

NFE2 Überexpression führt zu leukämischer Transformation in Mäusen mit dem Erwerb AML-spezifischer Aberrationen sowie einer bisher unbeschriebenen sekundären Mutation im Transkriptionsfaktor Nfe2l2: ein neues, hierarchisches Modell der Leukämogenese

Zusammenfassung

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) bilden eine Gruppe maligner Knochenmarkserkrankungen, die entweder mit einer Vermehrung einer oder mehrerer myeloider Zellreihen (Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten) oder einer Verringerung selbiger einhergeht. Letzteres ist besonders bei der Primären Myelofibrose der Fall, bei der das Knochenmark faserig umgebaut wird und es zum Verlust blutbildender Zellen kommt. Allen Erkrankungen gemein ist, dass sie in bis zu über 90% eine Mutation in der Kinase JAK2 aufweisen und ein bis zu dreißigprozentiges Risiko einer Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML) tragen. Etwa die Hälfte der JAK2-mutierten MPN-Patienten mit einer leukämischen Transformation weisen eine JAK2-Wt-Leukämie auf. Diese Beobachtung zeigt, dass die JAK2^{V617F}-Mutation zwar eine große Rolle in der MPN-Krankheitsausprägung spielt, in der leukämischen Transformation andere Faktoren eine ebenso wichtige Rolle einnehmen. In Vorarbeiten haben wir gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor NFE2 in 90% aller MPN-Patienten, unabhängig vom JAK2-Mutationsstatus, überexprimiert ist. Basierend auf dieser Beobachtung haben wir ein transgenes Mausmodell entwickelt, in dem NFE2 überexprimiert ist. NFE2-transgene Mäuse entwickeln einen MPN Phänotyp mit Thrombozytose, Leukozytose, einer Expansion der Stamm- und Progenitor-Zellen und Epo-unabhängigem erythroiden Wachstum.

Zusätzlich zur NFE2-Überexpression haben wir bei MPN-Patienten bisher unbekannte NFE2-Mutationen beschreiben. In bisher unveröffentlichten Studien konnten wir, in Kollaboration mit Peter Valks Gruppe aus Rotterdam, NFE2-Mutationen in AML-Patienten nachweisen. Diese Mutationen führen im Mausmodell ebenso wie die NFE2-Überexpression zu einer erhöhten NFE2-Aktivität, einem MPN-Phänotyp mit den oben genannten Merkmalen, sowie einer leukämischen Transformation in etwa 30% der Tiere. Diese beiden Mausmodelle mit gesteigerter NFE2-Aktivität sind die bisher einzigen MPN-Modelle, die eine spontane Transformation zu einer AML zeigen.

Leukämischen Zellen mit gesteigerter NFE2 Aktivität weisen zusätzliche Aberrationen auf, die auch in Patienten post-MPN-Leukämien beobachtet werden, z.B. Trisomie 8 sowie TP53-Mutationen. Wir konnten zeigen, dass erhöhte NFE2-Aktivität in Mäusen zu stark vermehrter Stammzell-Proliferation führt. Diese Gegebenheit allein fördert das Auftreten von Genmutationen. Darüber hinaus konnten wir belegen, dass eine vermehrte NFE2-Aktivität noch weitere, bisher nicht bekannte spezifische molekulare Veränderungen hervorruft. In fast der Hälfte der NFE2 überexprimierenden Mäuse mit einer Leukämie konnten wir den Erwerb einer bei allen Mäusen identischen somatischen Mutation im Transkriptionsfaktor Nfe2l2 nachweisen. Diese Mutation führt zu einer Reduktion der Proteinfunktion und dadurch zu erhöhtem oxidativem Stress mit vermehrten DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der vermehrten NFE2-Aktivität und dem Erwerb der Nfe2l2-Mutation um kooperierende Ereignisse im Entstehungsprozess der Leukämie handelt. Wir können darauf basierend erstmals, ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom, ein hierarchisch gegliedertes Modell zur Entstehung von Leukämien aufstellen. Darauf aufbauend können wir nun neue therapeutische Zielstrukturen aufzeigen.

Verwendete Methoden und erzielte Ergebnisse

Diagnose der Mäuse mit Transformation zu einer akuten Leukämie sowie von Kontrollmäusen

Wir haben 28 Mäuse, die durch eine erhöhte NFE2-Aktivität eine Leukämie entwickelt haben, identifiziert und detailliert hämatologisch charakterisiert. Die erhöhte NFE2-Aktivität wurde entweder durch vermehrte Expression des wildtypischen Proteins hervorgerufen, oder durch die Expression von NFE2-Mutationen, die ebenfalls zu vermehrter NFE2-Aktivität führen¹. Zudem wurden 18 Kontrollmäuse, die durch vermehrte NFE2-Expression eine Myeloproliferative Neoplasie (MPN) entwickelten, welche jedoch nicht in eine Leukämie transformierte, analysiert. Aus den insgesamt 46 Mäusen wurde genomische DNA aus der Milz oder aus dem Knochenmark gewonnen. Ausschlaggebend für die Wahl des Organs war die Anzahl der Blasten. In Mäusen entwickeln sich Leukämien, im Gegensatz zum Menschen, häufig nicht nur im

Knochenmark, sondern primär aus der Milz. In diesen Mäusen ist das Knochenmark weniger betroffen, die höchste Blasten-Konzentration findet sich in der Milz. Für die Analyse wählten wir daher jeweils das Organ mit der höchsten Blasten-Zahl.

Gewinnung genomischer DNA zur Analyse von copy number variations (CNV)

Eine methodische Schwierigkeit bestand darin, dass die murine Leukämie, sehr ähnlich der Erkrankung im Menschen, unbehandelt häufig einen fulminanten Verlauf nimmt, und die Tiere sehr plötzlich versterben. Daher gelingt es nicht immer, frische, lebende Zellen oder frisches Gewebe zu entnehmen. Häufig bleibt für die Analyse nur die Option einer Autopsie, welche nicht immer unmittelbar durchgeführt werden kann. Unter dem leider unvermeidlichen Zeitverlust leidet die Qualität der angefertigten Paraffin-Präparate. Daher sind manche der Mäuse als „histologisch nicht beurteilbar“ markiert. Sofern das letzte Blutbild charakteristisch für eine Leukämie war (ausgeprägte Leukozytose bei gleichzeitig vorhandener Anämie und Thrombopenie) haben wir die Diagnose „AML im Blutbild“ vergeben.

Wenn eine Leukämie nur post mortem diagnostiziert werden konnte, ist die einzige Möglichkeit für die Gewinnung von DNA die Aufreinigung aus den in Paraffin eingebetteten Organen. Diese DNA ist jedoch durch die Fixierung stark fragmentiert, was für die array-based comparative genomic hybridization (array-cGH) eine große methodische Herausforderung darstellt. Wir entwickelten eine Methode, auch aus post mortem gewonnenen Organen, qualitativ hochwertige, für eine array cGH verwendbare DNA aufzureinigen.

Array-cGH-Analyse

Die gewonnene DNA leukämischer und an MPN erkrankter Mäuse wurde im array-cGH auf chromosomale Änderungen untersucht. Dazu wurde die DNA jeweils einer einzelnen Maus mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Zeitgleich wurde eine Kontroll-DNA, die aus Milzen oder Knochenmarkkern eines großen Pools (n=10) gesunder Mäuse hergestellt wurde, mit einem zweiten fluoreszierenden Farbstoff markiert. Die beiden markierten DNAs wurden zu gleichen Mengenanteilen gemeinsam auf einem Chip hybridisiert, auf dem sich genomische DNA-Fragmente befinden.

In der Auswertung wird die Intensität der beiden fluoreszierenden Farbstoffe auf jedem chromosomalen Lokus des Chips betrachtet. Sind in der DNA der zu untersuchenden Maus keine chromosomalen Veränderungen aufgetaucht, hybridisieren Test-Maus-DNA und Kontroll-DNA zu gleichen Teilen, und es entsteht eine gerade Linie auf der mit „0“ markierten Höhe der Y-Skala (Abb. 1A). Hat die DNA der zu untersuchenden Maus jedoch genomisches Material verloren, fällt die Auswertungs-Linie unter die „0“ Höhe, ist eine Duplikation genetischen Materials aufgetreten, liegt die Linie über der „0“ Höhe (Abb. 1B). Verlust oder Gewinn genetischen Materials wird als „copy number variation (CNV)“ bezeichnet.

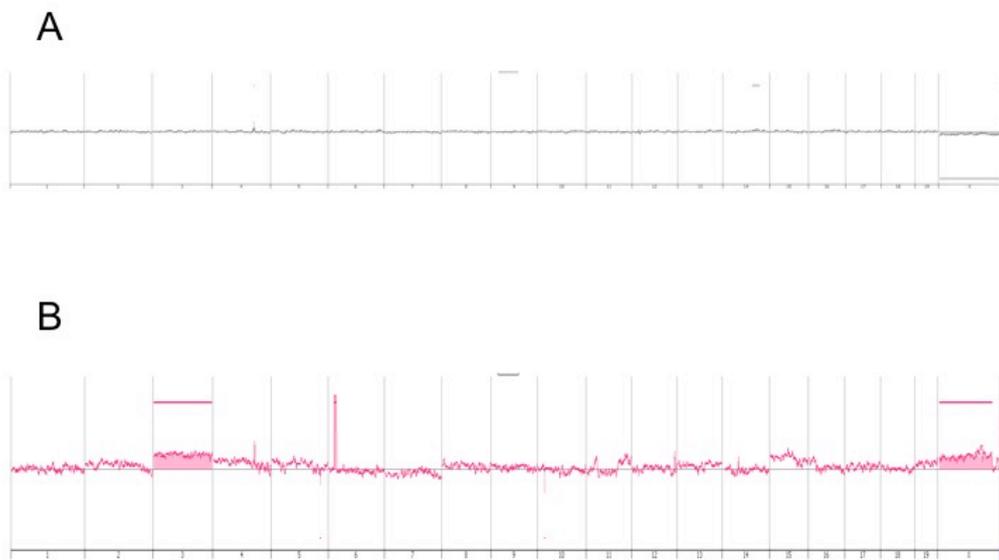


Abbildung 1: Exemplarische array-cGH-Ergebnisse NFE2 überexprimierender Mäuse die (A) eine AML ohne chromosomale Veränderung (Maus TxJ 21), oder (B) eine Leukämie mit chromosomaler Veränderung (Maus TxS 42) entwickelten. In (B) sind die veränderten Regionen (hier jeweils Gewinn genetischen Materials) durch Balken oberhalb der Hybridisierungs-Linie markiert.

Über die Hälfte der Mäuse mit leukämischer Transformation zeigen chromosomale Aberrationen

Die Bezeichnungen und Diagnosen der untersuchten Mäuse sowie die An- oder Abwesenheit von CNV sind in Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Von den 28 Tieren, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, konnten aufgrund mangelnder DNA-Menge nur 18 im array cGH untersucht werden.

Insgesamt zeigten 10 der 18 untersuchten Tiere mit Leukämie (56%) jedoch keines der 14 Kontroll-Tiere (s. Tab. 2) einen Gewinn oder Verlust genetischen Materials ($p=0.0004$). Auf die gefundenen Aberrationen wird im nächsten Absatz eingegangen.

Tabelle 1: Bezeichnung und Diagnosen NFE2 überexprimierender Mäuse, die eine Leukämie entwickelten. MPD: Myeloproliferative Disease (weiterhin verwendete Bezeichnung für eine MPN in der Maus); MDS: Myelodysplastisches Syndrom; AML: Akute Myeloische Leukämie; n.b: nicht beurteilbar; n.d.: nicht durchgeführt.

Maus	Sekundäre Transplantation Spender-Tier	Diagnose nach Kogan ²	Aberration Array cGH
TxJ 8		Histologisch n.b. AML im Blutaussstrich	ja
TxJ 21		AML mit Ausreifung	keine
TxJ 32		AML ohne Ausreifung	n.d.
TxJ 40		granulozytäres Sarkom	keine
TxJ 42		Zytopenie mit erhöhten Blasten	keine
TxJ 43		AML mit Ausreifung	n.d.
TxJ 44		MPD-ähnliche Leukämie	n.d.
TxJ 45		Lymphom	n.d.
TxJ 47		Akute Leukämie	n.d.
TxJ 50	TxJ 15 (n.b.)	AML ohne Ausreifung	n.d.
TxJ 77		MPD-ähnliche Leukämie	n.d.
TxJ 79		MPD-ähnliche Leukämie	n.d.
TxJ 92		beginnende Akute Leukämie	n.d.
TxJ 101	TxJ 14 (MPD)	Histologisch n.b.	n.d.
TxJ 108	TxJ 21 (MPD)	Histologisch n.b.	ja
TxJ 653		Lymphom	keine
TxS 24		Histologisch n.b. AML im Blutaussstrich	ja
TxS 35		MML	keine
TxS 37		MPD-ähnliche Leukämie	keine
TxS 39		AML ohne Ausreifung	ja
TxS 40		Myelosarkom	ja
TxS 42		Histologisch n.b. AML im Blutaussstrich	ja
TxS 56		MDS/AML	ja
TxS 63		Histologisch n.b. AML im Blutaussstrich	ja
sTxS 882	TxS 39 (AML)	Histologisch n.b. AML im Blutaussstrich	keine
sTxS 883	TxS 39 (AML)	AML mit Ausreifung	keine
sTxS 942	TxS 35 (MML)	Tumor an Transplantations-Stelle	ja
sTxS 943	TxS 35 (MML)	Tumor an Transplantations-Stelle	ja

Tabelle 2: NFE2 überexprimierende Mäuse, die keine Leukämie entwickelten, und deren DNA in array-cGH-Analysen auf chromosomale Veränderungen analysiert wurde. MDS: Myelodysplastisches Syndrom; MPD: Myeloproliferative Disease; n.b.: nicht beurteilbar

Maus	Diagnose nach Kogan²	Aberration Array cGH
TxJ 3	MDS	keine
TxJ 4	Histologische n.b. MPD im Blut	keine
TxJ 16	MPD	keine
TxJ 17	genetische MP	keine
TxJ 19	MPD	keine
TxJ 22	MPD	keine
TxJ 24	Histologische n.b. MPD im Blut	keine
TxJ 25	MDS	keine
TxJ 29	MDS	keine
TxJ 31	MPD	keine
TxJ 41	Histologische n.b. MPD im Blut	keine
TxJ 84	Histologische n.b. MPD im Blut	keine
TxJ 651	Histologische n.b. MPD im Blut	keine
TxJ 654	MPD	keine

Duplikation des Myc Gens als rekurrente Aberration

Die in den 10 leukämischen Tieren gefundenen Aberrationen wurden in einem sogenannten Commute-Plot aufgetragen, um graphisch darzustellen, welche Veränderungen auftreten und um zu untersuchen, ob verschiedene Mäuse dieselbe Veränderung zeigen (Abb. 2). Aus anderen Krankheitsmodellen ist bekannt, dass immer wieder gemeinsam auftretende Mutationen in Mäusen einen Hinweis auf kooperierende Faktoren und deren spezifische Abfolge geben können. Die Kenntnis kooperierender Faktoren ist entscheidend für das Verständnis der molekularen Ätiologie einer Krankheit. Erst wenn diese Faktoren bekannt sind, kann ein Modell zur Krankheitsentstehung postuliert und überprüft werden.

Das wohl bekannteste Modell von kooperierenden und hierarchisch aufeinanderfolgenden Mutationen ist die Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom¹⁷. Hierbei kommt es zunächst über die Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgenes zu Mutationen in K-Ras-Proto-Onkogen und der Entwicklung eines Adenoms. Im Folgenden kommt es zu Mutationen in DCC-Tumorsuppressorgen und letztlich auf Stufe des voll entwickelten Karzinomes zu einer Inaktivierung des TP53-Tumorsuppressorgens.

In den NFE2 überexprimierenden, leukämischen Mäusen fällt auf, dass es in 5 der 10 Tiere (50%) zu einer Amplifikation des murinen Chromosoms 15 kommt (Abb. 2). Das murine Chromosom 15 ist in großen Teilen homolog zum humanen Chromosom 8, d.h. es trägt die murinen Entsprechungen der Gene, die im Menschen auf Chromosom 8 kodiert sind. Ein Zugewinn genetischen Materials auf dem murinen Chromosom 15 entspricht also der menschlichen Trisomie 8. Diese Veränderung wird in AML-Patienten häufig beobachtet⁴⁻⁷ und geht in über 60-jährigen Patienten und bei sekundärer AML mit einer schlechten Prognose einher.

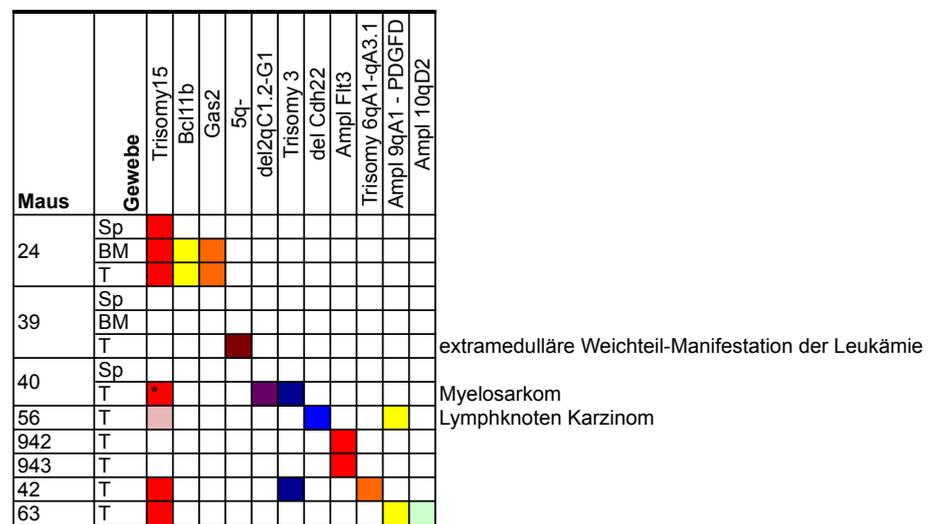


Abbildung 2: Genetische Veränderungen in leukämischen Mäusen mit einer erhöhten NFE2-Aktivität, aufgetragen als Commute-Plot.

Spalte 1: identifizierende Mausnummern, analog zu Tabelle 1 (auf den „TxJ“ oder „TxS“ Teil der Bezeichnung wurde zur bessern Anschaulichkeit verzichtet).

Spalte 2: untersuchtes Gewebe: „Sp“: Milz (Spleen); „BM“ Knochenmark (bone marrow); T „Tumor“, in diesen Mäusen eine Weichteilmanifestation der AML, eine in Mäusen häufig beobachtete, in Menschen sehr seltene auftretende Form der Leukämie.

Restliche Spalten: beobachtete Veränderungen. Anwesenheit ist durch farbliche Markierung des entsprechenden Feldes gekennzeichnet. Leere Felder zeigen, dass die betreffend Maus diese Veränderung nicht zeigt.

Besonders Bemerkenswert ist der Befund in Maus 40 (in Abb. 2 durch einen * gekennzeichnet). In dieser Maus wurde lediglich genetisches Material eines kleinen Teils von Chromosom 15 hinzu gewonnen (Abb. 3). Es handelt sich um einen Abschnitt von nur 1.9 Mb, auf dem sich 3 Gene befinden: Myc, Pvt1 und H2afy3. Letzteres ist ein Histon 2A Gen und spielt daher als strukturelles Protein voraussichtlich in der Leukämogenese keine Rolle. Die beiden erstgenannten Gene hingegen fungieren gemeinsam⁸⁻¹⁰. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das eine lange, nicht-kodierende RNA beinhaltende Pvt1-Gen als Aktivator von Myc wirkt. Eine Amplifikation des Pvt1-Gens ist Voraussetzung für eine erhöhte Myc Proteinexpression¹⁰, welche in diversen Neoplasien beobachtet wird, und mit einer schlechten Prognose einhergeht.

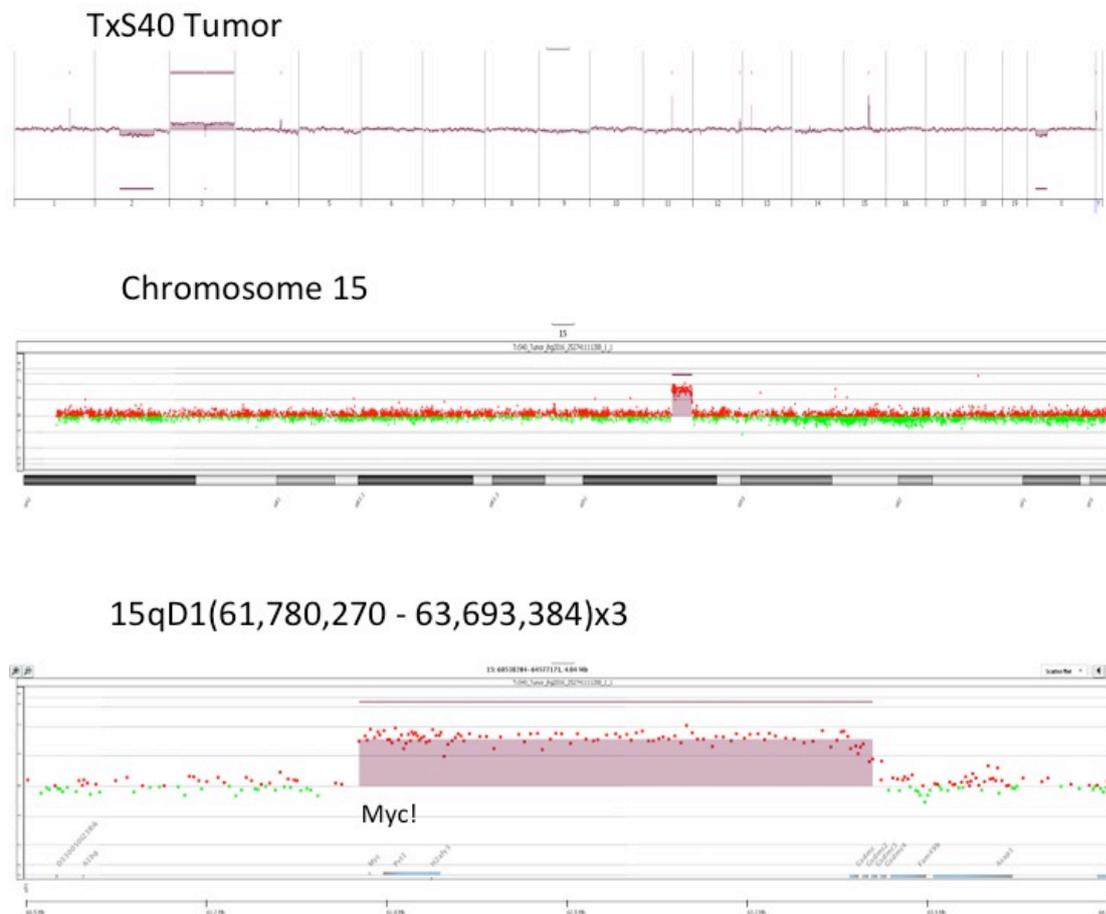


Abbildung 3: (Oben) gesamtes array-cGH-Ergebnis der Maus 40, analog zu Abb. 1. (Mitte) Vergrößerung des Chromosoms 15 aus Abb. 3, oben. (Unten) Vergrößerung des amplifizierten Abschnitts auf Chromosom 15, Bande qD1, aus Abb. 3, Mitte. Am unteren Rand in blau eingezeichnet sind die drei Gene, die im amplifizierten Abschnitt liegen.

Die 1.9 MB große Amplifikation auf Chromosom 15 hat noch eine weitere sehr bemerkenswerte Eigenschaft: sie umfasst genau noch den myc „super-enhancer“¹¹, welcher 1.7 MB „downstream“ des myc Genes liegt und für dessen Expression verantwortlich ist, unmittelbar danach endet sie. Unter den nun insgesamt 9 Mäusen unseres Labors mit NFE2-Überexpression und Amplifikation des Chromosoms 15, (4 Beobachtung ohne Mechanismus in Kaufmann et al., J. Ex. Med. 2012 publiziert³ und 5 hier gezeigte, noch unveröffentlicht) erfüllt die Amplifikation in Maus 40 die Voraussetzungen einer „minimally amplified region“: sie zeigt den kleinstmöglichen DNA-Abschnitt an, der benötigt wird, um die kooperierende Funktion des amplifizierten Gens zu ermöglichen.

Diese Daten ermöglichen es uns, ein Modell über die molekularen Mechanismen aufzustellen wie es durch eine erhöhte NFE2-Aktivität zur leukämischen Transformation kommt. Wir postulieren, dass erhöhte Myc-Expression und -Aktivität mit gesteigerter NFE2-Aktivität kooperiert und zum Übergang einer MPN in eine Leukämie führt.

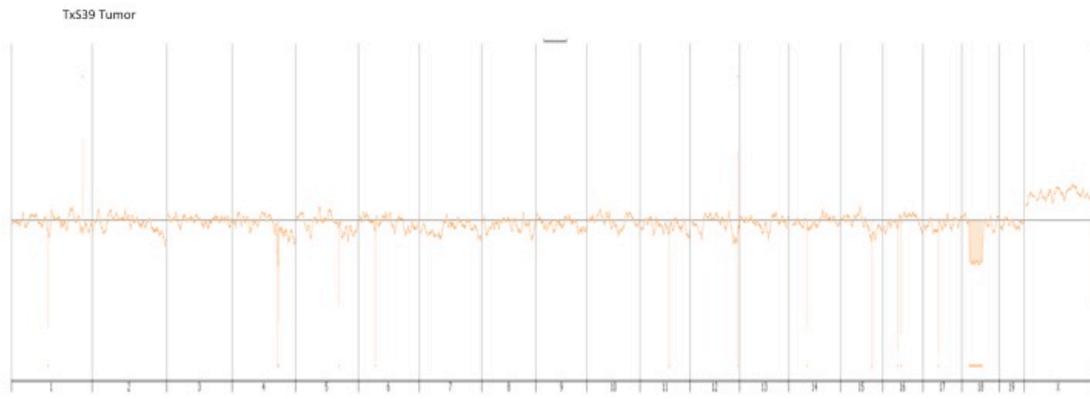
Da eine erhöhte Myc Aktivität in viele Neoplasien vorliegt und in hohem Maße zu deren Malignität beiträgt, werden derzeit diverse Ansätze verfolgt, um therapeutisch zu intervenieren¹². Obwohl Myc lange Zeit als „undruggable“ galt, gibt es in letzter Zeit hoffnungsvolle Fortschritte¹². Sollten wir in weiterführenden Untersuchungen zeigen können, dass eine leukämische Transformation durch Senkung der Myc Aktivität verhindert werden kann, wäre dies eine molekulare Rationale zur Anwendung der neuen Wirkstoffe bei Hoch-Risiko MPN-Patienten. Ziel wäre es, eine leukämische Transformation, die mit einer Lebenserwartung von nur wenigen Monaten einhergeht, zu verhindern oder zumindest hinauszuzögern.

NFE2 überexprimierende Mäuse erwerben weitere, in AML-Patienten bekannte Aberrationen

Weitere leukämische Mäusen zeigten ebenfalls genetische Veränderungen, die auch bei AML Patienten beobachtet werden (Abb. 4). Besonders herausheben hierbei ist die Maus 39, welche in der extramedullären Präsentation ihrer AML eine Deletion des murinen Chromosoms 18 (Abb. 4) zeigte. Die in der Maus deletierte Region entspricht genau der „minimally deleted region“ in AML Patienten auf dem humanen Chromosom 5. Faszinierenderweise gibt es auch bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) eine „minimally deleted region“ auf Chromosom 5, welche das sogenannte „5q minus Syndrom“ auslöst. Diese MDS Region ist jedoch distinkt von der AML Deletion. In Maus 39 ist nun exakt die der AML Deletion homologe Region betroffen, die MDS Region ist intakt (Abb. 4).

In der AML Deletions-Region liegen zwei Gene, Egr1 und APC, von denen die Arbeitsgruppe um Michelle Le Beau zeigen konnte, dass sie kooperieren, und gemeinsam einen MPN Phänotyp auslösen¹³⁻¹⁵. Alleine waren sie jedoch nicht hinreichend, um eine AML zu bewirken. In Kooperation mit Verminderung der

Aktivität des Trp53 (\cong humanes TP53 bzw. p53) Tumorsuppressors, führten Haploinsuffizienz von Egr1 und APC jedoch zur Entstehung einer AML¹³⁻¹⁵. Trp53 wird als „guardian of the genome“ beschrieben, da dessen verminderte Aktivität mit einer erhöhten Rate an Mutationen einher geht.



Tx539 Tumor del18(qA1qD1) 33.4MB

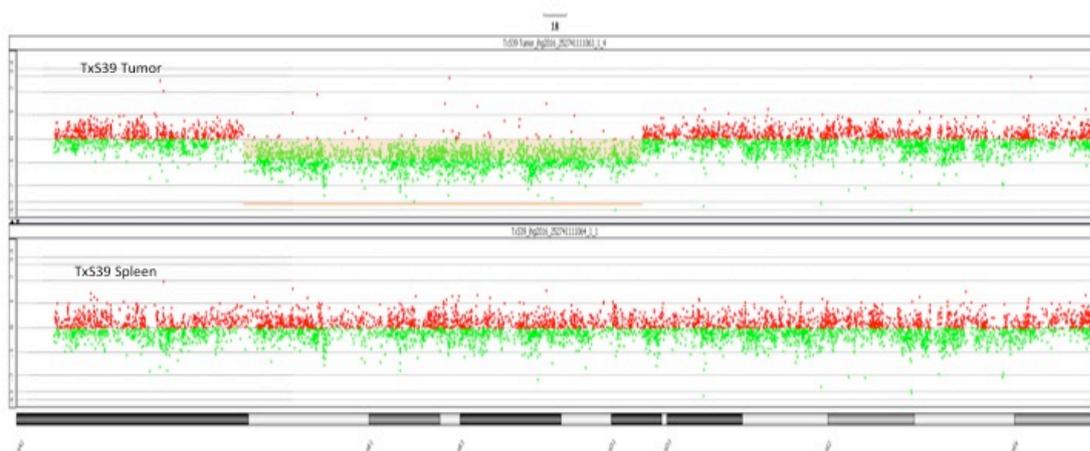


Abbildung 4: (Oben) gesamtes array-cGH-Ergebnis des Tumors der Maus 39, analog zu Abb. 1.

(Unten) Vergrößerung des amplifizierten Abschnitts auf Chromosom 18, Banden qA1-qD1, aus Abb. 4, oben

NFE2 überexprimierende Mäuse erwerben Mutationen im Trp53-Tumorsuppressorgen

Verlust der Trp53-Aktivität wird in nahezu der Hälfte aller Neoplasien beobachtet¹⁶. Zur Aktivitätsminderung können sowohl Mutationen als auch der Verlust mindestens

eines Allels beitragen. Auch in AML Patienten sind p53 Mutationen beschrieben, die mit einer sehr schlechten Prognose einher gehen. Obwohl bis dato in AML-Mausmodellen der in AML Patienten beschriebene sekundäre Erwerb von Trp53 noch nicht gezeigt worden ist, untersuchten wir, ob erhöhte NFE2-Aktivität zum Erwerb einer Trp53-Mutation in unseren leukämischen Mäusen führt. Wir untersuchten die in Tabelle 1 aufgeführten Mäuse auf Mutationen in den Exonen 5-8 des Trp53-Gens. Aus den insgesamt 28 sequenzierten Mäusen zeigten 3 (11%) eine Mutation im Trp53-Gen, Maus TxS 56 Arg270His, Maus TxJ 50 Lys289Glu sowie Maus TxS40 Lys129Thr. Alle drei Mutationen an den homologen Aminosäuren (273, 292, 132) sind in Patienten beschrieben, Arginin 270 stellt sogar einen „hot spot“ dar, eine Aminosäure, die besonders häufig mutiert ist. Es handelt sich hiermit unseres Wissens um die erste Beschreibung des Erwerbs spontaner Trp53-Mutationen in der Leukämogenese in einem MPN/AML-Mausmodell.

NFE2 überexprimierende Mäuse erwerben Mutationen im Transkriptionsfaktor und Sauerstoffradikalregulator Nfe2l2

Neben größeren Aberrationen wie dem Zugewinn oder Verlust ganzer Genomabschnitte und dem Erwerb bekannter AML-Mutationen, wollten wir wissen, ob die NFE2 überexprimierenden Mäuse auch neue, bisher unbekannte kooperierende Mutationen erwerben. Hierzu haben wir zunächst drei leukämische Proben in Kollaboration mit Peter Valk aus Rotterdam mittels whole exome sequencing (WES) untersucht. Mit dieser Methode konnten alle kodierenden Genabschnitte der jeweiligen Mäuse auf Veränderungen untersucht werden.

Zwei der drei sequenzierten Mäuse wiesen eine identische Mutation auf, die zu einem einzelnen Aminosäureaustausch in dem Transkriptionsfaktor Nfe2l2 führt (Q577P).

Diese exakte Mutation ist bisher nicht beschrieben worden. Ebenso hat bisher noch niemand NFE2L2-Mutationen in AML-Patienten beschrieben. Allerdings ist NFE2L2 in bis zu 20% der Lungenkarzinomen mutiert.

Aufgrund dieser Daten entschieden wir uns, weitere leukämische Proben, unabhängig vom Aberrationsstatus (s. Tabelle 1), mittels Sanger-Sequenzierung spezifisch auf diese Mutation zu untersuchen. Von insgesamt 25 Proben konnten wir bei 12 Proben

dieselbe Q577P-Mutation detektieren (48%). Wir sequenzierten daraufhin 9 Proben von Tieren, die die Diagnose MPN bekamen bzw. deren Blastenzahl zwar erhöht war, jedoch nicht den Kriterien einer AML genügten. Eine Maus (11%) wies diese Mutation in Nfe2l2 auf.

Mehrere leukämische Mäuse zeigten gleichzeitig auftretende Veränderungen: 4 der 12 Nfe2l2 mutierten Proben (33%) wiesen zusätzlich eine Trisomie 15 auf, drei weitere Proben (25%) Mutationen in Trp53. An der Nfe2l2 Mutation ist nicht nur interessant, dass sie viel häufiger in leukämischen Zellen auftrat (48% vs. 11%, $p=0.016$), sondern auch, dass sie in der Frequenz der betroffenen Zellen zwischen subklonalem Level um die 15% (verifiziert mittels WES) bis hin zu homozygotem Auftreten (100%) schwankte. Aufgrund der unterschiedlichen Frequenzen gleichzeitig auftretender Mutationen, kann eine klonale Hierarchie für zwei der Nfe2l2-mutierten Mäuse hergeleitet werden (s. Abbildung 5). In beiden Fällen wurde die Nfe2l2-Mutation vor der dazu gewonnenen Trp53-Mutation erworben. Ebenso kam es in beiden Fällen zur Homo- bzw. Hemizygotie der Mutation in Nfe2l2, entweder durch Erwerb einer Mutation im zweiten Allel oder, deutlich wahrscheinlicher, durch den Verlust des wildtypischen Allels (so genannte loss of heterozygosity, LOH). Im Falle der Maus TxJ40 konnte die klonale Hierarchie sogar auf das Ursprungsgewebe, die Milz, zurückgeführt werden, in der die Mutation im heterozygoten Zustand vorlag, jedoch begleitet von einer Trp53 Mutation. In der soliden Manifestation (Tumor) der myeloiden Malignität jedoch lag die Mutation dann im homozygoten Zustand vor während Trp53 unmutiert war. Dies lässt den Schluss zu, dass die Mutation in Nfe2l2 vor derjenigen in Trp53 erfolgt sein muss. In der Milz erwarben Nfe2l2 mutierte Luekämie-Zellen zusätzliche eine Trp53 Mutation, die den distalen Tumor bildenden Zellen hingegen verloren das wildtypische Allel von Nfe2l2

Um die funktionelle Konsequenz der Nfe2l2 Q577P Mutation zu testen, klonierten wir die mutierte cDNA und exprimierten sie in Zelllinien. Mittels Luciferase-Assays war es möglich, nachzuweisen, dass die Mutante eine signifikant reduzierte Transaktivierungsaktivität gegenüber dem wildtypischen Protein aufweist. Daraufhin konnten wir zeigen, dass in Q577P exprimierenden Zellen, die Proteinexpression des Nfe2l2 Zielgens NQO1 ebenfalls signifikant erniedrigt ist. Nfe2l2 ist bekanntermaßen

ein bedeutender Regulator des oxidativen Stresses innerhalb der Zelle, indem es die Genexpression von Proteinen hochreguliert, die zur Reduktion von Sauerstoffradikalen führen^{18,19}. Wir konnten zeigen, dass Zellen, die diese Nfe2l2-Mutation tragen und einer Umgebung hohen oxidativen Stresses ausgesetzt sind, signifikant mehr Sauerstoffradikale im Vergleich zu Zellen mit wildtypischem Nfe2l2 aufweisen. Hohe Sauerstoffradikale sind eine potentielle Mutationsquelle, da sie zu vermehrten DNA-Schäden führen. Wir konnten daraufhin zeigen, dass mutiertes Nfe2l2 tragende Zellen gegenüber wildtypischen Zellen ein deutlich erhöhtes Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen aufweisen. Detektiert wurde dies mittels Durchflusszytometrie anhand der Positivität sowie Intensität an phosphoryliertem γ H2A.x. Diese Histonphosphorylierung ist eine der klassischen Surrogate für DNA-Doppelstrangbrüche²⁰. Diese genomische Instabilität kann, vor allem bei gestörtem DNA-Reparaturmechanismus, zu der Anhäufung von Mutationen und Verlust genetischen Materials führen.

Der von uns aufgezeigte Mechanismus erklärt, wie es in Nfe2l2-mutierten Zellen zum Erwerb weiterer Mutationen wie bspw. Trp53 kommen kann.

Zurzeit testen wir das Wachstumsverhalten von NFE2-Nfe2l2-doppelmutierten Zellen mit der Absicht NFE2-überexprimierende-Nfe2l2-mutierte Knochenmarkszellen zu transplantieren, um deren direkte leukämogene Wirkung zu untersuchen. Parallel sequenziert P. Valk seine Kohorte von mehr als 1000 AML-Patienten auf das Vorhandensein von NFE2L2-Mutationen. L. Bullinger aus Ulm, der parallel eine Gruppe von 30 post MPN-AML-Patienten sequenziert hat, war in der Lage eine NFE2L2-Mutation in einem Patienten zu detektieren, die sich von der in der Maus gefundenen unterscheidet. Derzeit untersuchen wir diese Mutation funktionell.

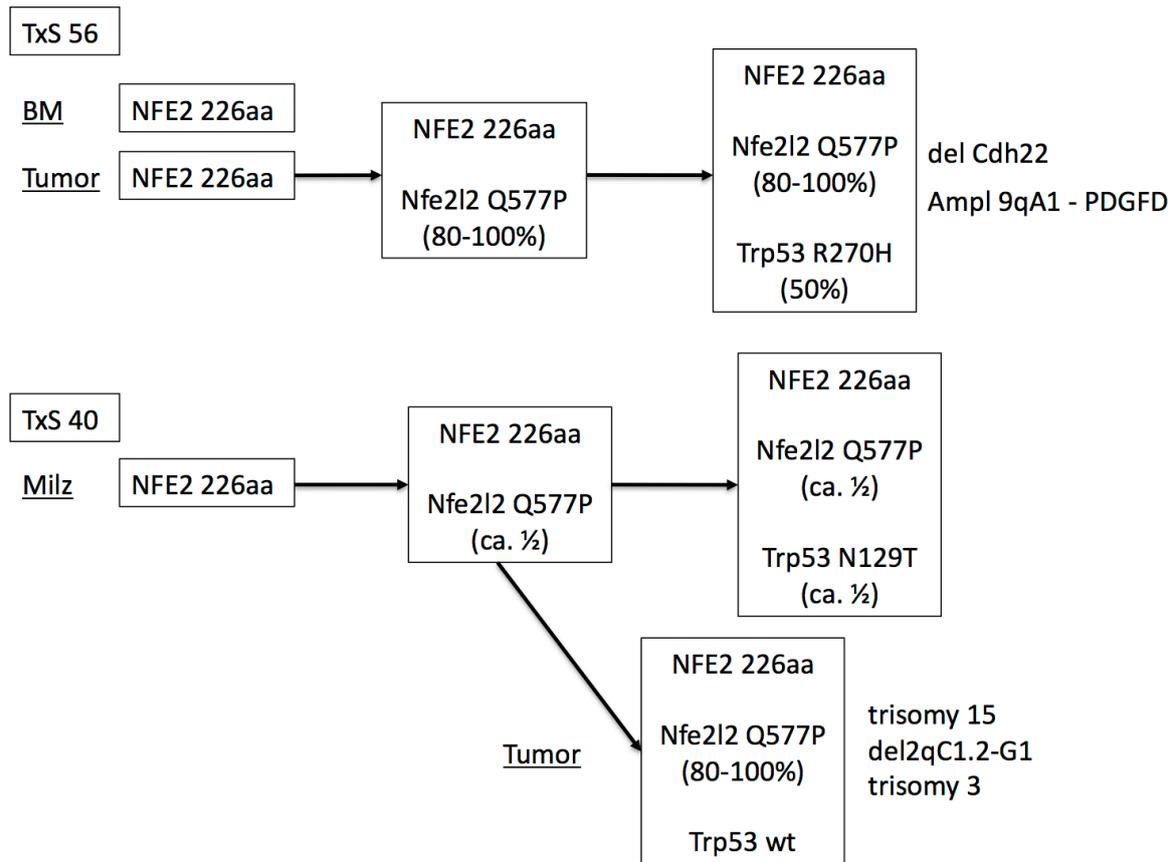


Abbildung 5: Hierarchische Darstellung des Erwerbs sekundärer Mutationen nach Gewebe der Maus 56 (**Oben**) und 40 (**Unten**). BM: Knochenmark

Weitere wiederholt auftretende Aberrationen

In Abb. 4 ist gezeigt, dass noch neun weitere chromosomale Veränderungen an NFE2 überexprimierenden leukämischen Mäusen auftraten. Drei von diesen, die Trisomie des murinen Chromosom 3, die Amplifikation des Flt3 Gens und eine Amplifikation des PDGF-D Gens traten unabhängig bei jeweils zwei Mäusen auf und stellen somit sehr spannende Kandidaten für weitere, mit NFE2 kooperierende Veränderungen dar.

Ausblick

Mit der Entschlüsselung der durch die NFE2-Überexpression hervorgerufenen, molekularen Veränderungen konnten wir einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der Leukämieentstehung leisten. Wir können darauf basierend erstmals, ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom, ein hierarchisch gegliedertes Modell zur Entstehung von Leukämien aufstellen. Wir sind nun dabei, die einzelnen Veränderungen und deren Kooperation

mit erhöhter NFE2-Aktivität systematisch in weiteren Mausmodellen zu analysieren. Hierbei steht vor allem die Testung der NFE2-Myc-Kooperation sowie der NFE2-Nfe2l2-Kooperation im Vordergrund; jeweils in An- oder Abwesenheit einer Trp53-Mutation. Wir wollen unser Wissen schnellstmöglich in neue klinische Prüfungen einfließen lassen. Gerade im Falle der Mäuse, die einen Zugewinn an PDGF während ihrer Leukämie-Entstehung zeigten, deuten auf ein medikamentös therapierbares Ziel hin. PDGF-Inhibitoren sind bereits entwickelt worden, und manche sind bereits zur Anwendung am Patienten zugelassen, allerdings nicht spezifisch wegen ihrer Wirkung auf PDGF, sondern aufgrund ihrer zusätzlichen geringeren Wirkung auf andere Kinasen (z.B. im Falle von Imatinib, Nilotinib, Sunitinib und Sorafinib). Dies gibt uns die Möglichkeit uns als nächstes auf die mögliche Rolle einer vermehrten PDGF-Signaltransduktion in der Leukämie-Entstehung zu fokussieren und diese Substanzen präklinisch zu testen.

Literatur

1. Jutzi JS, Bogeska R, Nikoloski G, Schmid CA, Seeger TS, Stegelmann F, Schwemmers S, Grunder A, Peeken JC, Gothwal M, Wehrle J, Aumann K, Hamdi K, Dierks C, Kamar Wang W, Dohner K, Jansen JH, Pahl HL. MPN patients harbor recurrent truncating mutations in transcription factor NFE2. *J Exp Med*. 2013;210(5):1003-1019.
2. Kogan SC. Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood*. 2002;100(1):238-245.
3. Kaufmann KB, Grunder A, Hadlich T, Wehrle J, Gothwal M, Bogeska R, Seeger TS, Kayser S, Pham KB, Jutzi JS, Ganzenmuller L, Steinemann D, Schlegelberger B, Wagner JM, Jung M, Will B, Steidl U, Aumann K, Werner M, Gunther T, Schule R, Rambaldi A, Pahl HL. A novel murine model of myeloproliferative disorders generated by overexpression of the transcription factor NFE2. *J Exp Med*. 2012;209(1):35-50.
4. Bench AJ, Aldred MA, Humphray SJ, Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Deloukas P, Gwilliam R, Bentley DR, Green AR. A detailed physical and transcriptional map of the region of chromosome 20 that is deleted in myeloproliferative disorders and refinement of the common deleted region. *Genomics*. 1998;49(3):351-362.
5. van der Holt B, Breems DA, Berna Beverloo H, van den Berg E, Burnett AK, Sonneveld P, Lowenberg B. Various distinctive cytogenetic abnormalities in patients with acute myeloid leukaemia aged 60 years and older express adverse prognostic value: results from a prospective clinical trial. *Br J Haematol*. 2007;136(1):96-105.
6. Hussein K, Bock O, Theophile K, Schlue J, Ballmaier M, Kroger N, Gohring G, Busche G, Kreipe H. Biclinal expansion and heterogeneous lineage involvement in a case of chronic myeloproliferative disease with concurrent MPLW515L/JAK2V617F mutation. *Blood*. 2009;113(6):1391-1392.
7. Koh Y, Kim I, Bae JY, Song EY, Kim HK, Yoon SS, Lee DS, Park SS, Park MH, Park S, Kim BK. Prognosis of secondary acute myeloid leukemia is affected by the type of the preceding hematologic disorders and the presence of trisomy 8. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(11):1037-1045.
8. Carramusa L, Contino F, Ferro A, Minafra L, Perconti G, Giallongo A, Feo S. The PVT-1 oncogene is a Myc protein target that is overexpressed in transformed cells. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):511-518.

9. Guan Y, Kuo WL, Stilwell JL, Takano H, Lapuk AV, Fridlyand J, Mao JH, Yu M, Miller MA, Santos JL, Kalloger SE, Carlson JW, Ginzinger DG, Celniker SE, Mills GB, Huntsman DG, Gray JW. Amplification of PVT1 contributes to the pathophysiology of ovarian and breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(19):5745-5755.
10. Tseng YY, Moriarity BS, Gong W, Akiyama R, Tiwari A, Kawakami H, Ronning P, Reuland B, Guenther K, Beadnell TC, Essig J, Otto GM, O'Sullivan MG, Largaespada DA, Schwertfeger KL, Marahrens Y, Kawakami Y, Bagchi A. PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature.* 2014;512(7512):82-86.
11. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, Hoke HA, Young RA. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell.* 2013;155(4):934-947.
12. Dang CV, Reddy EP, Shokat KM, Soucek L. Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat Rev Cancer.* 2017.
13. Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, Davis EM, Kogan SC, Anastasi J, Crispino JD, Le Beau MM. Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood.* 2007;110(2):719-726.
14. Stoddart A, Fernald AA, Wang J, Davis EM, Karrison T, Anastasi J, Le Beau MM. Haploinsufficiency of del(5q) genes, Egr1 and Apc, cooperate with Tp53 loss to induce acute myeloid leukemia in mice. *Blood.* 2014;123(7):1069-1078.
15. Stoddart A, Wang J, Fernald AA, Karrison T, Anastasi J, Le Beau MM. Cell intrinsic and extrinsic factors synergize in mice with haploinsufficiency for Tp53, and two human del(5q) genes, Egr1 and Apc. *Blood.* 2014;123(2):228-238.
16. Zhao D, Tahaney WM, Mazumdar A, Savage MI, Brown PH. Molecularly targeted therapies for p53-mutant cancers. *Cell Mol Life Sci.* 2017.
17. Vogelstein B1, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-32.
18. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236:313-22
19. Cebula M, Schmidt EE, Arner ES. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. *Antioxid. Redox Signal.* 2015
20. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. **DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139.** *J Biol Chem.* 1998;273(10):5858-68.