

Rolle der Phospholipase-C gamma 1 (PLCg1) in JAK2V617F-positiven myeloproliferativen Neoplasien (MPN)

Inga Griehl¹, Daniel B. Lipka², Tina M. Schnöder¹, Florian H. Heidel¹, Thomas Fischer¹

¹Klinik für Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Innere Medizin, Otto-von-Guericke Universität Medizinische Fakultät, Magdeburg, Deutschland; ²Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Epigenomik und Krebsrisikofaktoren (C010), Heidelberg, Deutschland

Abstract

Philadelphia-Chromosom-negative myeloproliferative Neoplasien (MPN) sind klonale Störungen der hämatopoetischen Stammzellen. Im Mittelpunkt der Pathogenese der MPNs steht eine aktivierende Mutation im *JAK2*-Gen (*JAK2V617F*), welche im Großteil der Patienten mit Polyzythämia vera (95%) und in einem signifikanten Teil der Patienten mit essentieller Thrombozythämie und primärer Myelofibrose (50%) zu finden ist. Funktionell führt die *JAK2V617F*-Mutation durch Hemmung der autoinhibitorischen Funktion der *JAK2*-Pseudokinasedomäne zu einer konstitutiven Aktivierung der *JAK2*-Tyrosinkinase und der nachgeschalteten Signalwege, wie *STAT5*, *PI3K/AKT* und *MAPK*. Die molekularen Mechanismen, die der *JAK2V617F*-induzierten Pathogenese zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt.

Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C gamma 1 (*PLCg1*) gehört zu einer Familie von Enzymen, welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat katalysieren und somit als Schlüsselmediatoren des Calcium-Signalweges agieren. Für die Leukämie-Entstehung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) konnte eine wichtige Rolle des *PLCg1*-Signalweges belegt werden, der bei der CML unabhängig von bisher bekannten Signalwegen aktiviert ist. Eine potentielle therapeutische Nutzung des *PLCg1* Signalweges scheint vielversprechend, da eine Synergie von *PLCg1*-Hemmung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib bereits in Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnte in einem Maus-Knockout-Modell gezeigt werden, dass der Verlust von *PLCg1* zu einer Störung der Erythropoese führt. *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass der Erythropoetin-Rezeptor (*EpoR*) Signalweg zusammen mit der *JAK2*-Tyrosinkinase einen entscheidenden Regulationsmechanismus für die Erythropoese darstellt.

Zielstellung:

- Untersuchung der funktionellen Rolle von *PLCg1* sowie der intrazellulären Signaltransduktion in einem *JAK2V617F*-positiven Zellkultur-Modell.
- Dazu wurde die myeloide hämatopoetische Progenitorzelllinie 32D stabil mit dem Erythropoetin-Rezeptor (*EpoR*) und *JAK2WT* oder *JAK2V617F* transfiziert und charakterisiert.

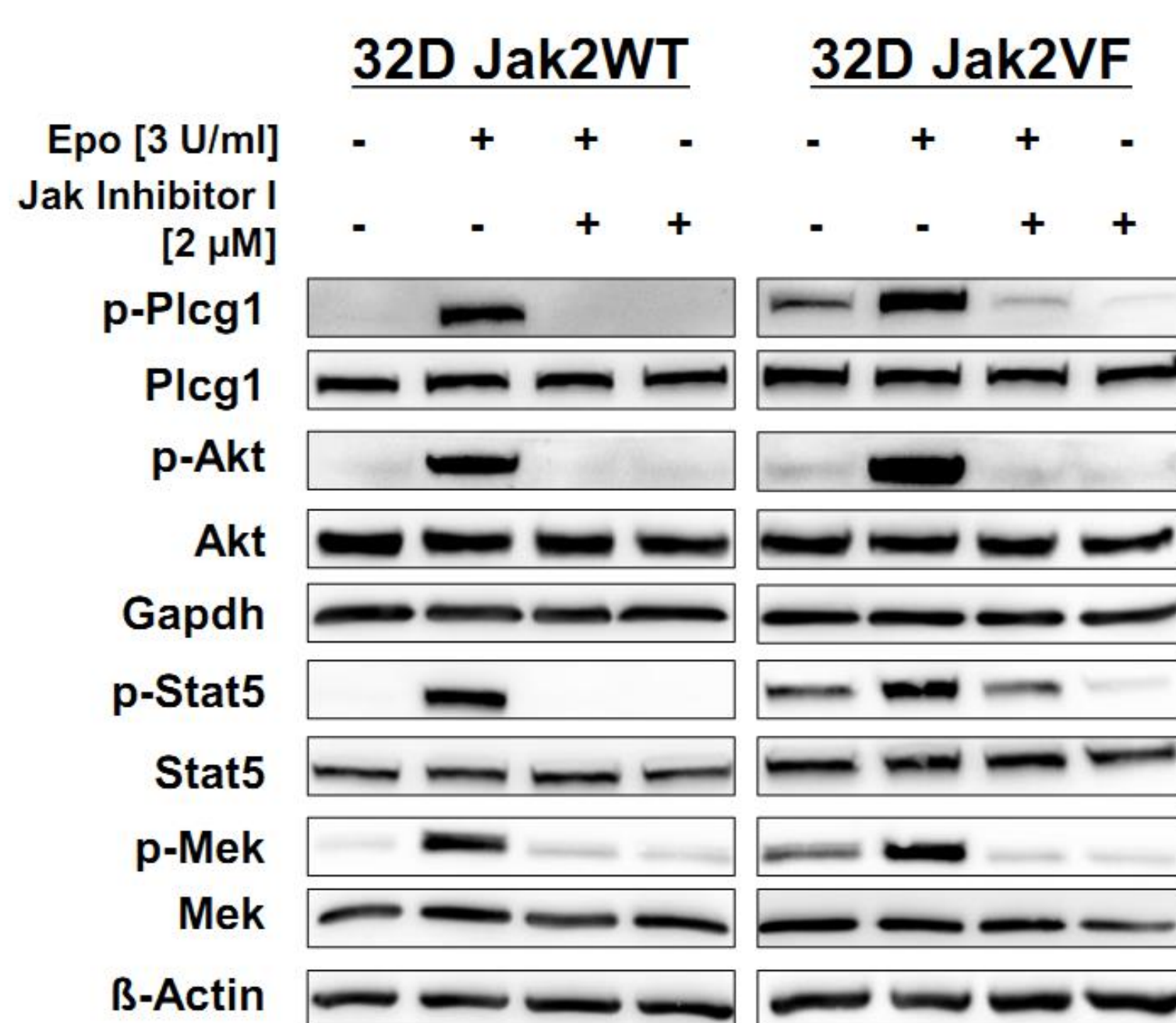


Abb. 1: Plcg1 wird durch den EpoR/Jak2 Signalweg aktiviert. 32D Zellen wurden mit EpoR und *Jak2WT* oder *Jak2V617F* infiziert. Die Zellen wurden 4 h auf Hungermedium gesetzt, mit 2 µM *Jak Inhibitor I* für 30 min inkubiert und dann mit 3 U/ml EPO für 10 min stimuliert. Die Zellysate wurden mittels Westernblot analysiert. Es zeigte sich, dass die nachgeschalteten Signalwege wie *Stat5*, *Akt* und *Mek* und ebenso *Plcg1* nach EPO-Stimulation signifikant aktiviert werden. Nach Behandlung der Zellen mit *Jak Inhibitor* erfolgte eine Signalabnahme. Im Gegensatz zu *Jak2WT* war in den *Jak2V617F*-mutierten Zellen eine konstitutive Aktivierung von *Plcg1* detektierbar.

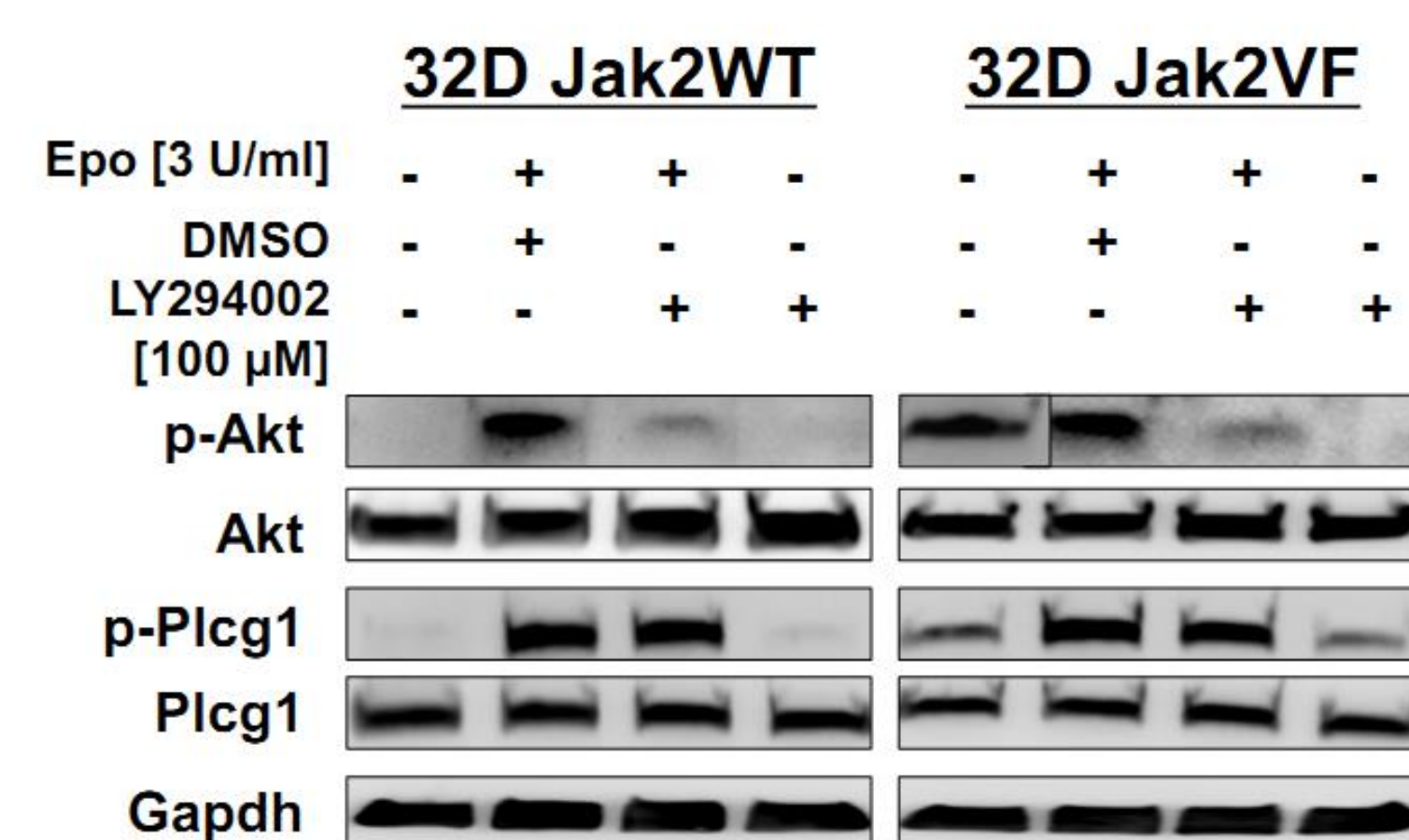
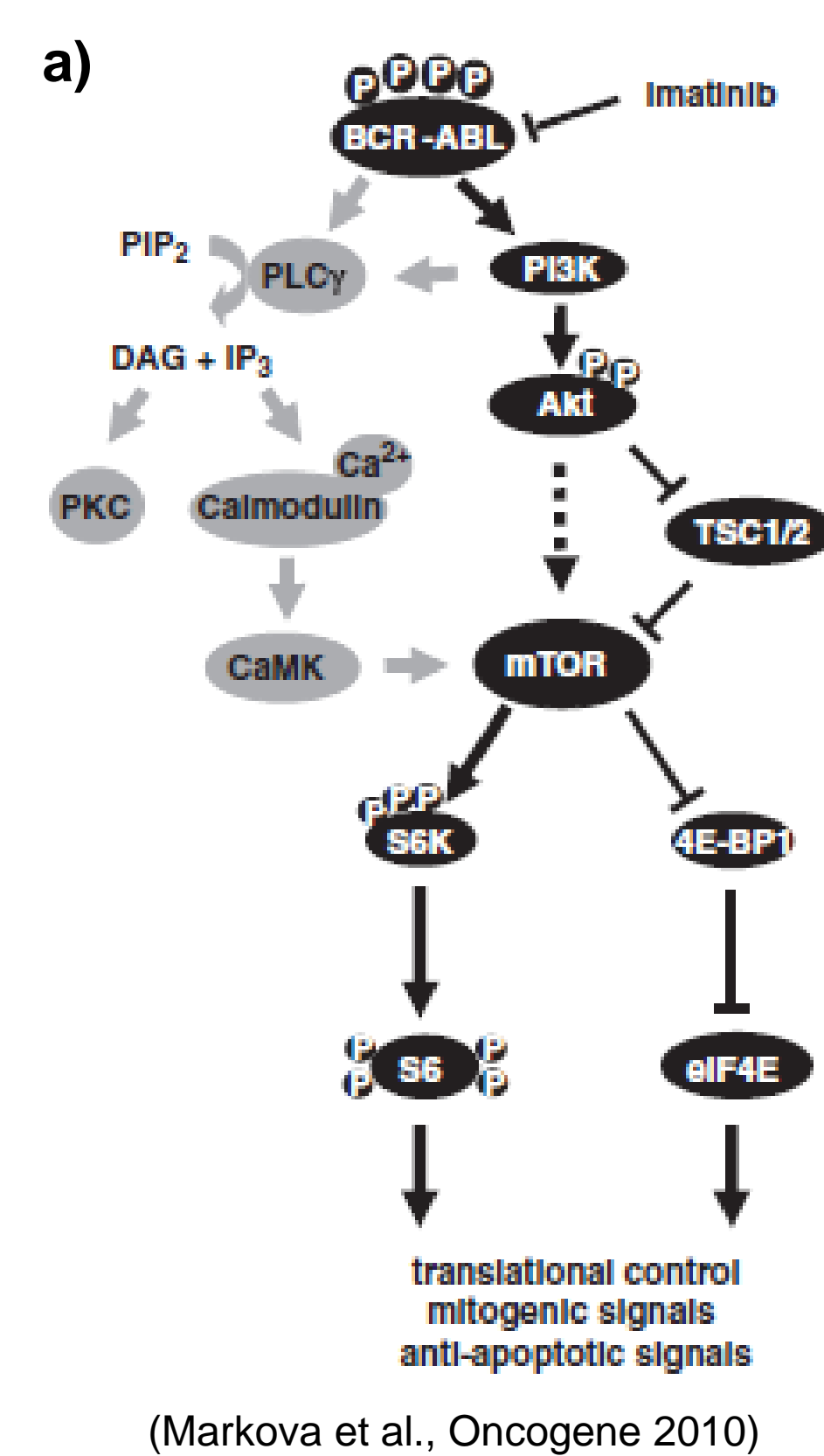


Abb. 2: Die Regulation von Plcg1 erfolgt PI3K/Akt unabhängig. 32D Zellen wurden mit EpoR und *Jak2WT* oder *Jak2V617F* infiziert. Die Zellen wurden 4 h auf Hungermedium gesetzt und mit 100 µM LY294002 für 1 h inkubiert und dann mit 3 U/ml EPO für 10 min stimuliert. Die Analyse der Zellysate erfolgte mittels Westernblot. Die Inhibition der PI3-Kinase hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung von *Plcg1*.



(Markova et al., Oncogene 2010)

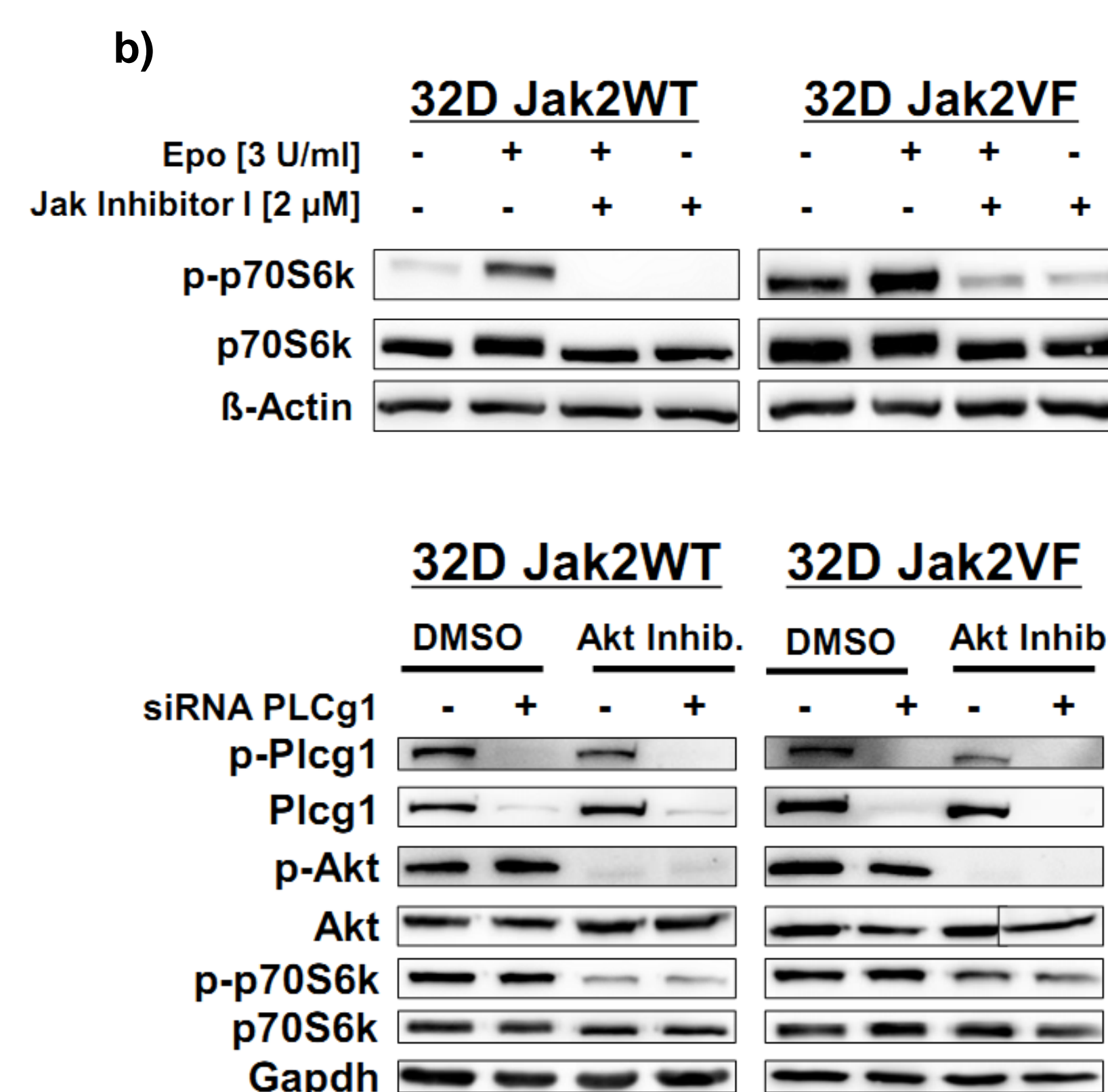


Abb. 3: Der mTOR/p70S6-Kinase Signalweg wird nicht durch Plcg1 in *Jak2V617F*-positiven Zellen aktiviert. (a) Für die BCR-ABL Kinase konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des mTOR/S6K-Signalweges PI3K/Akt-unabhängig über *Plcg1* erfolgen kann. (Markova et al., Oncogene 2010). (b) 32D *Jak2WT* oder *Jak2V617F* Zellen wurden mit *Plcg1* oder Kontroll siRNA transfiziert. 24 h nach Knockdown wurden die Zellen für 4h auf Hungermedium gesetzt, 1 h mit 500 nM Akt Inhibitor VIII inkubiert und dann mit 3U/ml EPO für 10 min stimuliert. Die Aktivierung von *Plcg1*, *Akt* und *p70S6K* wurde mittels Westernblot analysiert. Der simultane Knockdown von *Plcg1* und die pharmakologische Inhibition des *Akt*-Signalweges zeigen, dass der mTOR/p70S6-Kinase Signalweg nicht durch *Plcg1* in *Jak2V617F*-positiven Zellen reguliert wird.

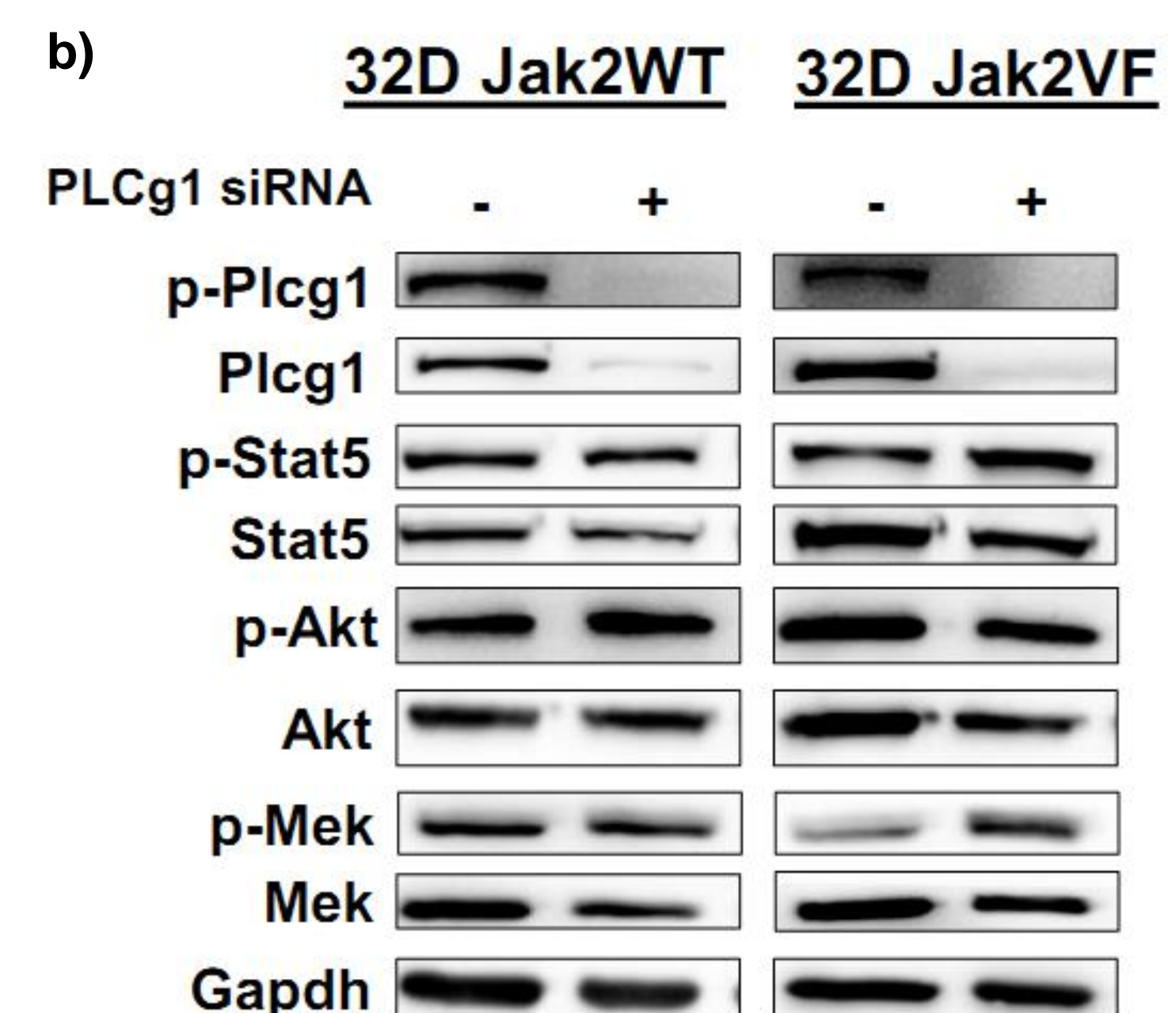
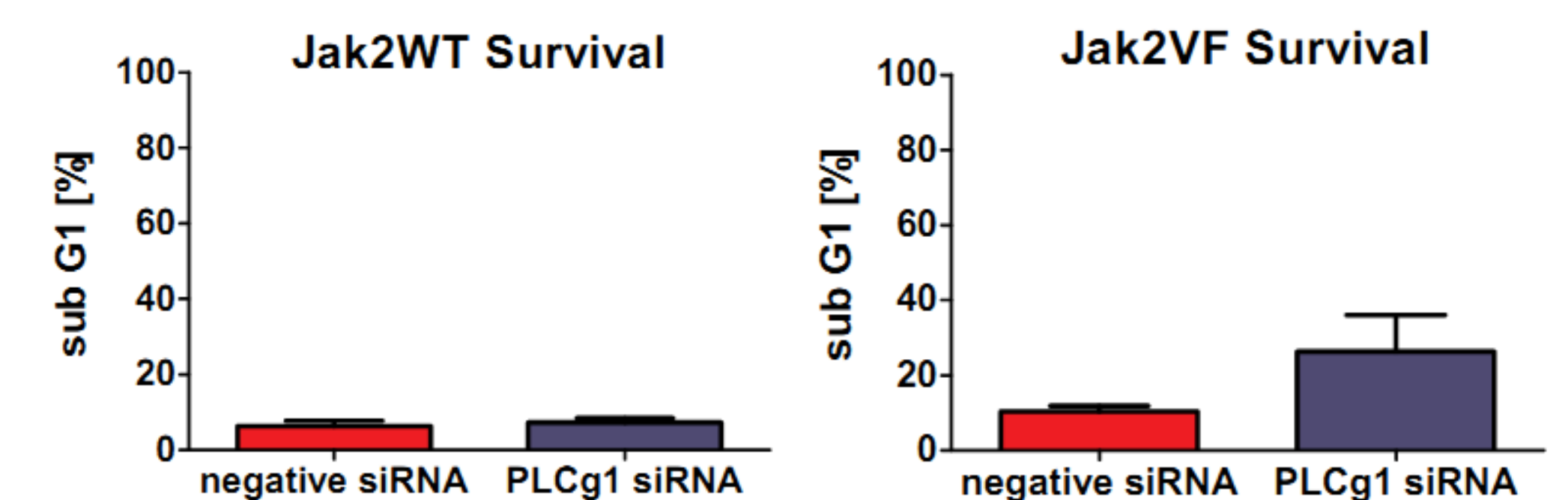
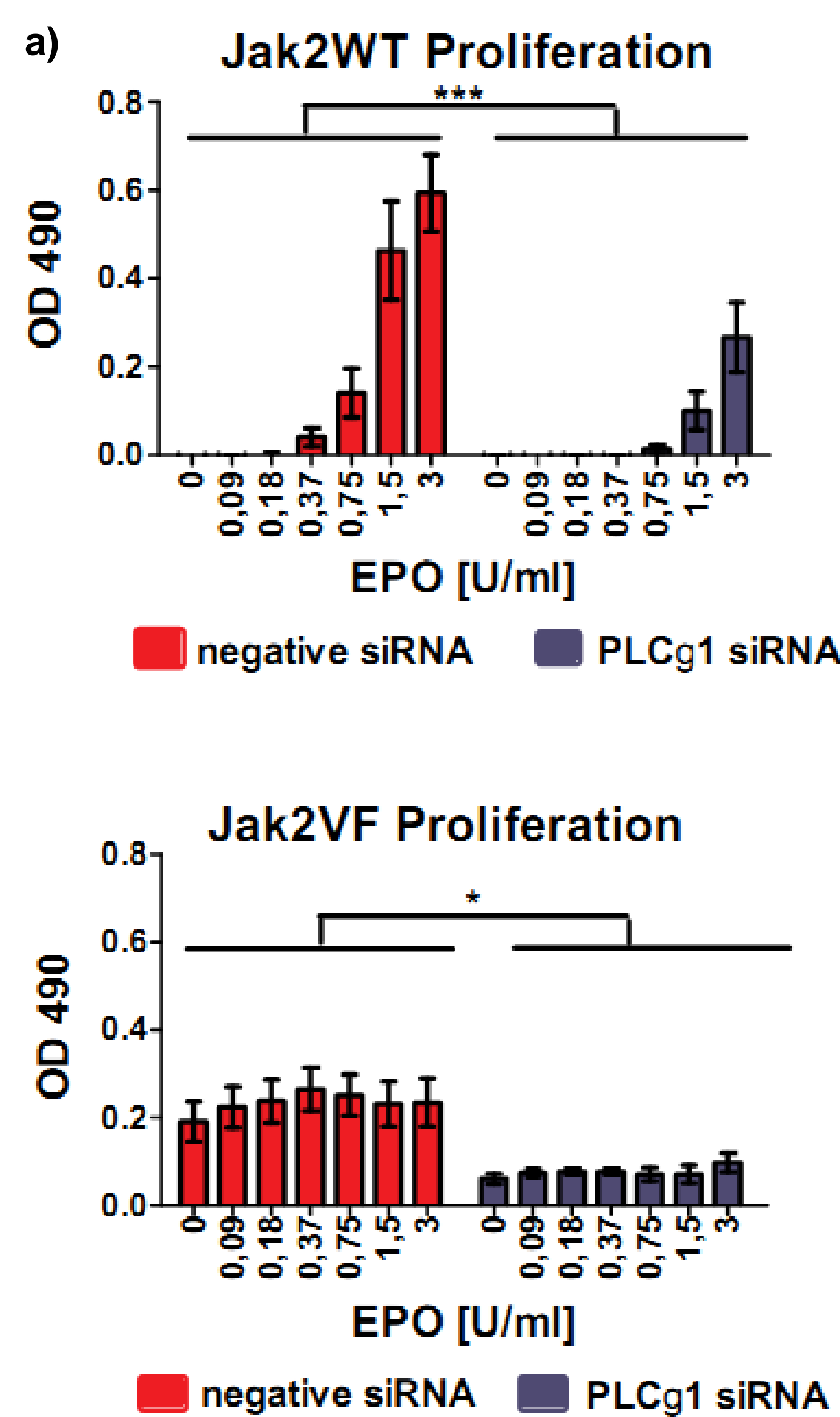


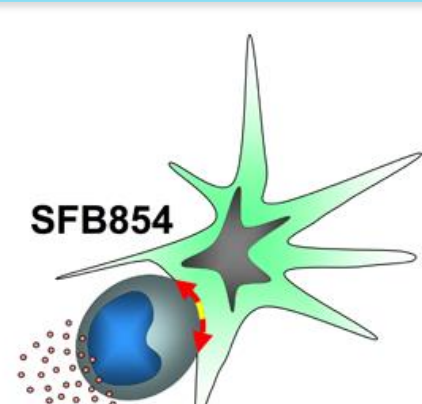
Abb. 4: Funktionelle Rolle von Plcg1 in *Jak2V617F*-positiven Zellen. (a) 32D *Jak2WT* oder *Jak2V617F* Zellen wurden mit spezifischer *PLC1* oder Kontroll siRNA transfiziert. 72 h nach Knockdown wurde das Überleben der Zellen mittels Propidiumiodid-Färbung im Durchflusszytometer analysiert. Die Proliferationsrate der Zellen wurde 72 h nach Knockdown mittels MTS-Assay bestimmt. Der *PLCg1* Knockdown führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation in *JakWT* und *Jak2V617F* Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, wohingegen das Überleben der *PLCg1*-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt war. (b) 72 h nach *PLCg1* Knockdown wurden die *Jak2WT* oder *Jak2V617F* Zellen für 4 h auf Hungermedium gesetzt und dann mit 3U/ml EPO für 10 min stimuliert. Die Analyse der Aktivierung von *Plcg1*, *Akt*, *Stat5* und *Mek* erfolgte mittels Westernblot. Die dem EpoR/*Jak2*-Weg nachgeschalteten Signalkaskaden zeigten keine Beeinträchtigung in *PLCg1*-defizienten Zellen.

Zusammenfassung:

- Die Aktivierung von *Plcg1* erfolgt direkt über den EpoR/*JAK2* Signalweg und wird nicht über *PI3K/AKT* reguliert
- Der mTOR/p70S6-Kinase Signalweg wird nicht durch *Plcg1* in *Jak2V617F*-positiven Zellen aktiviert
- *Plcg1* ist ein wesentliches Signal, dass die Proliferation von *Jak2V617F*-mutierten Zellen treibt.

→ *PLCg1* spielt eine entscheidende Rolle im EpoR/*JAK2* Signalweg und hat einen Einfluss auf die onkogene Signaltransduktion der *JAK2V617F*-Kinase; dadurch erscheint *PLCg1* als therapeutische Zielstruktur für die Behandlung myeloproliferativer Erkrankungen interessant

Funding:



Sonderforschungsbereich 854
Molekulare Organisation der
zellulären Kommunikation im Immunsystem

DFG Deutsche
Forschungsgemeinschaft

