dies bewies, dass eine Reduktion der *Nf1* Expression, basierend auf dem Verlust der transkriptionellen Aktivierung respektive der *Nf1* Heterozygotität, nicht ausreicht zur Ausbildung von Leukämien, sondern vermutlich erst ein Schwellenwert für die *Nf1* Expression unterschritten werden muss. Das relative späte Auftreten der Leukämien bei einem durchschnittlichen Alter der *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäuse von 11 Monaten spricht jedoch dafür, dass auch die additiv verstärkte Reduktion der *Nf1* Expression nicht allein das Ausbilden der Leukämien bedingt. Möglicherweise ist die Konsequenz der verstärkt reduzierten *Nf1* Expression in den *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen nur die Erhöhung der Proliferationsrate oder der Selbsterneuerungsrates in einer bestimmten Vorläuferzell-Population. Aufgrund der somit vermehrten Zellteilungen und gehäuften DNA-Replikationsprozesse erhöht sich jedoch die Wahrscheinlichkeit für eine Inaktivierung des *Nf1* WT-Allels (durch Deletion oder Mutationen) oder auch für zusätzliche chromosomale,

epigenetische und/oder genetische Veränderungen, was in Folge die maligne Transformation der Zellen initiiert und das Ausbilden der Leukämien bedingt.

Dies würde erklären, warum das Auftreten der Leukämien in den *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen spontan aus der chronischen Phase heraus, ohne intermediäre Akzelerationsphase, erfolgte und somit keine graduelle Zunahme der Leukozytenzahl, des Milz- und Lebergewichtes zu verzeichnen waren.

Der Hypothese entspricht ebenso die vollständige Inaktivierung der *Nfl* Allele in den Krebszellen (Xu et al., 1992; Shannon et al., 1994; Colman et al., 1995; Miles et al., 1996; Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997; Side et al., 1997; Side et al., 1998), sowie die Ausbildung von JCML-ähnlichen MPDs in Mäusen mit *Nfl*-Defizienz im hämatopoetischen System (Jacks et al., 1994; Largaespada et al., 1996; Le et al., 2004).

Der *Nfl*-Lokus ist als Hotspot für Mutationen charakterisiert, dies begünstigt zusätzlich einen Verlust der Heterozygotität (LOH) beziehungsweise das Auftreten somatischer Mutationen (zur Übersicht: Lee und Stephenson, 2007).

Das frequente Ausbilden von Leukämien in *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen und die sehr geringe Anzahl an Leukämiefällen bei den *Icsbp*^{+/+}*Nfl*^{+/-} Mäusen weist zudem darauf hin, dass das Ausbilden von Leukämien nicht allein von einer reduzierten *Nfl* Expression und einem deregulierten Zellzyklus abhängig ist, sondern auch die Funktion von *Icsbp* als Regulator der myeloischen Entwicklung und damit der *Icsbp*^{-/-} spezifische, zelluläre Phänotyp entscheidend ist.

In den *Icsbp*^{-/-} Mäusen wird die CML-ähnliche myeloproliferative Störung in frühen myeloischen Vorläuferzellen, den GMPs, initiiert (Terszowski et al., 2005). In dieser Progenitor-Population wird *Nfl* jedoch nicht exprimiert (GEO Datenbank: GSM27216). Die Ausbildung der Leukämien in den *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen kann also nicht auf der Basis der GMPs erfolgen, sondern wird vermutlich in einer, in den *Icsbp*^{-/-} Mäusen angereicherten, möglicherweise den GMPs entstammenden, *Lin*⁺ Vorläuferzell-Population initiiert.

Damit ergibt sich für die kooperative Entstehung von Leukämien in den *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen folgendes Modell (Abbildung 40):

In den *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen ist die *Nfl* Expression, aufgrund des negativ additiven Effektes von *Icsbp*-Defizienz und *Nfl*-Haploinsuffizienz, am stärksten reduziert. Dadurch ist die Proliferationsrate oder die Selbsterneuerungsrates in der Leukämie-initiiierenden, unter dem *Icsbp*^{-/-} Hintergrund angereicherten *Lin*⁺ Progenitor-Population erhöht. In Folge der

vermehrten Zellteilungen steigt die Wahrscheinlichkeit für eine bialele Inaktivierung von *Nf1* oder für andere chromosomale oder (epi)genetische Veränderungen. Deren Konsequenzen sind die maligne Transformation der Zellen und das Ausbilden von Leukämien.

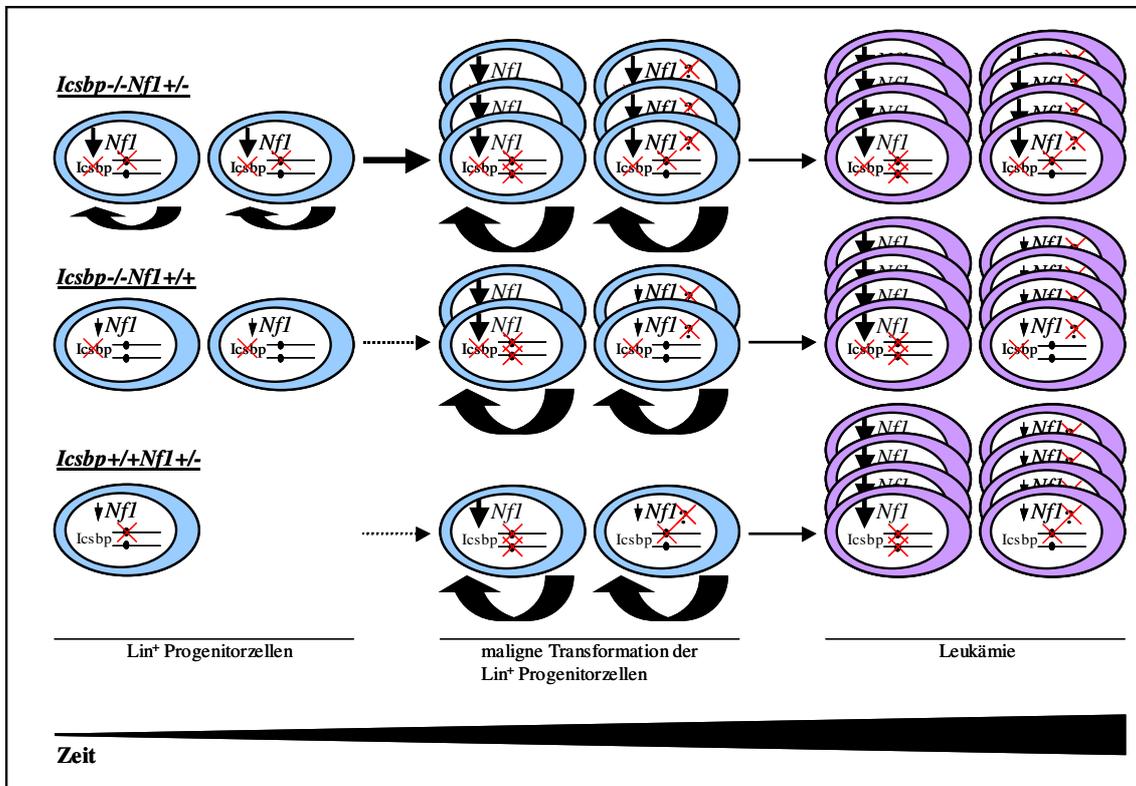


Abbildung 40: Modell zur Entstehung der Leukämien in den unterschiedlichen Genotypen.

Icsbp^{-/-}*Nf1*^{+/-}: Die durch die *Icsbp*-Defizienz und *Nf1*-Haploinsuffizienz bedingte, additiv verstärkte Reduktion der *Nf1* Expression führt zu einer erhöhten Proliferationsrate (oder gesteigertem Selbsterneuerungspotential) der Leukämie-initiiierenden *Lin*⁺ Progenitorzellen. In Folge der vermehrten Zellteilungen steigt die Wahrscheinlichkeit für eine bialele Inaktivierung von *Nf1* und/oder für andere chromosomale oder (epi)genetischer Veränderungen. Diese genetischen Abnormalitäten führen dann zur malignen Transformation der *Lin*⁺ Vorläuferzellen und zur Ausbildung von Leukämien in den Mäusen. *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/+}: In Mäusen mit diesem Genotyp ist zwar, aufgrund des *Icsbp*^{-/-} Hintergrundes, die Anzahl der *Lin*⁺ Progenitoren erhöht, die *Nf1* Expression ist aber, aufgrund des alleinigen Fehlens der transkriptionellen Aktivierung von *Icsbp*, nicht ausreichend reduziert. In Folge der dadurch geringeren Zellteilungsrate und zusätzlich aufgrund des homozygoten *Nf1* Allelstatus ist die Wahrscheinlichkeit für eine bialele Inaktivierung von *Nf1* oder andere genetische Veränderungen verringert. Maligne Transformation der Zellen und Ausbildung von Leukämien ist damit seltener. *Icsbp*^{+/+}*Nf1*^{+/-}: In diesen Mäusen ist die Anzahl der *Lin*⁺ Progenitoren reduziert. Zudem ist die *Nf1* Expression aufgrund der *Nf1* Heterozygotie nicht ausreichend verringert. Demnach ist auch in Mäusen mit diesem Genotyp die Wahrscheinlichkeit für eine bialele Inaktivierung von *Nf1* oder andere genetische Veränderungen, die in Konsequenz die maligne Transformation der Zellen bedingen, reduziert. Durchgestrichenes Fragezeichen (X): chromosomale oder (epi)genetische Veränderungen.

Hingegen ist in den *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/+} Mäusen zwar die Anzahl der verantwortlichen *Lin*⁺ Progenitorzellen erhöht. Aufgrund der, gegenüber den *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäusen, höheren *Nf1* Expression und des homozygoten Status des *Nf1*-Allels ist jedoch die Wahrscheinlichkeit für

eine biallele Inaktivierung von *Nfl* oder für andere genetische Abnormalitäten reduziert. Maligne Transformationen der Zellen und somit das Ausbilden von Leukämien treten daher seltener auf.

In den *Icsbp^{+/+}Nfl^{+/-}* Mäusen liegt *Nfl* zwar im heterozygoten Allelstatus vor, die Wahrscheinlichkeit für einen LOH oder andere genetische Veränderungen ist jedoch aufgrund der höheren *Nfl* Expressionsrate und der verminderten Anzahl der verantwortlichen Lin⁺ Progenitorzellen reduziert. In Folge entwickeln sich in diesen Mäusen sehr selten Leukämien.

Zusammenfassend bedeutet dies: In den *Icsbp^{-/-}Nfl^{+/-}* Mäusen ist die Anzahl der Leukämiefälle zum einen aufgrund der additiv verstärkten Reduktion der *Nfl* Expression, dadurch gesteigerter Zellteilungsvorgängen und erhöhte Wahrscheinlichkeit für chromosomale und (epi)genetischer Veränderungen, und zum anderen aufgrund des *Icsbp^{-/-}* zellulären Phänotypes um das 6-20fache erhöht.

6.II.4. Bedeutung des LOH von *Nfl* bei der Ausbildung der Leukämien

Die prä-leukämischen *Icsbp^{-/-}Nfl^{+/-}* Mäuse entwickelten eine gesteigerte Myelopoese mit, gegenüber dem *Icsbp^{-/-}(Nfl^{+/+})*-Niveau, noch erhöhter Leukozyten- bzw. Granulozytenzahl im Knochenmark und in der Peripherie. Die gesteigerte Myelopoese prädispositionierte die *Icsbp^{-/-}Nfl^{+/-}* Mäuse zur Ausbildung von myeloischen Leukämien. So bildete die überwiegende Mehrheit (73,9%) aller leukämischen *Icsbp^{-/-}Nfl^{+/-}* Mäuse myeloische Leukämien aus, unterteilt in 47,8% der Mäuse mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie und 26,1% der Mäuse mit myelomonozytärer Leukämie. Nur 13% der *Icsbp^{-/-}Nfl^{+/-}* Mäuse entwickelten eine lymphatische Leukämie. Die restlichen 13% der Mäuse bildeten verschiedenste Leukämien aus (biphänotypische Leukämie, Leukämien ohne Ausreifung), in einer Maus fand sich ein Lymphom.

Im prä-leukämischen Stadium blieb die Leukozytenzahl, das Milzgewicht und das Lebergewicht über das Alter der Mäuse konstant. Erst mit der Ausbildung der Leukämien stiegen die Werte an. D.h. in den *Icsbp^{-/-}Nfl^{+/-}* Mäusen entwickelten sich die Leukämien spontan aus der chronischen MPD heraus, ohne Ausbilden einer intermediären Akzelerationsphase.

Insgesamt bildeten somit die *Icsbp^{-/-}Nfl^{+/-}* Mäuse ein geeignetes murines Modell zur Untersuchung der malignen Progression von MPDs zu Leukämien auf dem Hintergrund der additiv reduzierten *Nfl* Expression.

Eine Besonderheit in diesem Maus-Modell zeigte sich bei der Überprüfung der *Nf1* WT-Transkriptmenge und des *Nf1* Allelstatus in den leukämischen Mäusen (Tabelle 3 S. 108):

Ein LOH von *Nf1* war nicht zwingend erforderlich zur Ausbildung myeloischer Leukämien. Lediglich 2 von 8 (25%) der untersuchten *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie zeigten einen LOH von *Nf1*. Dies widerspricht der, aus den Tumorzellen der Neurofibromatose I Patienten und den Experimenten mit *Nf1*-defizienten Mäusen erlangten, z.Zt. allgemein akzeptierten Annahme, dass ein LOH von *Nf1* zur malignen Transformation der Zellen notwendig ist (Xu et al., 1992; Colman et al., 1995; Largaespada et al., 1996; Miles et al., 1996; Sawada et al., 1996; Serra et al., 1997; Le et al., 2004). Jedoch entspricht die Wahrscheinlichkeit für einen LOH von *Nf1* in der Gesamtmenge der *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen mit myeloischen Leukämien (MPD ähnliche und myelomonozytäre Leukämien) mit 40% (4 von 10) in etwa der Wahrscheinlichkeit für einen LOH in Krebszellen von Neurofibromatose I Patienten mit malignen myeloischen Erkrankungen (um 50%) (Shannon et al., 1994; Side et al., 1997).

Demnach ist zu überdenken, ob ein Verlust von *Nf1* (durch LOH) tatsächlich zwingend notwendig für die maligne Transformation der Zellen ist, oder dies nur ein mögliches Resultat aus der generellen genetischen Instabilität von vermehrt proliferierenden Zellen ist. Bestätigt wird die Hypothese des LOH als Begleiterscheinung der genetischen Instabilität in unserem Modell zum einen durch die enge Korrelation des LOH von *Nf1* mit anderen, mittels Array CGH detektierten, chromosomalen Abnormalitäten. Zum anderen zeigten Experimente, dass ein LOH von *Nf1* besonders unter genotoxischem Stress oder bei defektem DNA-Reparaturmechanismus auftritt (Mahgoub et al., 1999; Gutmann et al., 2003).

Für die Überlegung des Verlustes von *Nf1* als zwingend notwendigen Initiator sprechen jedoch die Beobachtungen, dass *Nf1^{+/-}* Zellen nicht allein aufgrund der *Nf1*-Haploinsuffizienz vermehrt proliferieren (Bollag et al., 1996; Largaespada et al., 1996; Zhang et al., 1998). Somit fehlt unter *Nf1^{+/-}* Bedingungen noch der Trigger für die gesteigerte Proliferation. Ein umfangreiches Screening nach chromosomalen und (epi)genetischen Veränderungen in *Nf1^{-/-}* Krebszellen könnte hier Aufschluss geben.

In den hier analysierten *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen ist die erhöhte Proliferation (oder Selbsterneuerung), jedoch bereits, wie die Ergebnisse aus den CFU-Experimenten zeigten, durch die additiv verstärkte Reduktion der *Nf1* Expression gegeben.

Bezüglich der Überlegungen zur Notwendigkeit eines LOH von *Nf1* ist ein weiterer bemerkenswerter Punkt, dass, in unserem Modell, bei den Leukämien mit mehr als 20%

Blastenzellen (myelomonozytäre Leukämie, lymphatische Leukämie, biphänotypische Leukämie) ein LOH von *Nf1* in allen Fällen beobachtet wurde. In den *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie und daher mit einem geringeren Blastenanteil von 5% bis maximal 20% lag jedoch die Wahrscheinlichkeit für einen LOH von *Nf1* bei lediglich 25%. Die Ausbildung dieses Leukämietypus in den *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen ist also offensichtlich von einem LOH von *Nf1*, und damit von einem vollständigen *Nf1*-Verlust, unabhängig und beruht vermutlich auf anderen, mit der Array CGH- und der SKY-Methode nicht detektierbaren, (epi)genetischen Veränderungen. Möglich ist auch, dass alleine die additiv verstärkte Reduktion des *Nf1*-Levels und der *Icsbp^{-/-}* zelluläre Phänotyp die maligne Transformation und das Ausbilden der Leukämie bedingen (Ausführungen s.u.).

Unterstrichen wird die Unabhängigkeit vom LOH dadurch, dass in diesen Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie nur bei den beiden mit Abstand ältesten Tieren (14-15 Monate alt) ein LOH von *Nf1* bestimmt wurde und in 75% (6 von 8) dieser Mäuse keine biallele Inaktivierung von *Nf1* auftrat.

Dennoch zu bedenken ist, dass in diesen Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie ein LOH von *Nf1* möglicherweise nur in einer zu geringen Anzahl von Progenitorzellen vorkommt. In Folge könnte ein LOH von *Nf1* bei dieser Leukämieform, mit hohem Anteil von reifen Zellen im Knochenmark und in der Milz und geringer Anzahl an Blastenzellen, möglicherweise nicht mittels Analyse des Gesamtzellmaterials erkannt werden. Ein LOH von *Nf1* in den vereinzelt Progenitoren würde dann durch andere Zellen mit intaktem *Nf1* WT-Allel vollständig maskiert werden. Dann würde das Ausbilden der MPD ähnlichen myeloischen Leukämien jedoch auf einem parakrinen Effekt basieren. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da Versuche mit Überständen von leukämischen *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Zellen keine gesteigerte Proliferation in nicht leukämischen Zellen induzierten (Daten nicht gezeigt). Zudem finden sich in der Literatur keine Hinweise für parakrine Effekte von *Nf1*-defizienten Zellen. Es wird, im Gegenteil, eher vermutet, dass zur Tumor-Formation im peripheren und zentralen Nervensystem *Nf1^{+/-}* Zellen (z.B. Mastzellen) notwendig sind (zur Übersicht: Rubin und Gutmann, 2005).

Unwahrscheinlich ist weiterhin, dass nur in dieser Leukämieform, ein *Nf1*-Verlust über „loss of function“-Mutationen erfolgte, und somit der bei der Betrachtung des Allelstatus bzw. der Transkriptmenge nicht detektiert werden konnte.

Als Modell zur Entstehung der unterschiedlichen Leukämietypen in den *Icsbp^{-/-}Nf1^{+/-}* Mäusen, unter Berücksichtigung der Bedeutung eines LOH von *Nf1*, ergibt sich also

(Abbildung 41): Die Basis für das Entstehen von Leukämien in den *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen ist die additiv verstärkte Reduktion der *Nfl* Expression und die dadurch erhöhte Proliferation (oder Selbsterneuerung) in den unter *Icsbp*-Defizienz angereicherten, initiiierenden *Lin*⁺ Progenitorzellen.

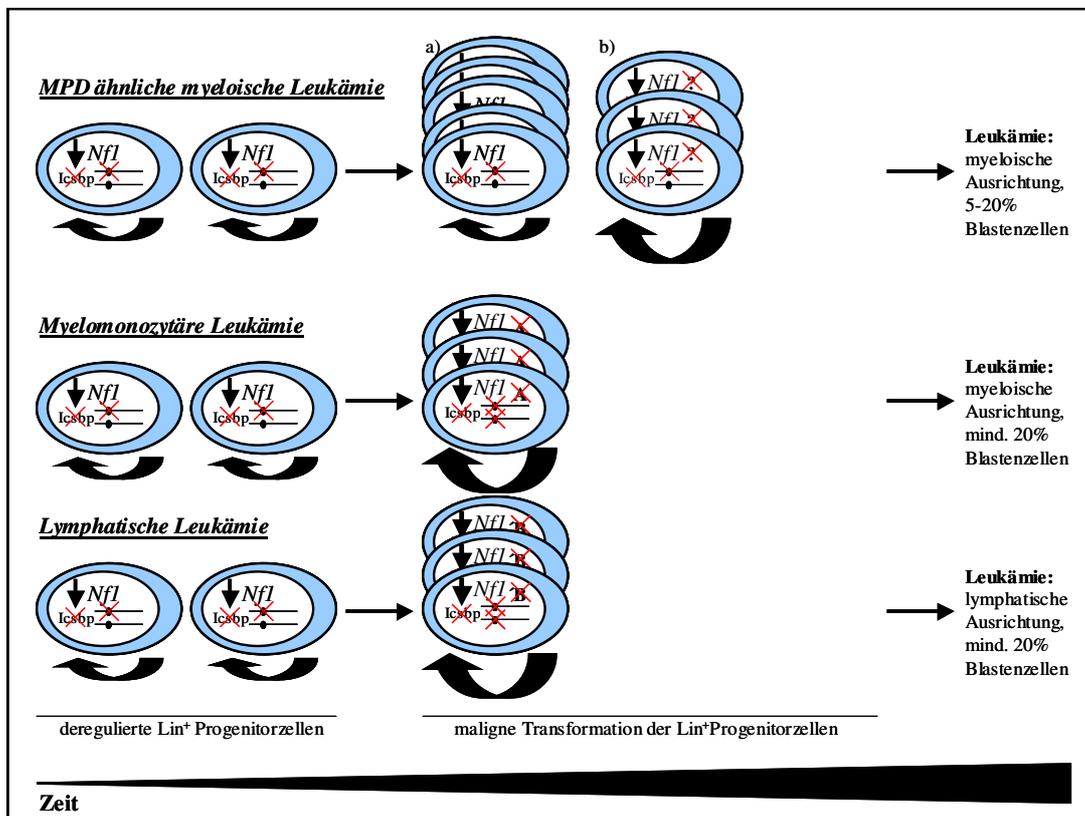


Abbildung 41: Modell zur Ausbildung der unterschiedlichen Leukämietypen in *Icsbp*^{-/-}*Nfl*^{+/-} Mäusen – Bedeutung des LOH von *Nfl*. MPD ähnliche myeloische Leukämie: Für diesen Leukämietyp gibt es zwei unterschiedliche Entstehungsmodelle. a) Die additiv verstärkte Reduktion des *Nfl*-Levels und die erhöhte Anzahl *Lin*⁺ Progenitorzellen sind ausreichend zur malignen Transformation der Zellen. Die lange Latenzzeit ergibt sich dadurch, dass erst ein bestimmtes quantitatives Niveau an malign transformierten Zellen erreicht werden muss bevor Leukämien entstehen (in Anlehnung an: Zhang et al., 2001). b) Zusätzliche genetische Veränderungen bedingen die maligne Transformation, unabhängig vom LOH. Myelomonozytäre Leukämie/Lymphatische Leukämie: Aufgrund der additiv verstärkten Reduktion des *Nfl*-Levels und demnach vermehrter Zellteilungen kommt es zur genetischen Instabilität. Die Wahrscheinlichkeit für chromosomale oder (epi)genetische Abnormalitäten, also auch für einen LOH von *Nfl*, ist erhöht. Ob jedoch der LOH von *Nfl* der Initiator der malignen Transformation ist oder nur eine Begleiterscheinung der genetischen Instabilität, ist nicht im Detail geklärt. Anzunehmen ist aber, dass die zusätzliche genetische Abnormalität den Leukämietyp bestimmt (Abnormalität A: myeloische Ausrichtung, B: lymphatische Ausrichtung).

Für das Ausbilden von MPD ähnlichen myeloischen Leukämien ergaben sich aus den Versuchsergebnissen zwei verschiedene Hypothesen. Zum einen ist möglich, dass die maligne Transformation der Zellen allein auf der additiv verstärkten Reduktion der *Nfl* Expression und auf dem *Icsbp*^{-/-} bedingten erhöhten Anzahl initiiierender *Lin*⁺ Progenitorzellen erfolgt. Die

lange Latenzzeit bis zum Auftreten der Leukämien in den Mäusen lässt sich dann darüber erklären, dass die malign-entarteten Zellen erst mal eine bestimmte quantitative Zellzahl überschreiten müssen, bevor sich eine Leukämie entwickeln kann (in Anlehnung an: Zhang et al., 2001). Weiterhin möglich ist, dass durch die additiv verstärkt reduzierte *Nf1* Expression und der dadurch vermehrten Zellteilungen genetische Veränderungen auftreten, die, unabhängig vom LOH von *Nf1*, eine maligne Transformation der Zellen bedingen.

Myelomonozytäre, lymphatische und biphänotypische Leukämien waren immer mit einem LOH von *Nf1* assoziiert. Der LOH korrelierte jedoch in hohem Maß mit verschiedenen chromosomalen Abnormalitäten. Insgesamt führten diese Veränderungen in den Zellen zu einer, gegenüber den Mäusen mit MPD ähnlicher myeloischer Leukämie, erhöhten Leukozytenzahl im peripheren Blut und einer gesteigerten Zell-Infiltration der Organe, angezeigt über das erhöhte Milz- und Lebergewicht. Welche Veränderung jedoch direkt die Progression zur Leukämie initiiert und welche Veränderung erst in Konsequenz erfolgt, ist nicht im Detail geklärt.

Vermutlich bestimmen aber die zusätzlichen chromosomalen oder (epi)genetischen Veränderungen den Leukämietyp, also die myelomonozytäre, lymphatische oder biphänotypische Ausrichtung.

6.II.5. Ausblick

Die *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Mäuse bilden ein geeignetes murines Modell zur Analyse der Progression von MPDs zu Leukämien auf dem Hintergrund der reduzierten *Nf1* Expression.

Zur Klärung der Signifikanz eines LOH von *Nf1* können *Icsbp*-defiziente Mäuse mit gefloxtem *Nf1*-Allel gezüchtet werden. Unter der Prämisse der zwingenden Notwendigkeit eines LOH von *Nf1* für die maligne Transformation der Zellen, müssten sich in allen Mäusen mit Cre-vermitteltem, deletierten *Nf1*-Allel nach kurzer Latenzzeit Leukämien ausbilden.

Zudem kann der *Icsbp*^{-/-}*Nf1*^{+/-} Hintergrund in neuen Mausmodellen mit gezielten genetische Veränderungen kombiniert werden und, anhand der Frequenz und Latenzzeit der sich entwickelnden Leukämien die Bedeutung dieser spezifischen Veränderung bei der Ausbildung von Leukämie und bzgl. des Leukämietypus ermittelt werden.