

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**  
**III. Medizinische Klinik und Poliklinik (Hämatologie/Onkologie)**  
**Klinikum rechts der Isar**  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

**Funktionelle Überprüfung der Bedeutung von Nipa für die c-Myc-  
induzierte Krebsentwicklung**

Christian Johannes Fritz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. Chr. Peschel

2. Priv.-Doz. Dr. I. Ringshausen

Die Dissertation wurde am 21.08.2012 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2013  
angenommen.

**Daten dieser Arbeit wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:**

**50<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology 2008, San Francisco, California, USA (Poster)**

AL Illert, C Fritz, H Kawaguchi, P Schenk, SW Morris, C Peschel, U Keller, and J Duyster.  
NIPA Checkpoint Control Is Essential for Efficient Oncogenic Transformation by c-Myc.

---

## 0 Inhaltsverzeichnis

<b>0</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1	Genetische Aberrationen bei Krebserkrankungen	8
2.2	Zellzyklus	10
2.3	Gestörte Zellzykluskontrollpunkte bei Tumorerkrankungen	12
2.4	Apoptose	14
2.5	<i>c-Myc</i>	16
2.5.1	Regulation und Wirkmechanismus des Transkriptionsfaktor <i>c-Myc</i>	17
2.5.2	<i>c-Myc</i> und die Regulation des Zellzyklus	18
2.5.3	Apoptoseinduktion durch Überexpression von <i>c-Myc</i>	19
2.5.4	Weitere wichtige Funktionen von <i>c-Myc</i> in der Zelle	21
2.5.5	Deregulation des Transkriptionsfaktors <i>c-Myc</i>	22
2.6	Nipa	23
<b>3</b>	<b>Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
4.1	Chemikalien und Reagenzien	28
4.2	Enzyme	29
4.3	Plasmide	29
4.4	Real-time PCR Primer	30
4.5	Antikörper	30
4.5.1	FACS	30
4.5.2	Western Blot	30
4.6	Verbrauchsmaterialien	30
4.7	Reaktionssysteme („kits“)	31
4.8	Geräte	31
4.9	Softwareprogramme	32
4.10	Puffer und Lösungen	32
4.11	Western Blot Gele	33
4.12	Medien	34
4.12.1	Bakterienmedium	34
4.12.2	Einfriermedium	34
4.12.3	Zellkulturmedien	34
4.13	Bakterien	34
4.14	Zellen	34
4.15	Mäuse	35

---

4.16	Vermehrung und Isolierung von DNA-Plasmiden mit Hilfe Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Stämme .....	36
4.17	Relative real-time RT-PCR.....	37
4.18	Western Blot .....	39
4.19	Allgemeine Zellkultur.....	41
4.20	Stabile retrovirale Transfektion muriner Zellen .....	42
4.21	Knochenmarkstransplantation der Maus .....	45
4.22	Durchflusszytometrie.....	47
4.22.1	Transfektions- und Infektionskontrolle .....	48
4.22.2	Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung .....	48
4.22.3	FACS-Analyse von peripheren Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen.....	49
4.23	Statistische Auswertung .....	49
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
5.1	Überexpression von <i>c-MYC</i> induziert <i>CYCLIN B1</i> .....	50
5.2	<i>c-MYC</i> reguliert <i>NIPA</i> nicht auf transkriptioneller Ebene .....	51
5.3	Etablierung des <i>Myc</i> -AML-Mausmodells .....	52
5.3.1	Infektion von C57BL/6-Knochenmarkszellen mit dem MSCV-MYC-IRES-GFP-Vektor .....	52
5.3.2	Syngene Knochenmarkstransplantation und Rekonstitution des Knochenmarks.....	53
5.3.3	<i>c-Myc</i> -Überexpression induziert keine Leukozytose.....	53
5.3.4	<i>c-Myc</i> -Überexpression erhöht die Anteile myeloischer Zellen im peripheren Blut.....	54
5.3.5	<i>c-Myc</i> -Überexpression induziert eine akute myeloische Leukämie.....	58
5.4	Funktionelle Überprüfung der Bedeutung von <i>Nipa</i> für die <i>c-Myc</i> -induzierte Krebsentwicklung am Modell der AML .....	63
5.4.1	Schnellere Rekonstitution des Knochenmarks bei den <i>c-Myc</i> -überexprimierenden Gruppen .....	63
5.4.2	Moderate Unterschiede im peripheren Blut zwischen der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und der <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe.....	66
5.4.3	Verlust von <i>Nipa</i> verzögert das Auftreten der <i>c-Myc</i> -induzierten AML.....	69
5.5	Gesteigerte Apoptose in <i>c-Myc</i> -überexprimierendem <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> Knochenmark .....	76
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>107</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>108</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AML	Akute Myeloische Leukämie
A	Ampere
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
bHLHZip	basic Helix-Loop-Helix-leucine Zipper
BSA	Bovines Serumalbumin
CAK	CDK Activating Kinase
Caspasen	Cysteine-directed, aspartate-specific proteases
CCNB1	CYCLIN B1
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	complementary DNA
CKI	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CRS-Region	Cytoplasmic Retention Signal-Region
Cs <sup>137</sup>	Caesium <sup>137</sup>
Ct-Wert	Cycle threshold Wert
d	Tag
DISC	Death-Inducing-Signaling-Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DPBS	Dulbecco's phospho buffered saline
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FAB-Klassifikation	French-American-British-Klassifikation
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-Associated Death Domain
FCS	Fetales Bovines Serum
5-FU	5-Fluoruracil
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IGF	Insulin-like Growth Factor

## 1 Abkürzungsverzeichnis

---

IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INK4a/ARF	Inhibitor of Kinase 4/Alternative Reading Frame
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MIG	MSCV-IRES-GFP
mIL-3	murines Interleukin-3
mIL-6	murines Interleukin-6
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MPF	Mitose Promoting Faktor
mRNA	messenger-RNA
mSCF	muriner Stem Cell Factor
MSCV	Murine Stem Cell Virus
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
NIPA	Nuclear Interaction Partner of ALK
nm	Nanometer
ODC	Ornithindecaboxylase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
Rb	Retinoblastoma-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SCF-Komplex	Skp1-Cullin-F-Box-enthaltender Komplex
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
Ser	Serin
siRNA	small interfering RNA
tBid	truncated Bid

TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRRAP	Transformation/Transcription domain-Associated Protein
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
wt	Wildtyp

Die Herkunft des untersuchten Materials aus humanen oder murinen Zellen wird in dieser Arbeit bei eigenen Beobachtungen zusätzlich durch die Schreibweise gekennzeichnet. So werden *HUMANE GENE* kursiv und in Großbuchstaben geschrieben, während HUMANE PROTEINE nicht-kursiv und in Großbuchstaben geschrieben werden. Eine kursive Schreibweise und ein großer Anfangsbuchstabe kennzeichnen *Murine Gene*, wohingegen Murine Proteine durch eine nicht-kursive Schreibweise und einen großen Anfangsbuchstaben gekennzeichnet werden. Bei Bezugnahme auf Daten fremder Autoren werden in dieser Arbeit alle *Gene*, egal welchen Ursprungs, in kursiver Schrift und mit einem großen Anfangsbuchstaben bzw. alle Proteine, egal welchen Ursprungs, in nicht-kursiver Schrift und mit einem großen Anfangsbuchstaben geschrieben.

## 2 Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. In Deutschland starben im Jahr 2010 218 889 Menschen an einer malignen Neoplasie. Laut Pressemitteilung Nr.354 des statistischen Bundesamtes Deutschland vom 23.09.2011 verursachten sie damit ein Viertel aller Todesfälle in dem genannten Zeitraum in Deutschland (DESTATIS 2011).

Maligne Neoplasien entstehen, wenn das Genom einer Zelle durch Mutationen so verändert wird, dass die Zelle unkontrolliert proliferieren und invasiv in andere Gewebe des Körpers einwachsen bzw. Metastasen bilden kann. Jedoch führt nicht jede Mutation zur Entstehung einer Krebserkrankung. Es wird davon ausgegangen, dass in der Regel etwa 5 – 10 über einen längeren Zeitraum kumulativ erworbene Mutationen notwendig sind, um eine normale Zelle in eine maligne Krebszelle zu verwandeln. (Morin, Trent et al. 2005)

### 2.1 Genetische Aberrationen bei Krebserkrankungen

Mutationen können viele Ursachen haben. Dazu gehört der Kontakt mit teratogenen Chemikalien, mit bestimmten physikalischen Prozessen, mit Infektionen durch Viren oder auch zufällig auftretende Fehler bei der Replikation bzw. der Rekombination der DNA. Als Ausgangspunkt für die Transformation einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle werden Mutationen insbesondere in den Genen zweier Genklassen angesehen. Bei diesen Genklassen handelt es sich

1. um die Genklasse deren Gene das Zellwachstum direkt beeinflussen und die aus den Protoonkogenen, den Tumorsuppressorgenen und den MikroRNA-Genen besteht.
2. um die Genklasse deren Gene das Zellwachstum nicht direkt beeinflussen, die Zellen aber dazu befähigen die Integrität ihres Genoms zu erhalten. Diese Gene werden Reparatur- oder auch „Caretaker-Gene“ genannt.

(Vogelstein, Lane et al. 2000; Morin, Trent et al. 2005; Kumar, Abbas et al. 2005b)

In der ersten Genklasse wirken die Protoonkogene in ihrer nicht mutierten Form über ihre Proteinprodukte fördernd auf eine geordnet ablaufende Zellproliferation ein bzw. schützen die Zelle vor einer nicht indizierten Apoptose. In ihrer mutierten Form, als Onkogene, führen ihre Proteinprodukte zu unkontrollierter Proliferation oder schützen die Zellen vor einer, unter Umständen indizierten Apoptose.

Die Aktivierung eines Protoonkogens zum Onkogen kann durch verschiedene Arten von Mutationen erfolgen. Beispielsweise führen chromosomale Rearrangements sowie Genamplifikationen zu einer gesteigerten, oft konstitutionellen Expression des betroffenen Onkogens. Punktmutationen dagegen verändern die Struktur der Protoonkoproteine und erreichen somit eine höhere Aktivität oder längere Halbwertszeit der veränderten Proteine. Auf Grund der Mutationen gehen wichtige Regulationsmechanismen der Zelle verloren. Zellen, die wegen ihrer veränderten Eigenschaften eliminiert werden müssten, proliferieren

verstärkt und überleben; sie sind dadurch stärker gefährdet weitere Mutationen anzusammeln.

Die ersten Onkogene und ihre Funktionen bei der Krebsentstehung wurden im Genom akut transformierender Retroviren gefunden und führten zur Entdeckung der ersten zellulären Protoonkogene. Heute kennt man viele Gene, die ihre onkogene Wirkung als Transkriptionsfaktoren, als Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren, als Signaltransduktoren, oder als Regulatoren der Apoptose ausüben. (Morin, Trent et al. 2005; Kumar, Abbas et al. 2005b; Croce 2008)

Die ebenfalls in der ersten Genklasse enthaltenen Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, die ähnlich den Proteinprodukten der Protoonkogene an der Kontrolle des Zellzyklus und an der Regulation der Apoptose in der Zelle beteiligt sind. Sie wirken in der gesunden Zelle hemmend auf die Zellproliferation oder proapoptotisch, wenn dies auf Grund schwerer, nicht zu reparierender DNA-Schäden für die Stabilität des Genoms notwendig wird. Auf diese Weise schützen die Tumorsuppressorgene die Zelle und den Organismus vor einer malignen Entartung.

In den Tumorsuppressorgenen ist meist eine Punktmutation oder eine Deletion größerer Abschnitte des Gens dafür verantwortlich, dass die Struktur des Proteins verändert wird und es seine Funktion verliert. Somit ist es nicht mehr dazu in der Lage, die Vermehrung der Zelle trotz schwerer DNA-Schäden durch die Einleitung des Apoptoseprogrammes zu verhindern und kann seine Schutzfunktion gegen eine unkontrollierte Proliferation der Zelle nicht mehr erfüllen. Im Gegensatz zu den Onkogenen, bei denen die Mutation eines Allels ausreicht, um eine Krebserkrankung auszulösen, wird bei den Tumorsuppressorgenen von der „Two-Hit Hypothese“ ausgegangen. Diese Hypothese wurde erstmalig von Knudson im Jahr 1971 formuliert. In ihrer überarbeiteten, heute gültigen Version besagt sie, dass beide Allele eines Tumorsuppressorgens ihre Funktionsfähigkeit verloren haben müssen, damit eine Krebserkrankung entstehen kann.

Ähnlich wie bei den Onkogenen wirken die Proteinprodukte der Tumorsuppressorgene als Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusinhibitoren, Signaltransduktoren, Oberflächenrezeptoren oder Regulatoren der zellulären DNA-Reparaturmechanismen. (Morin, Trent et al. 2005; Kumar, Abbas et al. 2005b)

Neben den Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen beeinflusst auch die Gruppe der MikroRNA-Gene das Zellwachstum direkt. Diese Gene kodieren nicht für Proteine, sondern für aus ca. 20 Nukleotiden bestehende RNA-Einzelstränge. Die MikroRNAs können an die mRNA binden, dadurch deren Translation in das entsprechende Protein verhindern bzw. für die Degradation der mRNA sorgen und damit starken Einfluss auf die Expression verschiedener Gene nehmen. In Krebszellen konnte gezeigt werden, dass einige dieser MikroRNAs in überexprimierter Form die Wirkung von Onkogenen entfalten, während andere

Mikro-RNAs wie die Tumorsuppressorgene erst herunterreguliert werden müssen, damit eine Zelle zur Tumorzelle entarten kann. (Croce 2008)

Die zweite Klasse von Genen, die für die Krebsentstehung ursächlich sein können, das Zellwachstum aber nicht direkt beeinflussen, ist die Klasse der Reparatur-Gene bzw. Caretaker-Gene. Diese Gene ermöglichen es der Zelle, die Integrität ihres Genoms aufrechtzuerhalten, indem ihre Proteinprodukte DNA-Schäden erkennen und reparieren können. Der Funktionsverlust dieser Proteine durch Mutation führt zu einer erhöhten Instabilität des gesamten Genoms. Davon sind auch Protoonkogene und Tumorsuppressorgene betroffen, sodass das Risiko für die Entstehung einer Krebserkrankung entsprechend ansteigt. (Kinzler and Vogelstein 1997; Vogelstein, Lane et al. 2000; Morin, Trent et al. 2005)

Entscheidend für die Krebsentstehung sind also in jedem Fall die Dysregulation von Zellzyklus und Apoptose durch Mutation entsprechender Gene.

### **2.2 Zellzyklus**

Der Zellzyklus hat eine große Bedeutung bei der Embryogenese und der Homöostase des Organismus.

Während sich die Proliferationsgeschwindigkeiten der verschiedenen Gewebetypen eines Körpers stark unterscheiden können, laufen die einzelnen Phasen des Zellzyklus immer nach dem gleichen Muster ab. In der G<sub>1</sub>-Phase wird die Zelle auf die Replikation der DNA vorbereitet, die sich in der S-Phase abspielt. Die G<sub>2</sub>-Phase dient der Vorbereitung zur Zellteilung, die kurz darauf in der M-Phase folgt.

Bei einer Zellteilung besteht immer die Gefahr, dass vor oder während der Replikation aufgetretene Mutationen an die nächste Generation weitergegeben werden. Um die Übertragung oder die Entstehung genetischer Schäden zu vermeiden, wird der Zellzyklus durch eine Reihe komplizierter Regulations- und Kontrollmechanismen gesteuert. (Kumar, Abbas et al. 2005c)

Im Mittelpunkt der Regulation stehen die Cycline und die „Cyclin abhängigen Kinasen“ (Cdk's), eine Gruppe von Ser/Thr-Proteinkinasen. Wie der Name aussagt, ist die Aktivität der Cdk's von der Komplexbildung mit den entsprechenden Cyclinen abhängig. Die große Instabilität der Cycline, ihr Abbau durch Ubiquitinierung und das Proteasom (Kumar, Abbas et al. 2005b), sowie eine Reihe weiterer Regulationsmechanismen, darunter aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen sowie Cdk-Inhibitoren sorgen dafür, dass sich die Cdk-Cyclin-Komplexe nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus bilden bzw. aktiviert werden können (Fesquet, Labbe et al. 1993; Diehl, Zindy et al. 1997; Lammer, Wagerer et al. 1998).

Externe Signale, die als Mitogene wirken, setzen den Zellzyklus in Gang. Sie sorgen durch transkriptionelle Aktivierung in der G<sub>1</sub>-Phase für die Expression vieler für den Zellzyklus benötigter Gene, unter anderem auch für die Expression der *D-Cycline*. Deren Proteinprodukte bilden mit der Cdk 4 bzw. Cdk 6 die Cyclin-D-Cdk-Komplexe und phosphorylieren das Retinoblastoma-Protein (Rb). Die Phosphorylierung des Rb beendet die Hemmung der Familie von E2f-Transkriptionsfaktoren. Dies führt zur Expression von Genen, die wichtig für die DNA-Replikation in der S-Phase sind, wie beispielsweise die DNA-Polymerase oder die Dihydrofolat-Reduktase. Andere Zielgene kodieren für Proteine, die die Rb-Phosphorylierung aufrechterhalten und ein von den Mitogenen unabhängiges Durchlaufen der S-Phase ermöglichen. (Bertram 2000; Kumar, Abbas et al. 2005b)

Der nächste entscheidende Schritt nach Abschluss der DNA-Replikation ist der G<sub>2</sub>/M-Übergang (Kumar, Abbas et al. 2005b). Um in die Mitose eintreten zu können, muss sich der Cyclin-B1-CDK1-Komplex, auch „Mitosis-“, „Maturation-“ oder „M-Phase promoting factor“ (MPF) genannt (Bassermann, von Klitzing et al. 2005), bilden, am G<sub>2</sub>/M-Übergang im Nucleus ansammeln (Yang, Bardes et al. 1998; Stark and Taylor 2006) und durch mehrere Phosphorylierungs- (Fesquet, Labbe et al. 1993; Stark and Taylor 2006) und Dephosphorylierungsschritte (Millar, Blevitt et al. 1991; Honda, Ohba et al. 1993; Stark and Taylor 2006) aktiviert werden. Auf Grund der Aktivitätsmuster wird vermutet, dass der Cyclin-A-Cdk2-Komplex ebenfalls eine Rolle beim G<sub>2</sub>/M-Übergang spielt (Rosenblatt, Gu et al. 1992), eventuell als Aktivator für den MPF (Pagano, Pepperkok et al. 1992; L'Italien, Tanudji et al. 2006). Um die Mitose zu beenden, muss der Cyclin B1-Cdk1-Komplex wieder abgebaut werden (Kumar, Abbas et al. 2005b). Dies übernimmt die APC/C Ubiquitinligase am Ende der Mitose (Bassermann, von Klitzing et al. 2007).

Insbesondere zwei Zellzykluskontrollpunkte sind bei der Überprüfung der Integrität der DNA während des Zellzyklus wichtig und können für einen Zellzyklusarrest sorgen. Sowohl am G<sub>1</sub>/S-Übergang als auch am G<sub>2</sub>/M-Übergang erkennen Sensorproteine wie die „ataxia telangiectasia mutated“ (ATM)-Familie DNA-Schäden und veranlassen direkt oder indirekt über Chk-1 und Chk-2 und über die Phosphorylierung ihrer Zielproteine den Zellzyklusarrest (Bucher and Britten 2008). Wird am G<sub>1</sub>/S-Übergang ein DNA-Schaden festgestellt, phosphorylieren und stabilisieren die ATM-Sensorproteine nicht nur das als „Wächter des Genoms“ bezeichnete Protein p53, sondern aktivieren gleichzeitig auch DNA-Reparaturmechanismen. Als Transkriptionsfaktor induziert p53 die Expression des Cdk-Inhibitors (Cki) p21<sup>Cip1/WAF1</sup> aus der Gruppe der Cip/Kip-Cki's (Coultas and Strasser 2000; Stark and Taylor 2006). Dieses führt durch Hemmung der Cyclin-D/Cdk4- bzw. Cyclin-D/Cdk6- und der Cyclin-E/Cdk2-Komplexe zum Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase (Coultas and Strasser 2000).

Der Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase wird durch p53-abhängige und -unabhängige Mechanismen ermöglicht. p53-abhängig wird beispielsweise die Phosphorylierung von

Thr161 im MPF durch p21<sup>Cip1/WAF1</sup> verhindert, der MPF durch vermehrte Induktion von Gadd45 gespalten und die Expression sowohl von *Cyclin B1*, als auch von *Cdk1* herunterreguliert (Stark and Taylor 2006). Ein weiterer, den Zellzyklusarrest auslösender Mechanismus wird p53-unabhängig, über Cdc25 A/B/C vermittelt, das durch die aktivierten Chk-1 und Chk-2 phosphoryliert wird und damit den MPF nicht mehr dephosphorylieren und somit nicht mehr aktivieren kann (Coultas and Strasser 2000; Stark and Taylor 2006). Ebenfalls p53-unabhängig kann Stress mittels Induktion von p38 Mapk/Mk2 und Cdc25 B/C zum Zellzyklusarrest führen.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der den Zellzyklusarrest auslösen kann, wird durch die Ink4/Arf-Familie gesteuert. Aus dem Genlocus *Ink4/Arf* („inhibitor of kinase 4/alternative reading frame“) entstehen zwei Zellzyklusinhibitoren (Kumar, Abbas et al. 2005b):

1. Das Protein p16Inka, das mit Cyclin-D um die Bindung an die Cdk4 konkurriert um damit die Phosphorylierung des Rb-Gens zu verhindern, und das einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase auslöst.
2. Das Protein p14Arf, das hemmend auf den p53-Inhibitor Mdm2 wirkt und dadurch indirekt die p53-Level erhöht.

Induziert werden beide Zellzyklusinhibitoren durch Signale, die z.B. durch die Überexprimierung von Onkoproteinen entstehen und zu einer abnorm verstärkten Zellproliferation führen (Sherr and McCormick 2002).

Gelingt es nicht, die DNA-Schäden während des Zellzyklus durch Zellzyklusarrest und Reparaturmechanismen zu beheben, wird die Apoptose aktiviert (Vogelstein, Lane et al. 2000; Hakeem 2008).

### 2.3 Gestörte Zellzykluskontrollpunkte bei Tumorerkrankungen

Die Störung der Zellzykluskontrollpunkte am G<sub>1</sub>/S- und am G<sub>2</sub>/M-Übergang spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer Tumorerkrankung (Meeran and Katiyar 2008). Insbesondere die Umgehung des G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunktes ist ein vielfach eintretendes Ereignis auf dem Weg zur Krebsentstehung bzw. beim Tumorprogress. Das Schlüsselprotein an diesem Kontrollpunkt ist das bereits angesprochene p53, das das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen darstellt (Meeran and Katiyar 2008).

p53 ist während des Zellzyklus normalerweise inaktiv und wird erst durch DNA-Schäden oder andere Aberrationen des Genoms aktiviert. Die Aktivität und Expression von p53 werden durch posttranskriptionelle Modifikationen reguliert. Durch die Aktivierung der ATM-Sensorproteine kommt es zur direkten und indirekten Phosphorylierung von p53. p53 kann nicht mehr abgebaut bzw. nicht mehr aus dem Nukleus heraustransportiert werden. Dies führt zur vermehrten Expression der Zielgene von p53 wie z.B. des CDK-Inhibitors p21<sup>Cip1/WAF1</sup>. p21<sup>Cip1/WAF1</sup> inhibiert die, für den Zellzyklus wichtigen Kinasen Cdk2 und Cdk4

und verhindert dadurch die Deaktivierung der inhibitorischen Funktion des Proteins Rb auf die E2f-Transkriptionsfaktoren (Kaufmann 2007). Es fehlen entscheidende Proteine für die DNA-Synthese. In der Folge kommt es zum Zellzyklusarrest, der den Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase verhindert und der Zelle die notwendige Zeit für Reparaturmaßnahmen verschafft bzw. die Induktion verschiedenster proapoptotischer Faktoren wie Puma, Bax oder Noxa ermöglicht (Meeran and Katiyar 2008).

Fällt die für diesen Zellzykluskontrollpunkt zentrale Funktion von p53 auf Grund einer Mutation aus, so ist dieser wichtige Zellzykluskontrollpunkt schwer beeinträchtigt. Die DNA-Synthese wird trotz beschädigtem Erbgut durchgeführt und weitere Mutationen können angehäuft werden, die die Entstehung einer malignen Zelle begünstigen (Bucher and Britten 2008). Die Zellen sind also bezüglich ihrer Genomstabilität auf die funktionierenden Zellzykluskontrollpunkte der S- und der G<sub>2</sub>-Phase angewiesen (Bucher and Britten 2008).

Dem Zellzykluskontrollpunkt in der G<sub>2</sub>-Phase kommt bei der Erhaltung der Genomstabilität besondere Bedeutung zu. Dieser Umstand findet auch bei der Entwicklung neuer Therapien gegen p53-defiziente Krebszellen Berücksichtigung (Bucher and Britten 2008). Bei dem am G<sub>2</sub>/M-Übergang gelegenen Zellzykluskontrollpunkt handelt es sich um einen Schutzmechanismus der Genomstabilität, der im Vergleich zum Zellzykluskontrollpunkt der G<sub>1</sub>-Phase bedeutend älter ist. Dieser Schutzmechanismus hat sich in seinen entscheidenden Eigenschaften von der Hefe *S.pombe* bis zur menschlichen Zelle nur unwesentlich verändert (Kuntz and O'Connell 2009). Es gibt Hinweise, dass p53 auch am Zellzykluskontrollpunkt der G<sub>2</sub>-Phase den Arrest des Zellzyklus unterstützt (Hermeking, Lengauer et al. 1997; Wang, Zhan et al. 1999; Zhan, Antinore et al. 1999; Schmitt, Paquet et al. 2007). Im Gegensatz zur Situation am G<sub>1</sub>/M-Übergang bleibt am G<sub>2</sub>/M-Übergang die Fähigkeit der Zelle zum Zellzyklusarrest bei fehlender p53-Funktion erhalten (O'Connor 1997; Passalaris, Benanti et al. 1999; Schmitt, Paquet et al. 2007). Am G<sub>2</sub>/M-Übergang wird die Konzentration des MPF im Nukleus so lange gering gehalten, bis die S-Phase abgeschlossen und alle aufgetretenen DNA-Schäden repariert sind. Auch hier kommen Sensorproteine der ATM-Familie zum Einsatz, die die DNA-Schäden aufspüren und zusammen mit weiteren Proteinen die Aktivierung der Effektor kinase Chk1 bewirken (Kuntz and O'Connell 2009). Dies führt zur Phosphorylierung zweier wichtiger Regulationsproteine von Cdk1: zur Stabilisierung der Kinase Wee1 einerseits und zur Behinderung der Phosphatasefunktion von Cdc25 andererseits (Kuntz and O'Connell 2009). Folglich wird Cdk1 verstärkt phosphoryliert bzw. weniger dephosphoryliert und ist damit inaktiv. Solange diese Situation auf Grund weiterer Signale der DNA-Schädigung aufrechterhalten bzw. Chk1 nicht inaktiviert wird, kommt es zu keinem Konzentrationsanstieg des Cdk1-Cyclin B1-Komplexes im Nukleus und somit erfolgt auch nicht der Übergang von der G<sub>2</sub>- in die M-Phase (Kuntz and O'Connell 2009).

In der gesunden Zelle ist der Zellzykluskontrollpunkt am G<sub>2</sub>/M-Übergang dafür ausschlaggebend, die genomische Stabilität zu gewährleisten und durch Reparatur der DNA-

Schäden der Apoptose vorzubeugen (Hartwell and Kastan 1994; O'Connell, Walworth et al. 2000). Dasselbe gilt allerdings auch für die maligne Tumorzelle. Auch sie kann durch den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparaturmechanismen am G<sub>2</sub>/M-Übergang viabel erhalten werden. Die große Bedeutung, die der Zellzykluskontrollpunkt am G<sub>2</sub>/M-Übergang für maligne Zellen hat, lässt sich daran erkennen, dass die an diesem Zellzykluskontrollpunkt beteiligten Gene nur in den seltensten Fällen in Tumorzellen kompromittiert sind (Kuntz and O'Connell 2009). Denn wird der Zellzyklusarrest am G<sub>2</sub>/M-Übergang außer Kraft gesetzt, so kann die DNA-Reparatur nicht korrekt durchgeführt werden und sowohl die gesunde als auch die maligne Zelle gehen trotz DNA-Schädigungen in die Mitosephase über, was zur Aktivierung des Apoptoseprogramms führt (Latif, den Elzen et al. 2004).

Auf Grund dieser Erkenntnis wurde ein insbesondere für p53-defiziente Tumorzellen mit großen Hoffnungen verbundener Therapieansatz abgeleitet, der den Zellzyklusarrest am G<sub>2</sub>/M-Übergang ausschalten und die Tumorzellen damit chemo- bzw. strahlensensibler und somit besser therapierbar machen soll (Powell, DeFrank et al. 1995). In vitro zeigten sich Hinweise dafür, dass Inhibitoren des G<sub>2</sub>/M-Zellzykluskontrollpunktes ursprünglich resistente Tumorzellen gegenüber von außen zugeführten, DNA-schädigenden Stoffen sensibilisieren und die Medikamentenkombination zu einer effektiven Apoptoseaktivierung in den Tumorzellen führen. Nach ebenfalls ermutigenden Ergebnissen in Tierversuchen wird die Wirkung der Kombination von Chk1-Inhibitoren mit DNA-schädigenden Therapeutika auf verschiedene Tumoren in klinischen Studien untersucht (Bucher and Britten 2008; Kuntz and O'Connell 2009).

### **2.4 Apoptose**

Die Apoptose ist gleichermaßen wie der Zellzyklus von großer Relevanz für die Embryogenese und die Homöostase im Organismus. Sie spielt jedoch auch bei Erkrankungen des Organismus eine entscheidende Rolle (Chipuk and Green 2006; Adams and Cory 2007).

So treibt die Apoptose überzählige, geschädigte oder infizierte Zellen durch einen stereotyp ablaufenden, programmierten Vorgang in den zellulären Selbstmord. 1972 wurde dieses stereotyp ablaufende Zellprogramm erstmals von Kerr et al. erkannt und beschrieben. (Kerr, Wyllie et al. 1972; Cory and Adams 2002)

In der Apoptose wird die DNA intrazellulär zerstückelt und die Proteine werden hydrolysiert. Dies äußert sich durch das Schrumpfen der Zelle, die Kondensation des Chromatins und die Abschnürung von Vesikeln („apoptotic bodies“). Letztere können auf Grund der Externalisierung von Phosphatidylserin schnell und problemlos von Makrophagen phagozytiert werden, bevor der intrazelluläre Inhalt austreten und eine entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes auslösen kann. (Zimmermann, Bonzon et al. 2001)

Eine wesentliche Rolle bei den intrazellulären Spalt- und Abbauvorgängen während der Apoptose spielen die Caspasen (**c**ysteine-directed, **a**spartate-specific proteases). Die Caspasen werden in ihrer inaktiven Form als Procaspasen synthetisiert und müssen zunächst zweimal gespalten werden, um aktiv werden zu können. Es gibt zwei verschiedene Arten von Caspasen (Nilsson and Cleveland 2003; Kumar, Abbas et al. 2005a):

1. Initiator-Caspasen (Caspase-2,-8,-9, und -10)
2. Effektor-Caspasen (Caspase-3,-6, und -7)

Die eine lange Pro-Domäne aufweisenden Initiator-Caspasen werden durch Aktivator-Proteine gespalten und aktiviert. Sie spalten und aktivieren nun ihrerseits die durch eine kurze Pro-Domäne gekennzeichneten Effektor-Caspasen. Die Effektor-Caspasen lösen durch Spaltung mehrerer hundert Proteine den Abbau der Zelle aus. (Zimmermann, Bonzon et al. 2001; Adams and Cory 2007)

Es gibt zwei verschieden ausgelöste Apoptosesignalwege, die zur Aktivierung der Caspase-Kaskaden und damit zum programmierten Zelltod führen:

1. Der intrinsische Signalweg
2. Der extrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird durch Signale während der embryonalen Entwicklung, durch unterschiedliche Stresssituationen, wie z.B. Hypoxie, DNA-Schäden, Onkogenaktivierung oder den Entzug von Wachstumsfaktoren in der Zelle aktiviert. Dabei ist die Regulation der Ausschüttung mitochondrialer Proteine, unter anderem von Cytochrom c, durch die Proteine der Bcl-2-Familie von entscheidender Wichtigkeit. (Jiang and Wang 2004; Meyer, Kim et al. 2006)

Die Bcl-2-Familie besteht aus drei Untergruppen, den antiapoptotischen Mitgliedern, z.B. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> oder Mcl-1, den proapoptotischen Mitgliedern der Bax-Untergruppe, z.B. Bax, Bak und Bok/Mtd, sowie der proapoptotischen Gruppe der „BH3-only“- Proteine, z.B. Bik, Bad oder Bim (Cory, Huang et al. 2003). Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie verhindern durch ihre Inhibition von Bax oder Bak die Störung der äußeren Mitochondrienmembranintegrität und damit die Ausschüttung mitochondrialer Proteine, wie die des Cytochroms c (Adams and Cory 2007).

In der gesunden Zelle besteht ein Gleichgewicht zwischen anti- und proapoptotischen Faktoren (Meyer, Kim et al. 2006). Dieses kann durch Aktivierung von BH3-only-Proteinen zu Gunsten der proapoptotischen Faktoren verschoben werden. Die BH3-only-Proteine wirken als Sensoren für verschiedene Arten von Zellstress oder Zellschäden (Adams and Cory 2007). Werden die BH3-only-Protein-Sensoren dementsprechend aktiviert, binden sie die antiapoptotischen Proteine und neutralisieren sie, sodass die proapoptotischen Proteine an der Mitochondrienmembran das Übergewicht erlangen. Diese Verschiebung des

Gleichgewichts löst die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie das Cytochrom c aus. Es ist noch unklar, über welchen Mechanismus Bak und Bax veranlasst werden den Cytochrom c-Ausstrom an der äußeren Mitochondrienmembran auszulösen und auf welche Weise sie dies erreichen (Adams and Cory 2007).

Der weitere Teil des Signalweges ist besser bekannt. Cytochrom c dockt im Zytoplasma an das Protein „apoptotic protease activating factor-1“ (Apaf-1) an. Gemeinsam binden sie an die Procaspase-9, aktivieren diese und bilden zusammen mit ihr das „Apoptosom“. Das Apoptosom wiederum spaltet die Procaspase-3 in ihre aktive Form, die Caspase-3, die ihrerseits mit der Spaltung einer Vielzahl von Proteinen beginnt und so den Abbau der Zelle bewirkt. (Zimmermann, Bonzon et al. 2001)

Eine weitere wichtige Komponente die am intrinsischen Signalweg der Apoptose beteiligt ist, ist p53. Über welche Mechanismen p53 die Apoptose beeinflusst, ob nur als Transkriptionsfaktor, oder auch über eine direkte Beeinflussung von Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> und Bax ist Gegenstand laufender Untersuchungen (Chipuk and Green 2006; Adams and Cory 2007).

Die extrinsisch ausgelöste Apoptose wird durch die Bindung von Liganden, z.B. FasL oder TNF- $\alpha$ , an den entsprechenden Rezeptor aus der TNFR-Familie in Gang gesetzt. Die Rezeptorproteine enthalten eine zytoplasmatische Domäne, auch Todesdomäne genannt, z.B. das „Fas-associated death domain“ Protein (FADD) am Fas-Rezeptor, an die ein Adapterprotein binden kann. Zusammen mit weiteren Komponenten bilden die Todesdomänen der Rezeptoren mit der Todesdomäne des FADD-Proteins den „death-inducing-signaling-complex“ (DISC). Der DISC spaltet die Procaspasen -2, -8 und -10 in ihre aktive Form, die entsprechenden Initiator-Caspasen. Diese bewirken die Aktivierung der Effektor-Caspasen Caspase-3, -6 und -7, die ihrerseits durch Spaltung einer Vielzahl von Proteinen zum Zellabbau führen. (Zimmermann, Bonzon et al. 2001; Nilsson and Cleveland 2003)

Im Übrigen besteht eine Vernetzung des extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptose-signalweg. Dies wird durch Spaltung des proapoptotischen BH3-only Proteins Bid in „truncated“ Bid (tBid) durch die beiden Initiator-Caspasen -2 bzw. -8 erreicht. tBid löst seinerseits über Bax oder Bak den Cytochrom c-Ausstrom aus (Nilsson and Cleveland 2003).

### **2.5 *c-Myc***

Das Gen *c-Myc* ist von großer Bedeutung sowohl für die Zellzyklusregulation als auch für die Apoptose. Vor mehr als 25 Jahren wurde *c-Myc* als humanes Homolog eines retroviralen Onkogens (*v-Myc*) identifiziert (Meyer and Penn 2008).

Es gehört zu einer Familie von Genen, von denen neben *c-Myc* nur noch die beiden Familienmitglieder *L-Myc* und *N-Myc* neoplastisches Potential besitzen (Dang 1999; Dang 2012). *c-Myc* ist eines der am häufigsten aktivierten Onkogene und schätzungsweise an

20% aller menschlichen Krebserkrankungen beteiligt (Dang, O'Donnell et al. 2006). Andere Schätzungen gehen sogar davon aus, dass *c-Myc* in bis zu 70% aller Krebserkrankungen des Menschen dereguliert ist (Keller, Old et al. 2007; Dang 2012). *c-Myc* kodiert für ein nukleäres Protein, das als Transkriptionsfaktor wirkt (Cowling and Cole 2006) und 10 - 15% aller Gene im Genom regulieren kann (Li, Van Calcar et al. 2003; Meyer and Penn 2008). Von *c-Myc* regulierte Gene sind auf der Internetseite [www.myc-cancer-gene.org](http://www.myc-cancer-gene.org) zusammengetragen (Zeller, Jegga et al. 2003). *c-Myc* regelt nicht nur die Transkription von für Proteine kodierenden Genen sondern auch die Transkription von Genen, die für nicht-Protein-kodierende RNA-Produkte wie z.B. mikroRNAs stehen (O'Donnell, Wentzel et al. 2005; Dang, O'Donnell et al. 2006).

### 2.5.1 Regulation und Wirkmechanismus des Transkriptionsfaktor *c-Myc*

Die *c-Myc*-Expression wird durch viele Wachstumsfaktoren, Zytokine und Mitogene aktiviert die auf die verschiedenen Zellarten einwirken (Kelly, Cochran et al. 1983; Morrow, Lee et al. 1992; Shibuya, Yoneyama et al. 1992; Sato, Sakamaki et al. 1993; Grandori, Cowley et al. 2000). Es ist damit selbst Zielgen einer ganzen Reihe anderer Transkriptionsfaktoren und auch andere DNA-Strukturen wie non-B DNA scheinen an der Regulation seiner Transkription mitbeteiligt zu sein (Levens 2010; Dang 2012). Dabei zeigt sich eine starke Korrelation zwischen der Expression von *c-Myc* und der Proliferation der Zellen (Grandori, Cowley et al. 2000). Während die *c-Myc*-Konzentration z.B. nach Aktivierung durch mitogene Signale schnell ansteigt, reagiert die Zelle auf die Bindung antiproliferativer Faktoren indem sie die *c-Myc*-Expression unterdrückt, was das Absinken der *c-Myc*-Konzentration zur Folge hat (Grandori, Cowley et al. 2000; Ramana, Grammatikakis et al. 2000). Neben der transkriptionellen Regulation findet aber auch eine translationale Modulation der mRNA (Gregory and Hann 2000; Sachdeva, Zhu et al. 2009; Christoffersen, Shalgi et al. 2010) sowie eine posttranslationale Modifikation des Protein *c-Myc* (Gregory and Hann 2000) statt.

*c-Myc* weist für seine Funktion als Transaktivator eine c-terminale basic-helix-loop-helix-leucine-zipper (bHLHZip)-Region auf, die die Heterodimerisierung mit einem weiteren bHLHZip-Protein, namens Max, benötigt, um die Enhancer-Box-Sequenz CACGTG (Blackwood and Eisenman 1991) und alternative, verwandte Sequenzen im Genom erkennen und an diese binden zu können (Eisenman 2001). Max bindet außer mit *c-Myc* auch mit sich selbst und mit einer Reihe weiterer bHLHZip-Proteine, die einer mit *c-Myc* verwandten Proteinfamilie entspringen. Dazu gehören: Mnt, Mxd 1-4 und Mga. Auch diese Proteine heterodimerisieren mit Max, um an dieselben E-Boxen wie *c-Myc* binden zu können. Dort wirken sie als Transrepressoren bestimmter *c-Myc*-Zielgene, indem sie über zwei Korepressoren unter anderem mit Histon-Deacetylasen interagieren. Sie verändern die Chromatinstruktur und machen eine Transkription unmöglich. Damit wirken sie der Histonacetylierung durch den Myc-Max-Komplex entgegen. Die Heterodimerisierung der

bHLHZip-Proteine mit Max und ihre Folgen dient damit wahrscheinlich als einer von mehreren Mechanismen, die zur Regulierung der c-Myc-Funktion beitragen (Hurlin and Huang 2006).

Seine Wirkung erzielt c-Myc durch die Interaktion seiner n-terminalen Transaktivator-domäne mit einer entsprechenden DNA-Bindungsdomäne im Genom. Dadurch kommt es zur Transaktivierung der entsprechend ausgestatteten Zielgene (Cowling and Cole 2006). Dabei bedient sich c-Myc verschiedener Kofaktoren, die es bei der Bindung des Myc-Max-Komplexes an die DNA rekrutiert, und die die Transkription durch verschiedene Mechanismen aktivieren. Einer dieser Kofaktoren ist z.B. TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein), mit dessen Hilfe c-Myc Histon-Acetyltransferasen mobilisiert, die durch die Acetylierung der Histone in den Nucleosomen die Chromatinstruktur verändern (McMahon, Wood et al. 2000; Cowling and Cole 2006). Außerdem wird vermutet, dass c-Myc über die Methylierung von Histonen (Knoepfler, Zhang et al. 2006) bzw. ATP-abhängige Chromatin-Remodelling-Komplexe (Cheng, Davies et al. 1999) auf die Chromatinstruktur einwirkt. (Meyer and Penn 2008)

c-Myc ist nicht nur Transaktivator einer Vielzahl von Zielgenen, sondern es wirkt auch bei einer mindestens ebenso großen Anzahl von Zielgenen als Transrepressor (Meyer and Penn 2008). Auch für diese Funktion ist die Heterodimerisierung mit Max notwendig. Der Myc-Max-Komplex kann direkt mit Transaktivatoren, z.B. Miz-1 (Peukert, Staller et al. 1997; Wanzel, Herold et al. 2003; Wu, Cetinkaya et al. 2003), interagieren, deren Koaktivatoren verdrängen, bzw. Korepressoren rekrutieren und damit zur Transrepression des Zielgens führen (Dang, O'Donnell et al. 2006; Meyer and Penn 2008).

Während die meisten Daten Max als einen unverzichtbaren Partner des Transkriptionsfaktors c-Myc zeigen, weisen einige Untersuchungen auf mögliche Max-unabhängige Wirkungen von c-Myc hin (Hopewell and Ziff 1995; Wert, Kennedy et al. 2001; Cowling and Cole 2007; Steiger, Furrer et al. 2008)

### 2.5.2 c-Myc und die Regulation des Zellzyklus

c-Myc übt seine proliferative Wirkung zum einen durch die Transaktivierung proliferationsfördernder Gene wie *Cyclin E1*, *Cyclin B1* oder *E2f1* aus, zum anderen durch die Transrepression proliferationshemmender Gene wie *p21<sup>Cip1/WAF1</sup>* oder *p15<sup>Ink4a</sup>* und die Transrepression das Wachstum arretierender Gene wie *Gadd45* (Dang, O'Donnell et al. 2006; Meyer and Penn 2008). Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mitogenen bewirken eine beschleunigte Aktivierung des Transkriptionsfaktors und damit eine Steigerung der Proliferation, vgl. unter 2.5.1. Im Gegenzug führen antiproliferative Signale zur Unterdrückung der c-Myc-Expression (Waters, Littlewood et al. 1991; Obaya, Mateyak et al. 1999).

Die wichtige Rolle, die *c-Myc* im Zellzyklus spielt, wird durch Forschungsergebnisse an Zelllinien, die für *c-Myc* heterozygot sind (HET 15 und 16) unterstrichen. Die Resultate zeigen, dass diese Zellen bei reduzierter *c-Myc*-Expression für den G<sub>1</sub>/S-Übergang wesentlich mehr Zeit benötigen als die Kontrollzellen (Hanson, Shichiri et al. 1994). Des Weiteren konnte bei Untersuchungen an *c-Myc*-null-Zellen (HO15.19 und HO 16.4C) festgestellt werden, dass bei diesen deutliche Wachstumsverzögerungen bestehen, sie jedoch lebensfähig sind und zu normaler Zellgröße heranwachsen. Der Grund für die Verzögerung ist insbesondere auf Verlängerungen der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phasen zurück zu führen (Mateyak, Obaya et al. 1997).

### 2.5.3 Apoptoseinduktion durch Überexpression von *c-Myc*

Eine wesentliche Eigenschaft von *c-Myc* ist die Sensibilisierung der Zelle für die Apoptose (Evan, Wyllie et al. 1992). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei dieser Sensibilisierung um eine normale Reaktion auf die *c-Myc*-Überexpression in der Zelle handelt, die jedoch durch Überlebenssignale wie IGF oder PDGF neutralisiert werden kann (Harrington, Bennett et al. 1994). Laut dem „dual-signal“-Modell kommt es zur Apoptose, wenn das proliferationsfördernde *c-Myc* in erhöhter Konzentration vorliegt und gleichzeitig keine Überlebenssignale bzw. antiapoptotischen Signale auf die Zelle einwirken (Evan and Littlewood 1993; Harrington, Bennett et al. 1994; Meyer, Kim et al. 2006). Gestützt wird dieses Modell zusätzlich durch die Erkenntnis, dass sich *c-Myc*-defiziente Zellen verglichen mit für *c-Myc*-heterozygoten Zellen als resistenter gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli erweisen (de Alboran, Baena et al. 2004; Meyer, Kim et al. 2006).

Die genauen Abläufe der Mechanismen, durch die *c-Myc* die Apoptose induziert, sind noch nicht bekannt. Geklärt ist jedoch, dass *c-Myc* mehrere Pfade reguliert, über die die Apoptose eingeleitet wird. Die Sensibilisierung und Potenzierung der Apoptose durch die Überexpression von *c-Myc* erfolgt sowohl abhängig von p53 (Hermeking and Eick 1994), als auch unabhängig von p53 (Sakamuro, Eviner et al. 1995; Meyer, Kim et al. 2006). In beiden Fällen vollzieht sich die Sensibilisierung höchstwahrscheinlich durch die Verschiebung des Gleichgewichts der pro- und antiapoptotischen Faktoren an der Mitochondrienmembran zu Gunsten der proapoptotischen Faktoren. Dadurch kann es zum Cytochrom *c*-Ausstrom und dem weiteren Ablauf der Apoptose kommen (Meyer, Kim et al. 2006).

p53 ist ein wichtiges Protein im Zellzyklus, das sowohl einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase als auch die Apoptose auslösen kann. Neben der Überexpression von *c-Myc* können auch andere Onkogene oder Zellschädigungen, z.B. DNA-Schäden oder eine Hypoxie, einen Konzentrationsanstieg von p53 herbeiführen. In der gesunden Zelle werden seine Konzentrationen durch die E3-Ubiquitinligase Mdm2 entsprechend niedrig gehalten (Meyer, Kim et al. 2006). Die Überexpression von *c-Myc* führt zu einer vermehrten *Arf*-Expression und somit zu einer erhöhten *Arf*-Konzentration in der Zelle (Zindy, Eischen et al. 1998). *Arf*

interagiert mit Mdm2 (Honda and Yasuda 1999; Weber, Taylor et al. 1999), hemmt die Ubiquitinierung sowie die Translokation von p53 aus dem Nukleus und somit seinen Abbau (Brooks and Gu 2003). Es folgt der Konzentrationsanstieg von p53 der zum Zellzyklusarrest bzw. zur Apoptose führt (Meyer, Kim et al. 2006).

Den Zellzyklusarrest löst p53 als Transkriptionsfaktor durch die Induktion des Proteins p21<sup>Cip1</sup> aus, welches ein Cdk-Inhibitor in der G<sub>1</sub>-Phase ist (el-Deiry, Tokino et al. 1993; Harper, Elledge et al. 1995; Gartel and Tyner 1999). Proapoptotisch wirkt p53 indem es als Transkriptionsfaktor die Expression proapoptotischer Gene, z.B. *Bax* (Miyashita, Krajewski et al. 1994), *Puma* (Nakano and Vousden 2001) und *Noxa* (Oda, Ohki et al. 2000) induziert, und die Expression von antiapoptotischen Genen wie *Bcl-2* (Miyashita, Krajewski et al. 1994) reduziert. (Nilsson and Cleveland 2003)

c-Myc induziert p53 nicht nur indirekt, sondern hemmt gleichzeitig auch die zellzyklusarretierende Wirkung von p53, indem es z.B. durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Miz-1 die Induktion von p21<sup>Cip1</sup> verhindert (Wu, Cetinkaya et al. 2003). Aus diesem Grund gehen die Zellen, die c-Myc überexprimieren nicht in den Zellzyklusarrest, sondern beschreiten den Weg in die Apoptose (Nilsson and Cleveland 2003).

Die Bedeutung, die der Arf-Mdm2-p53-Signalweg für die durch c-Myc-induzierte Apoptose hat, zeigt sich, wenn seine Funktion ausfällt (Meyer and Penn 2008). In Mausmodellen konnte dargestellt werden, dass eine c-Myc-induzierte Krebsentstehung durch Störung des Arf-Mdm2-p53-Signalweges wesentlich beschleunigt wird (Eischen, Weber et al. 1999). Ein weiterer Beleg für die große Bedeutung dieses Signalweges ist die Häufigkeit, mit der dieser Mechanismus in Burkitt-Lymphomzelllinien und E $\mu$ -Myc-Mäusen gestört ist (Eischen, Weber et al. 1999; Lindstrom, Klangby et al. 2001; Meyer, Kim et al. 2006).

Ein anderer proapoptotischer Mechanismus von c-Myc ließ sich ebenfalls im E $\mu$ -Myc-Modell darstellen. c-Myc unterdrückt in präkanzerösen B-Zellen auf indirektem Weg und unabhängig vom Arf/p53-Status die Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>. Dieser Schutzmechanismus scheint bei einem hohen Prozentsatz der Lymphomzellen umgangen zu sein, da in diesen Zellen Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub> oder auch beide Gene gemeinsam in überexprimierter Form vorlagen. Auch dies zeigte keine Abhängigkeit vom Status des Arf-Mdm2-p53-Signalweges (Eischen, Packham et al. 2001; Eischen, Woo et al. 2001; Maclean, Keller et al. 2003; Meyer, Kim et al. 2006).

Andere Untersuchungen am E $\mu$ -Myc-Modell weisen auf eine proapoptotische Zusammenarbeit zwischen c-Myc und dem proapoptotischen Protein Bax hin, da ein Verlust von Bax die c-Myc-induzierte Lymphomgenese beschleunigt (Eischen, Roussel et al. 2001; Juin, Hunt et al. 2002). Dabei scheint c-Myc keine Auswirkung auf die Expression von *Bax* zu haben, sondern seine Wirkung über andere, die Oligomerisierung von Bax an der Mitochondrienmembran beeinflussende Faktoren auszuüben (Meyer, Kim et al. 2006).

Als sicher gilt, dass die Apoptoseaktivierung auch komplett unabhängig von p53 erfolgen kann (Sakamuro, Eviner et al. 1995; Meyer, Kim et al. 2006). Dies geschieht möglicherweise durch die indirekte Hochregulierung des proapoptotischen Proteins Bim durch c-Myc. Bim wirkt proapoptotisch durch Bindung und damit Inaktivierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Der Knockout von Bim in E $\mu$ -Myc Mäusen führt zu einer beschleunigten Entstehung des Lymphoms, ohne dass es zu einer Inaktivierung des Arf-Mdm2-p53-Signalweges zu kommen scheint (Egle, Harris et al. 2004; Meyer and Penn 2008).

Festzuhalten ist, dass eine Vielzahl von Proteinen an der von c-Myc-induzierten Apoptose beteiligt ist. Der extrinsische Apoptoseweg scheint ebenfalls an der c-Myc-induzierten Apoptose beteiligt zu sein (Meyer, Kim et al. 2006). Insgesamt betrachtet, weisen die Vorgänge, die der Einwirkung von c-Myc unterliegen und Auswirkungen auf die Apoptose haben, einen äußerst komplexen Mechanismus auf, der fundamentale Bedeutung für die Tumorentwicklung hat.

### **2.5.4 Weitere wichtige Funktionen von c-Myc in der Zelle**

In vielen Zellen verhindert (Grandori, Cowley et al. 2000) oder moduliert c-Myc die terminale Differenzierung, z.B. in B-Lymphozyten (Langdon, Harris et al. 1986) oder Muskelzellen (Miner and Wold 1991). Selten kann es die Differenzierung auch fördern, z.B. in epidermalen Keratinozyten (Gandarillas and Watt 1997).

Indem c-Myc die Proteinbiosynthese steigert (Mateyak, Obaya et al. 1997), kann es das Zellgrößenwachstum verstärken (Schuhmacher, Staeger et al. 1999). Dies gelingt durch Expression von Genen, die an der Biosynthese von Ribosomen beteiligt sind (Gomez-Roman, Grandori et al. 2003) oder auch von Genen, die direkt für ribosomale RNAs und ribosomale Proteine wie Rps11 (Coller, Grandori et al. 2000; Menssen and Hermeking 2002) kodieren. (Dang, O'Donnell et al. 2006)

Ebenso wirkt c-Myc auf den Zellmetabolismus, beispielsweise durch gesteigerte Expression von Genen zur Förderung der Glukoseaufnahme sowie der Glykolyse (Menssen and Hermeking 2002) oder durch die vermehrte Expression von für die Nukleotidsynthese wichtigen Genen, z.B. von *Odc* (Bello-Fernandez, Packham et al. 1993). (Dang, O'Donnell et al. 2006)

Die Expression einiger Zelladhäsionsgene, z.B. von verschiedenen Kollagenen (Yang, Geddes et al. 1991) oder Integrinen (Inghirami, Grignani et al. 1990; Barr, Campbell et al. 1998) wird durch die Transrepressor-Funktion von c-Myc unterdrückt. Dieser Umstand ist vermutlich für das adhäsionsunabhängige Wachstum verantwortlich, welches auf c-Myc-Überexpression beruhen kann (Dang, Resar et al. 1999).

Auf die Angiogenese nimmt c-Myc ebenfalls Einfluss. Während sich embryonale Stammzellen aus Mausembryonen mit *c-Myc*<sup>-/-</sup> Genotyp in der Vaskularisierung und Angiogenese deutlich eingeschränkt zeigen und damit auch in ihrer Fähigkeit Tumoren zu

bilden (Baudino, McKay et al. 2002), gelingt c-Myc die Förderung der Angiogenese, indem es durch Induktion des miR17-92 mikroRNA-Clusters den sie hemmenden Faktor Thrombospondin unterdrückt (Dews, Homayouni et al. 2006). Ebenso initiiert c-Myc die Angiogenese durch Induktion von IL-1 $\beta$  in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und bewirkt damit die Ausschüttung von VEGF (Shchors, Shchors et al. 2006).

### 2.5.5 Deregulation des Transkriptionsfaktors c-Myc

Die Vielzahl der Funktionen, die c-Myc in der Zelle und im Organismus übernimmt, und deren große Bedeutung setzt eine exakte Regulation voraus. Gerade wegen der vielen und komplexen Mechanismen, die zur Regulation von c-Myc beitragen, können sich verschiedenartigste Möglichkeiten an Störungen dieser Abläufe und damit einer Deregulation von c-Myc ergeben, was ein häufiges Ereignis in transformierenden Zellen ist (Dang 2012). Zu den fehlgesteuerten Mechanismen zählen z.B. die Insertion eines retroviralen Promotors (Hayward, Neel et al. 1981), chromosomale Translokationen zwischen dem Immunglobulin heavy chain locus (Chr. 14, 2 oder 22) und dem *c-Myc*-Onkogen (Chr. 8) (Neel, Jhanwar et al. 1982; Taub, Kirsch et al. 1982) oder auch Amplifikationen von *c-Myc* (Collins and Groudine 1982; Dalla-Favera, Wong-Staal et al. 1982; Alitalo, Schwab et al. 1983). Alle aufgezählten Mechanismen erhöhen die Genexpression von *c-Myc*. Eine Dysregulation kann indessen auch durch die Aktivierung einer auf *c-Myc* wirkenden Signalkaskade (He, Sparks et al. 1998; Palomero, Lim et al. 2006) oder durch eine verlängerte Proteinhalbwertszeit (Wang, Cunningham et al. 2011) verursacht werden (Meyer, Kim et al. 2006; Dang 2012).

Die Deregulation von c-Myc verstärkt die Proliferation und birgt immer die Gefahr der malignen Transformation für die betroffene Zelle (Meyer and Penn 2008). Zusätzlich scheint die *c-Myc*-Überexpression zur Instabilität des Genoms bzw. insbesondere auch zur chromosomalen Instabilität beizutragen. Die genauen Mechanismen sind bisher aber noch ungeklärt (Felsher and Bishop 1999; Karlsson, Deb-Basu et al. 2003; Ray, Atkuri et al. 2006; Meyer and Penn 2008; Dang 2012).

Unabhängig davon durch welchen Mechanismus eine Dysregulation von c-Myc ausgelöst wird, führt seine Überexpression in Abwesenheit von Überlebenssignalen normalerweise zur Apoptose (Harrington, Bennett et al. 1994). Dennoch kommt es immer wieder, z.B. auch durch weitere Mutationen, zur Umgehung der Apoptose und zur Tumorentwicklung (Strasser, Harris et al. 1990; Luo, Li et al. 2005). Diese Interaktionen mit anderen Genen bzw. ihren Proteinprodukten können dabei sowohl eine inhibierende als auch eine fördernde Wirkung auf die Tumorentstehung haben (Strasser, Harris et al. 1990; Eischen, Weber et al. 1999; Egle, Harris et al. 2004; Michalak, Jansen et al. 2009). Die Interaktionspartner von c-Myc gilt es zu erkennen und die Art der Interaktion zu verstehen. Ein solcher Interaktionspartner könnte das Protein Nipa sein, das für die Regulation der nukleären Cyclin B1-Konzentrationen wichtig ist.

## 2.6 Nipa

Das nukleäre Protein Nipa (nuclear interaction partner of ALK) wurde bei einem Screening entdeckt, das für Phosphotyrosin-abhängige Interaktionspartner von aktiven ALK (anaplastic lymphoma kinase) - Fusionsproteinen durchgeführt wurde (Ouyang, Bai et al. 2003). Nipa, eine E3-Ubiquitinligase ist an der subzellulären Regulation von Cyclin B1 beteiligt (Bassermann, Peschel et al. 2005).

Es handelt sich dabei nicht um den einzigen Regulationsmechanismus für dieses, für den Zellzyklus wichtige Protein Cyclin B1. Damit die Zelle von der G<sub>2</sub>- in die M-Phase wechseln kann, muss sich der MPF durch Bindung von Cyclin B1 an die Cdk1 bilden, aktiviert werden und im Nukleus anhäufen, vgl. hierzu unter 2.2. Ein verfrühter Anstieg des MPF im Nukleus führt zum vorzeitigen Mitoseeintritt. Dadurch werden die DNA-Replikation und somit die genomische Stabilität gefährdet (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Um einen planmäßigen MPF-Anstieg zu gewährleisten, wird dieser auf zwei molekularen Ebenen reguliert (Bassermann, Peschel et al. 2005).

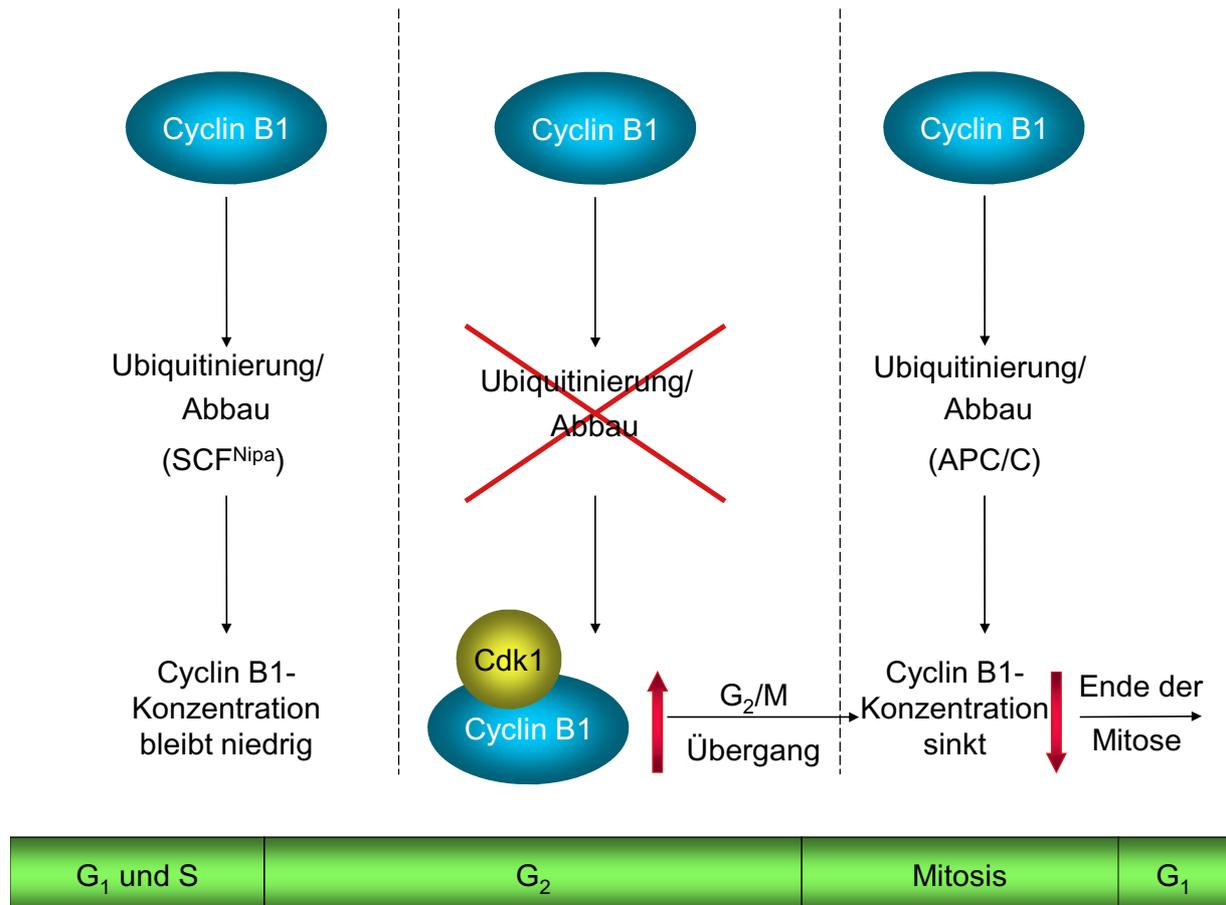
Zum einen gelingt dies durch Regulation der Aktivität der Cdk1-Untereinheit. Durch die Phosphorylierung von Tyr 14 und Thr 15 durch die Kinasen Wee1 (Russell and Nurse 1987; Heald, McLoughlin et al. 1993) und Myt1 (Mueller, Coleman et al. 1995) wird die Aktivität der Cdk1-Untereinheit gehemmt (Hagting, Karlsson et al. 1998). Die Dephosphorylierung derselben Aminosäuren durch die Cdc25 (Gautier, Solomon et al. 1991) und die zusätzliche Phosphorylierung des Thr 161 durch die Cak (Fesquet, Labbe et al. 1993) aktiviert die Cdk1-Untereinheit in der G<sub>2</sub>-Phase (Stark and Taylor 2006).

Zum anderen vollzieht sich die Regulierung des MPF maßgeblich durch sein Verteilungsmuster in der Zelle. Dies wird durch Veränderungen an der Cyclin B1-Untereinheit ermöglicht. Während der Interphase wird der MPF mit Hilfe von Transportsystemen, die ihn aus dem Nukleus heraus ins Zytoplasma befördern, daran gehindert, sich in entsprechender Konzentration im Zellkern anzuhäufen (Hagting, Karlsson et al. 1998; Yang, Bardes et al. 1998). Die Phosphorylierung von Cyclin B1 an der CRS (cytoplasmic retention signal)-Region verstärkt den Import des MPF in den Nukleus und hemmt den Export aus diesem. Dies führt zum Konzentrationsanstieg des MPF im Nukleus (Hagting, Jackman et al. 1999).

Ein weiterer Mechanismus, durch den die Akkumulation von Cyclin B1 im Zellkern zum falschen Zeitpunkt verhindert wird, wurde bei Untersuchungen zur Charakterisierung des Proteins Nipa entdeckt (Bassermann, Peschel et al. 2005).

Bei Nipa handelt es sich um ein F-Box-enthaltendes Protein, dessen Gen insbesondere in der S- und der G<sub>2</sub>/M-Übergangsphase exprimiert wird (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Nipa bildet in der Interphase den für das Substrat spezifischen Teil einer Skp1-Cullin-F-Box(SCF)-E3-Ubiquitinligase, die für die Ubiquitinierung und damit die Degradation des nukleären Cyclin B1 zuständig ist (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Vor dem G<sub>2</sub>/M-

Übergang löst sich Nipa durch Phosphorylierung von Ser 354, Ser 359 und Ser 395 immer weiter von den anderen Komponenten, die den SCF-Komplex bilden, und wird dadurch inaktiv (Bassermann, von Klitzing et al. 2005; Bassermann, von Klitzing et al. 2007). Der daraus resultierende Konzentrationsanstieg von Cyclin B1 im Nukleus veranlasst den Eintritt der Zelle in die Mitose. Der SCF<sup>Nipa</sup>-Komplex bildet somit in der Interphase das Gegenstück zu einer am Ende der Mitose aktiven (anaphase promoting complex/cyclosome) APC/C-Ubiquitinligase, die ebenfalls Cyclin B1 ubiquitiniert und am Ende der Mitosephase durch die sinkende nukleäre Cyclin B1-Konzentration zur Beendigung der Mitose führt (Bassermann, von Klitzing et al. 2005; Bassermann, von Klitzing et al. 2007).



**Abb. 1** Regulation der nukleären Cyclin B1-Konzentration durch Ubiquitinierung im Zellzyklus:

In der Interphase werden die nukleären Cyclin B1-Konzentrationen unter anderem durch die Ubiquitinierung von Cyclin B1 mit Hilfe des nukleären SCF<sup>Nipa</sup>-Komplexes in niedrigen Konzentrationen stabil gehalten. Beim G<sub>2</sub>/M-Übergang wird diese Ubiquitinligase phosphoryliert und damit inaktiviert, sodass es zum Anstieg der Cyclin B1-Konzentration im Zellkern und damit zum Mitoseeintritt kommt. Die Aufgabe, die nukleäre Cyclin B1-Konzentration am Ende der Mitose wieder auf das Interphaseniveau zu senken übernimmt eine APC/C-Ubiquitinligase.

Das phosphorylierte und damit vom SCF-Komplex abgespaltene Nipa selbst wird in der späten Mitosephase ebenfalls durch eine APC/C-Ubiquitinligase, die APC/C<sup>Cdh1</sup> ubiquitiniert und damit zum Abbau freigegeben. Dabei scheint nicht die Phosphorylierung der ausschlaggebende Faktor für den Abbau von Nipa darzustellen, sondern vielmehr die

Abspaltung vom SCF-Komplex, speziell von Skp1, welche allerdings wiederum an die Phosphorylierung von Nipa gebunden ist (Klitzing, Huss et al. 2011).

Der siRNA-Knockdown von *Nipa* führt zu einem verfrühten Anstieg der Konzentration von aktivem MPF und dadurch zum vorzeitigen Eintritt der Zellen in die Mitose, was den Zellzyklusarrest in der Prometaphase zur Folge hat (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Grund für den Zellzyklusarrest kann zum einen eine mögliche Akkumulation weiterer, noch nicht identifizierter Substrate des SCF<sup>Nipa</sup>-Komplexes sein, zum anderen die mögliche Aktivierung eines Zellzyklus-Kontrollpunktes innerhalb der Mitose, die durch DNA-Schäden auf Grund des vorzeitigen Mitoseeintritts, ausgelöst wird (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Die Effekte, die ein SCF<sup>Nipa</sup>-Funktionsverlust im Tiermodell hat, wurden bei *Nipa*-Knockout-Mäusen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Tiere lebensfähig und insbesondere die männlichen Mäuse kleiner und auf Grund einer Störung der Meiose komplett unfruchtbar sind. Die weiblichen Tiere sind ebenfalls kleiner als Weibchen ohne *Nipa-Knockout* und haben eine verminderte Fruchtbarkeit. Ansonsten zeigten die Tiere keine Auffälligkeiten (Illert, Fritz et al. 2008; Illert, Kawaguchi et al. 2012).

Im Gegensatz zum Funktionsverlust von SCF<sup>Nipa</sup> führt die Verhinderung der Phosphorylierung von Nipa am Ser 354 zu einem konstitutiv aktiven SCF<sup>Nipa</sup>-Komplex und zur Verzögerung des Mitoseeintritts (Bassermann, von Klitzing et al. 2005).

Die oszillierende Aktivität von *Nipa* stellt einen potenten Mechanismus zur Regulation nukleärer Cyclin B1-Konzentrationen während des Zellzyklus und damit für den rechtzeitigen Mitoseeintritt dar (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Damit beeinflusst *Nipa* wie c-Myc über Cyclin B1 den G<sub>2</sub>/M-Übergang in der Zelle. Ob *Nipa* über seine Regulationsfunktion von Cyclin B1 auch eine Rolle in der c-Myc-induzierten Tumorgenese spielen kann, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

### 3 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Dissertation ist die funktionelle Überprüfung der Rolle von *Nipa* bei der Tumorentstehung in einem *Myc*-AML-Mausmodell.

Sowohl c-Myc als auch *Nipa* beeinflussen die Vorgänge während des Zellzyklus. Ein gemeinsamer Ansatzpunkt ist dabei die Regulation von Cyclin B1, dessen Expression durch den Transkriptionsfaktor c-Myc induziert (Yin, Grove et al. 2001; Menssen and Hermeking 2002; Mao, Watson et al. 2003) und dessen nukleäre Konzentration während der Interphase durch den SCF<sup>Nipa</sup>-Komplex reguliert wird (Bassermann, Peschel et al. 2005; Bassermann, von Klitzing et al. 2005; Bassermann, von Klitzing et al. 2007).

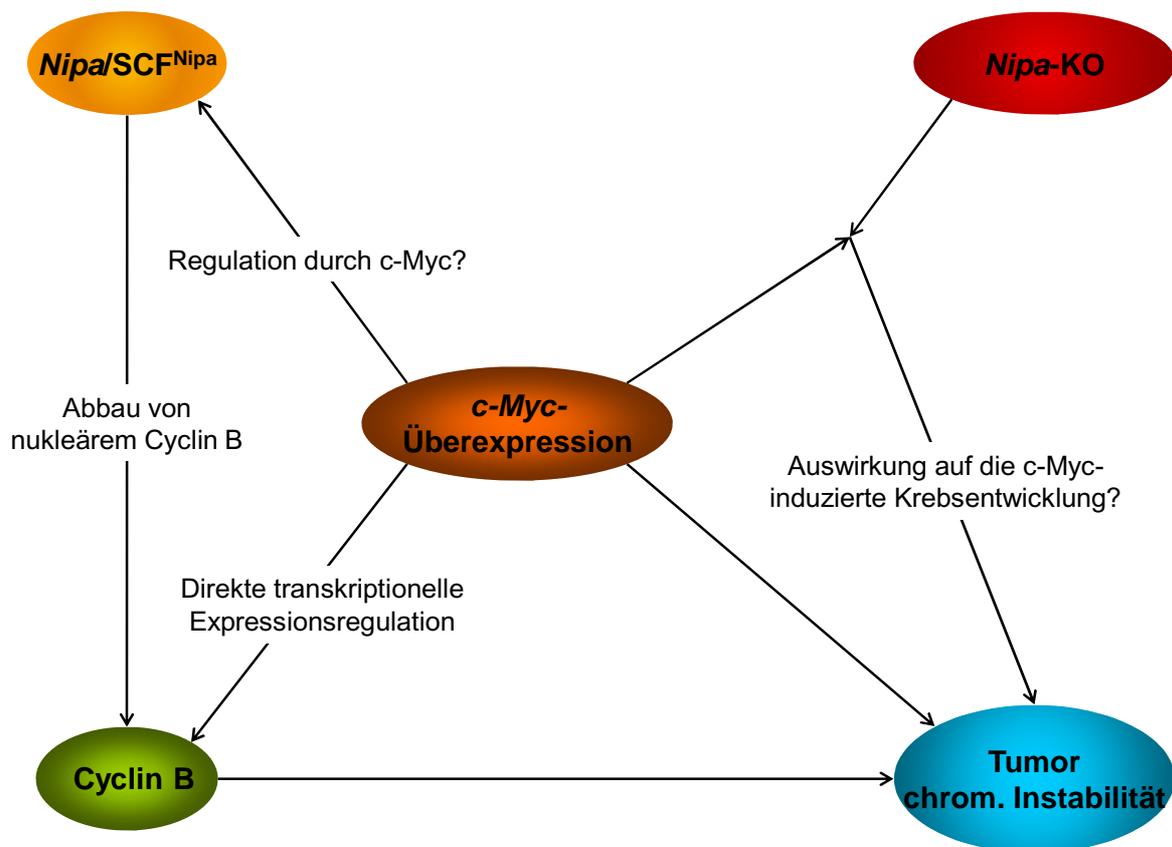


Abb. 2 Fragestellung der Arbeit:

Cyclin B1 wird auf verschiedene Art und Weise reguliert. c-Myc induziert durch direkte transkriptionelle Regulation die *Cyclin B1*-Expression. Die nukleäre Cyclin B1-Konzentration wird durch den SCF<sup>Nipa</sup>-Komplex während der Interphase reguliert. Die *c-Myc*-Überexpression führt zur Entstehung von Krebs. Frage 1: Welche Auswirkung hat ein zusätzlich zur *c-Myc*-Überexpression auftretender Verlust der *Nipa*-Funktion durch *Nipa*-Knockout auf die *c-Myc*-induzierte Tumorgenese? Frage 2: Beeinflusst der Transkriptionsfaktor c-Myc *Nipa* bzw. die SCF<sup>Nipa</sup>-Aktivität und nimmt somit auch auf nichttranskriptionellem Weg Einfluss auf Cyclin B1?

Während der *Nipa*-Knockout allein, trotz seiner beschleunigenden Wirkung, auf den Zellzyklus am G<sub>2</sub>/M-Übergang in vivo keine onkogene Wirkung zeigte (Illert, Fritz et al. 2008), ist ein Einfluss auf die *c-Myc*-induzierte Tumorgenese, nicht zuletzt auf Grund des

gemeinsamen Regulationszieles Cyclin B1, nicht auszuschließen. Dies führt zu folgenden Fragen (vgl. Abb. 2):

1. Spielt *Nipa* bei der durch *c-Myc*-induzierten Krebsentwicklung eine Rolle und wenn ja, welche?
2. Ist *Nipa* möglicherweise selbst Zielgen von *c-Myc*, das sodann über die Regulation von *Nipa* auch nichttranskriptionell Einfluss auf Cyclin B1 nehmen würde?

Diesen Fragen soll mit Hilfe eines *Myc*-AML-Mausmodells nachgegangen werden, das Luo, Li et al. 2005 erstmals beschrieben (Luo, Li et al. 2005). Dazu wurde *c-Myc* mittels retroviralen Gentransfers in Mausknochenmarkszellen mit normaler *Nipa*-Funktion (*Nipa*<sup>+/+</sup>) und zusätzlich in Mausknochenmarkszellen mit *Nipa*-Knockout (*Nipa*<sup>-/-</sup>) überexprimiert. Diese Knochenmarkszellen wurden, wie bei Luo, Li et al. 2005 ausgeführt, in letal vorbestrahlte Mäuse transplantiert und diese danach über einen längeren Zeitraum beobachtet. Spielt der *Nipa*-Knockout bei der *c-Myc*-induzierten Krebsentstehung eine Rolle, so sind 4 verschiedene Szenarien denkbar:

1. Die *c-Myc*-Überexpression und zusätzlich der Verlust der *Nipa*-Funktion lassen eine andere Erkrankung entstehen, als es bei einer reinen *c-Myc*-Überexpression der Fall ist. So entwickelte sich z.B. in Mäusen die *c-Myc* überexprimierten und gleichzeitig *Ink4a*<sup>-/-</sup> waren oder *Bcl2* überexprimierten eine Kombination aus ALL und AML (Luo, Li et al. 2005).
2. Der zusätzliche Verlust der *Nipa*-Funktion führt zusammen mit der *c-Myc*-Überexpression auf Grund eines Proliferationsvorteils der Zellen zu einem vorzeitigen Auftreten der AML.
3. Die Kombination aus *c-Myc*-Überexpression und *Nipa*-Verlust führt zur Aktivierung eines Zellzykluskontrollpunktes, der zum Zellzyklusarrest und damit zu einem verzögerten Auftreten der AML führt.
4. Der zusätzliche *Nipa*-Verlust aktiviert einen Zellzyklus-Kontrollpunkt der zum Abbruch des Zellzyklus und zur Apoptose der Zelle führt und damit die *c-Myc*-induzierte Krebsentstehung verhindert.

Mithin gilt es herauszufinden, ob bzw. wie sich die *c-Myc*-induzierte Tumorgenese in den *Nipa*<sup>+/+</sup> Mäusen von der in den *Nipa*<sup>-/-</sup> Mäusen unterscheidet und die möglichen Gründe hierfür zu diskutieren.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/ Bisacrylamid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose NEEO ultra quality Roti® Garose	Carl Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche (Mannheim)
Destilliertes Wasser (aqua dest.) (GIBCO Ultra Pure Distilled Water, DNase/RNase-free)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Riedel-de Haën (Seelze)
Diphtherie Toxin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dulbecco's phospho buffered saline (DPBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Essigsäure	Fluka (Buchs, SUI)
Ethanol p.a.	Riedel-de Haën (Seelze)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Fetales Bovines Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, AUT)
5-Fluoruracil (5-FU)	medac GmbH (Hamburg)
Formalin (4%)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen (Karlsruhe)
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hank's BSS (with Ca & Mg, with Phenol Red)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, AUT)
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hygromycin B	Clontech-Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, FR)
Interleukin-3 (mIL-3) und -6 (mIL-6) von der Maus	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt)
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) Pulver	Invitrogen (Karlsruhe)
Isopropanol	Fluka (Buchs, SUI)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe)
Lipofectamine® 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol 50 mM	Invitrogen (Karlsruhe)

Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Milchpulver	Carl Roth (Steinheim)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen (Karlsruhe)
Oligo dT-Primer	Qiagen (Hilden)
Opti-MEM <sup>®</sup>	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Invitrogen (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (Instamed 9,55g/l PBS Dulbecco)	Biochrom (Berlin)
Polybren	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ponceau S Lösung	Fluka (Buchs, SUI)
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Proteinstandard (Precision Plus Protein Standard Dual Color)	Bio-Rad (München)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Restore <sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (Rockford, USA)
RNaseOUT	Invitrogen (Karlsruhe)
Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640)	Invitrogen (Karlsruhe)
Stem cell factor von der Maus (mSCF)	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt)
SuperSignal <sup>®</sup> West Dura	Pierce (Rockford, USA)
SuperSignal <sup>®</sup> West Femto	Pierce (Rockford, USA)
SuperSignal <sup>®</sup> West Pico	Pierce (Rockford, USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris Pufferan <sup>®</sup> ≥ 99,9%, p.a.) (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypanblau 0,4%	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)

## 4.2 Enzyme

RNase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin	Invitrogen (Karlsruhe)

## 4.3 Plasmide

MSCV-IRES-GFP	Addgene Inc. (Cambridge, USA)
MSCV-MYC-IRES-GFP	Dr. Maurice Reimann, AG Clemens Schmitt, Charité-CVK, Universitätsmedizin Berlin

#### 4.4 Real-time PCR Primer

Gen	Sense Primer	Antisense Primer
<b>Human</b>		
<i>MYC</i>	5'-TTCTCTCCGTCCTCGGATTCTCT-3'	5'-AGAAGGTGATCCAGACTCTGACCT-3'
<i>CCNB1</i>	5'-TTCCAGTTATGCAGCACCTGGCTA-3'	5'-TCAGCTGTGGTAGAGTGCTGATCT-3'
<i>NIPA</i>	5'-TGCTCAAGTGCTCTAGCTGTCAAG-3'	5'-TTCTCATGGGCAGTACACAAGGCT-3'
<i>UB</i>	5'-ACCTGACCAGCAGCGTCTGATATT-3'	5'-TCGCAGTTGTATTTCTGGGCAAGC-3'
<b>Murin</b>		
<i>Myc</i>	5'-CAAATCCTGTACCTCGTCCGATTC-3'	5'-CTTCTTGCTCTTCTTCAGAGTCGC-3'
<i>Ccnb1</i>	5'-TGACAACGGTGAATGGACACCAAC-3'	5'-AGGCCACAGTTCACCATGACTACA-3'
<i>Nipa</i>	5'-GGGAGCTGATAGATGAAGGAATT-3'	5'-GCCCACTTCAAAGAAGAAAAGGTTT-3'
<i>Ub</i>	5'-TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT-3'	5'-GCAAGTGGCTAGAGTGCAGAGTAA-3'

#### 4.5 Antikörper

Antikörper wurden für die genaue Charakterisierung von Zellen auf Grund von Oberflächenmarker bei der FACS-Analyse und für die Detektion von speziellen Aminosäuresequenzen in Proteinen beim Western Blot verwendet.

##### 4.5.1 FACS

B220/CD45R (PE)	}	BD Biosciences (Heidelberg)
CD 11b/Integrin $\alpha_M$ chain (PE)		
CD 45/LCA/Ly-5 (PE-Cy <sup>TM</sup> 5)		
c-kit/CD 117 (PE)		
CD16/CD32/Fc $\gamma$ III/II Receptor (Purified)		
GR-1/Ly-6G/Ly-6C (PE)		
Thy-1.2/CD90.2 (PE)		

##### 4.5.2 Western Blot

<b>Erstantikörper:</b>	<b>Verdünnung</b>	
Anti- $\beta$ -Actin (Klon AC-15)	1:2 000	}
Anti-Cdk1	1:250	
Anti-c-Myc (N-262)	1:400	
Anti-Cyclin B1	1:200	
		Sigma-Aldrich (Steinheim)
<b>Zweitantikörper:</b>	<b>Verdünnung</b>	
Anti-mouse (HRP-linked)	1:10 000	}
Anti-rabbit (HRP-linked)	1:10 000	
		Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
		GE Healthcare Europe GmbH (München)

#### 4.6 Verbrauchsmaterialien

Einfriergefäß (CryoTube <sup>TM</sup> )	Corning (New York, US)
Einmalküvetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Einmalhandschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH

Einmalspritze (5 ml)	(Wien, AUT)
Einmalspritze (50 ml)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Einwegskalpell No. 21	Fresenius Kabi AG (Homburg)
Eppendorfgefäß 1,5 ml	Feather Safety Razor Co.LTD (Osaka, JP)
Eppendorfpipetten	Eppendorf (Hamburg)
FACS-Röhrchen	Eppendorf (Hamburg)
Filme (CL-Xposure film)	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
Filtereinheit (0,45 µm, Celluloseacetat)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Gaskartusche (Camingaz Stechkartusche C206)	Whatman GmbH (Dassel)
	Camingaz Deutschland GmbH
	(Ungen-Inheiden)
Gelelektrophoresekammer	Biometra (Göttingen)
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle ( Gr. 20)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
MicroAmp™ (Optical 96-Well Reaction Plate)	Applied Biosciences (Darmstadt)
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad (München)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, US)
Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	BD Biosciences (Erembodegem, BE)
Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Rundbodenröhrchen, Polypropylen (14 ml)	BD Biosciences (Erembodegem, BE)
S-Monovette® 1,2 ml K3E EDTA	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Stericup-Filtereinheit (0,22 µm)	Milipore (Schwalbach)
Tuberkulin-Sicherheitspritze (1 ml)	Tyco Healthcare Deutschland GmbH
	(Neustadt(Donau))
Whatman® Paper	Biometra biomedizinsiche Analytik GmbH
	(Goettingen)
6-, 12-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturschalen (6, 10cm)	TPP AG (Trasadingen, SUI)
Zellsieb (100µm)	BD Biosciences (Erembodegem, BE)

#### 4.7 Reaktionssysteme („kits“)

Bio-Rad Protein Assay	}	Bio-Rad (München)	
Qiagen® HiSpeed® Plasmid Maxi Kit		}	Qiagen (Hilden)
Qiagen® Omniscript RT Kit			
Qiagen® Qiashredder			
Qiagen® RNeasy Mini Kit			
Qiagen® Spin Miniprep Kit			
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG		Invitrogen (Karlsruhe)	

#### 4.8 Geräte

Bestrahlungsquelle (Cs <sup>137</sup> )	
Blutanalysegerät (scil Vet abc)	scil animal care company GmbH (Viernheim)

Brutschrank (Heraeus Hera cell 240)	Heraeus (Hanau)
Bunsenbrenner (Labogaz® 206)	Camingaz Deutschland GmbH (Ungen-Inheiden)
Durchflusszytometer (Coulter® Epics® XL™)	Beckman Coulter GmbH-Diagnostics (Krefeld)
Einfrierbehälter (Nalgene™ Cryo 1°C Freezing container, „Mr. Frosty“)	Thermo Fisher Scientific (Roskilde, DK)
-20°C Gefrierschrank (Liebherr Premium)	Liebherr Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen)
-80°C Gefrierschrank (V.I.P.™ -86°C ULT, MDF-U52V)	SANYO Electric Biomedical Co., Ltd. (Oizumi-machi, JP)
Gelelektrophoresekammer (Maxigel)	} Biometra biomedizinsiche Analytik GmbH (Goettingen)
Gelglasplatten	
Glaswaren	Labware SCHOTT AG (Mainz)
Inkubationsschüttler (Infors HAT Minitron)	Infors GmbH (Einsbach)
4°C Kühlschranks (Liebherr Premium)	Liebherr Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen)
Mikrozentrifuge (MiniSpin)	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetboy	Integra Biosciences AG (Fernwald)
Präparierbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Real-time PCR-Gerät (ABI PRISM 7700 Sequence Detector)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Reinluftwerkbank (HeraSafe HSP 18)	Heraeus (Hanau)
Röntgenfilmentwickler (Hyperprocessor)	Amersham Life Science (Little Chalfont, UK)
SONOPULS HD 2070 Homogenisator	Bandelin electronic (Berlin)
Spectrophotometer (SmartSpec™ Plus)	Bio-Rad (München)
Stickstofftank (K-Series Cryo Storage Systems)	Taylor-Wharton Germany GmbH (Husum)
Stromquelle (Biorad Power Pac 200)	Bio-Rad (München)
Stromquelle (Standard Power Pack P25 T)	Biometra biomedizinsiche Analytik GmbH (Goettingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco)	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge (Heraeus Megafuge 3.0 RS)	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge (Heraeus Multifuge 3s)	Heraeus (Hanau)
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer cell	Bio-Rad (München)
Vortexer (MS1 Minishaker)	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Zählkammer (Neubauer improved)	LO-Laboroptik (Friedrichsdorf)

### 4.9 Softwareprogramme

FlowJo Version 7

Graph Pad Prism Version 5

Microsoft Excel

Microsoft Word

### 4.10 Puffer und Lösungen

APS (10%):

0,1 g APS in 1 ml aqua dest.

Azid (4%):	4% NaN <sub>3</sub> in aqua dest.
Bromphenolblau (1%):	0,1 g Bromphenolblau in 10 ml aqua dest.
Eiskaltes Ethanol (70%):	70% Ethanol und 30% aqua dest. bei -20°C
Erstantikörper (Western Blot) :	5 ml Milch (5%), 25 µl Azid (4%)(1:200) und Erstantikörper entsprechend Verdünnung
Erythrozytenlysepuffer (10 x):	4,13 g NH <sub>4</sub> Cl, 0,5 g KHCO <sub>3</sub> , 268 µl EDTA (0,1 M) mit aqua dest. auf Endvolumen von 50 ml
FACS-Puffer:	0,1% BSA und 99,9% 1x DPBS
FC-Block :	1 ml FACS-Puffer, 1,5 µl CD 45/LCA/Ly-5 (PE-Cy <sup>TM</sup> 5) und 1,5 µl CD16/CD32/Fcy III/II Receptor (Purified)
Lyse Puffer:	5 ml HEPES (1 M), 3,75 ml NaCl (4 M), 500 µl EDTA (0,2 M) 25 ml EGTA (10 mM), 100 µl Tween-20 mit aqua dest. auf Endvolumen von 100 ml 1 mM PMSF, 10 mM β-Glycerophosphat, 1 mM NaF 100 µM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 1/10 Tablette Complete Mini/ml Lyse Puffer
Milch (5%):	25 g Milchpulver mit PBS-Tween auf Endvolumen von 500 ml
PBS-Tween:	0,1% Tween 20 und 99,9% 1x PBS
PI-Färbelösung:	2,5 mg Propidiumiodid, 5 mg RNase mit DPBS auf Endvolumen von 50 ml
SDS-Ladepuffer (5 x):	3,88 g DTT, 6,25 ml Bromphenolblau (1%), 25 ml Glycerol 5 g SDS, 12,5 ml Tris-Puffer (1 M) mit aqua dest. auf Endvolumen von 50 ml
SDS-Laufpuffer (10 x):	288 g Glycin, 20 g SDS, 60 g Tris mit aqua dest. auf Endvolumen von 2 l
Sammelgelpuffer (4 x):	6,05 g Tris, 0,4 g SDS mit aqua dest. auf Endvolumen von 100 ml, pH 6,8
Transferpuffer:	20% Methanol, 10% SDS-Laufpuffer (10 x), 70% aqua dest.
Trenngelpuffer (4 x):	91 g Tris, 2 g SDS mit aqua dest. auf Endvolumen von 500 ml, pH 8,8
Tris-Puffer (1 M):	12,1 g Tris mit aqua dest. auf Endvolumen von 100 ml, pH 6,8
Zweitantikörper (Western Blot):	20 ml Milch (5%), 2 µl Zweitantikörper (1:10 000)

### 4.11 Western Blot Gele

Die Angaben sind für jeweils 2 Gele.

Sammelgel: 1,82 ml Acryl-/Bisacrylamid, 3,5 ml Sammelgelpuffer (4x)  
8,54 ml aqua dest., 70 µl APS (10%), 14 µl TEMED

Trenngel (10%): 7,5 ml Acryl-/Bisacrylamid, 5,625 ml Trenngelpuffer (4x)  
9,375 ml aqua dest., 75 µl APS (10%), 15µl TEMED

## 4.12 Medien

### 4.12.1 Bakterienmedium

LB-Medium (1L): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,0

### 4.12.2 Einfriermedium

2-fach Einfriermedium: 80% FCS, 20% DMSO

### 4.12.3 Zellkulturmedien

Medium I: DMEM mit 4,5 mg/ml Glucose, 10% FCS (hitzeinaktiviert)

Medium II: DMEM mit 4,5 mg/ml Glucose, 10% FCS (hitzeinaktiviert)  
100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Medium III: RPMI 1640, 10% FCS (hitzeinaktiviert), 1 mM Natrium Pyruvat  
2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Medium IV: RPMI 1640, 10% FCS (hitzeinaktiviert)  
1x Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)  
1 mM Natrium Pyruvat, 2 mM L-Glutamin  
50 µM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Medium V: 1x IMDM, 30% FCS, 0,5% BSA, 2 mM L-Glutamin  
100 µM 2-Mercaptoethanol, 50 U/ml Penicillin  
50 µg/ml Streptomycin

## 4.13 Bakterien

Für die Transformation mit den Plasmiden MSCV-IRES-GFP und MSCV-MYC-IRES-GFP und deren Produktion wurde der kompetente E.coli Stamm DH5α (Genotyp: F-φ80dlacZM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r k- m k+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-) verwendet. Die transformierten Bakterien wurden im LB-Medium bei 37° C in einem Inkubationsschüttler in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums Ampicillin kultiviert.

## 4.14 Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C mit 5 – 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

**NIH 3T3 Zellen.** Die adhärennten NIH 3T3 Zellen wurden aus NIH Swiss Embryo Kulturen mit Hilfe des 3T3-Protokolls von G. J. Todaro und H. Green entwickelt (Todaro and Green 1963). Sie wurden in den Medien I bzw. II kultiviert und bei ca. 70% Konfluenz 1:10 gesplittet.

**P493-6 Zellen.** P493-6 Zellen (Pajic, Spitkovsky et al. 2000) wurden aus der humanen lymphoblastoiden Zelllinie EREB 2-5 (Kempkes, Spitkovsky et al. 1995) hergestellt. Diese Zelllinie wurde mit dem DNA-Konstrukt *pmyc-tet* stabil transfiziert und damit eine konditionelle *c-MYC*-Expression ermöglicht. Das Konstrukt enthält die beiden kodierenden Exons für *c-MYC* unter Kontrolle eines durch Tetrazyklin regulierten Promotors TP-tetO7, und eine Expressionskassette für den Transaktivator tTA, dessen Funktion als Promotoraktivator durch direkte Interaktion mit Tetrazyklin aufgehoben werden kann.

Diese nicht adhärenenten Zellen wurden im Medium III kultiviert und alle 2-3 Tage in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml neu ausplattiert. Zur Unterdrückung der *c-MYC*-Expression wurde dem Medium 0,2 µg/ml Tetrazyklin zugegeben. Die Zellen wurden darin 60 h lang kultiviert. Für die Reaktivierung der *c-MYC*-Expression wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und ohne Tetrazyklin kultiviert.

**Phoenix-Eco Zellen.** Die Phoenix-Eco Zelllinie wird zur Produktion von ecotropem Retrovirus verwendet. Sie basiert auf der Zelllinie 293T, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie, die mit dem Adenovirus E1a transformiert wurde und aus dem Labor von Professor Garry P. Nolan an der Stanford Universität stammt. (Nolan)

Die adhärenenten Zellen wurden in Medium I kultiviert und täglich 1:2 gesplittet. Nach Selektionierung mit 200 µg/ml Hygromycin B und 2 µg/ml Diphtherie Toxin wurden die Zellen bis zur Passage 10 für die Virusproduktion zur Knochenmarksinfektion herangezogen. Für die Virusproduktion zur Infektion von NIH 3T3 Zellen wurden auch Phoenix-Zellen höherer Passagen verwendet.

**Primäre murine Knochenmarkszellen.** Die murinen Knochenmarkszellen wurden beim ersten Transplantationsversuch aus ca. sechs Wochen alten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen gewonnen. Bei den folgenden Versuchen wurden die Knochenmarkszellen aus ca. sechs Wochen alten Geschwistertieren heterozygoter *Nipa*<sup>+/-</sup> Elterntiere mit C57BL/6-Hintergrund gewonnen, deren *Nipa*-Genotyp zuvor entweder als *Nipa*<sup>+/+</sup> oder *Nipa*<sup>-/-</sup> bestimmt worden war. Die Zellen wurden für die Dauer der Infektion drei Tage in Medium V, unter Zugabe der Wachstumsfaktoren mIL-3, mIL-6 und mSCF kultiviert, ehe sie für die entsprechenden Versuche verwendet wurden.

### 4.15 Mäuse

Die Empfängermäuse waren ca. 6 Wochen alte Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6, bezogen von der Firma Charles River.

## 4.16 Vermehrung und Isolierung von DNA-Plasmiden mit Hilfe Transformation kompetenter E. coli Stämme

### Prinzip

Mit Hilfe der Transformation können Plasmide mit bestimmten Genen in Bakterien eingeschleust und von diesen vervielfältigt werden. Die Plasmide enthalten zusätzlich zu dem zu vermehrenden Gen ein Resistenzgen gegen ein Antibiotikum, wodurch die mit dem Plasmid transformierten Bakterien selektioniert werden können und nur die Plasmid-enthaltenden Bakterien sich vermehren können. Die somit vermehrten Plasmide können aus den Bakterien isoliert werden.

### Prozedere

**Transformation kompetenter E. coli Stämme.** Die Empfängerbakterien wurden auf Eis aufgetaut. Sodann wurden zu je 50 µl des Bakterienansatzes 20 ng des zu transformierenden Plasmids hinzugefügt, der Ansatz 20 min auf Eis gelagert, für 30 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und sofort wieder für 2 min auf Eis gebracht. Daraufhin wurde der Ansatz auf einer Bakterienkulturschale die LB-Medium und das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielt, ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Die 24 h später mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommene, unter dem Selektionsdruck gewachsene Kolonie konnte für die weitere Vermehrung und Isolierung des Plasmids verwendet werden.

**Vermehrung und Isolierung der DNA-Plasmide.** Die Vermehrung und Isolierung der Plasmide erfolgte je nach benötigter Menge des Plasmids auf zwei verschiedene Weisen.

Der Gewinnung geringer Plasmidmengen bis zu 20 µg lag das Protokoll der Miniprep zugrunde. Pro Plasmid wurden unter sterilen Bedingungen 3 Rundbodenröhrchen mit jeweils 5 ml flüssiges LB-Medium gefüllt, Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml hinzupipettiert und die entsprechend transformierten Bakterien zugefügt. Der Inhalt der Gefäße wurde 16 h lang bei 37°C in einem bei ca. 240 rpm laufenden Inkubationsschüttler inkubiert, sodann bei 4000 rpm 10 min lang zentrifugiert und die DNA Plasmide aus den Bakterien entsprechend dem Protokoll für das Quiagen® Spin Miniprep Kit unter Benutzung einer Mikrozentrifuge isoliert. Um eine optimale Durchmischung der verschiedenen Puffer zu erreichen, wurde der Indikator LyseBlue zum Puffer P1 hinzugefügt.

Die Schritte 1 - 4 des Protokolls wurden für jeden der 3 Ansätze des gleichen Plasmids einzeln durchgeführt. Die dabei entstandenen Überstände des gleichen Plasmids wurden im Schritt 5 über dieselbe Säule zentrifugiert.

Für Plasmidmengen größer 20 µg wurde die Isolierung der DNA mit Hilfe der Maxiprep durchgeführt. Die Vorbereitungen entsprachen, abgesehen vom größeren Volumen des Ansatzes, denen der Miniprep. 200 ml des flüssigen LB-Mediums wurden in einem sterilen Glaskolben vorbereitet und das Selektionsantibiotikum sowie die Bakterien entsprechend der

Miniprep zugegeben. Nach der Inkubation und der Zentrifugation wurde die DNA aus den Bakterien mit Hilfe des Protokolls für das Quiagen® HiSpeed Plasmid Maxi Kit isoliert. Auch hier wurde dem Puffer P1 der Indikator LyseBlue beigefügt. Sodann wurde mit Schritt 4 des Protokolls der Maxiprep fortgefahren. Bei Schritt 19 des Protokolls wurde davon abweichend nur mit 500 µl TE-Puffer eluiert, um höhere Plasmid-Konzentrationen zu erreichen.

Die Konzentration der DNA im Eluat wurde mit Hilfe eines Spectrophotometers bei 260 nm gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde mit aqua dest. eine 1:50 Verdünnung der DNA-Lösungen hergestellt. Als Blindprobe diente reines aqua dest.. Im Anschluss wurden die DNA-Lösungen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 4.17 Relative real-time RT-PCR

#### Prinzip

Die real-time RT-PCR stellt eine wichtige und höchst sensitive Methode zur Quantifizierung gering konzentrierter Transkripte und kleinster Unterschiede in der Genexpression der Zellen dar. Dazu nutzt sie die Möglichkeit, mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) die aus Zellen isolierte mRNA in cDNA umzuschreiben, um diese sodann mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen und die PCR-Produkte in ihrer Relation zu quantifizieren.

Bei der relativen Quantifizierung wird außer der Expression der Zielgene auch die Expression eines Kontrollgens („House Keeping Gens“) quantifiziert. Zu diesem Kontrollgen werden die Zielgene bei der Analyse in Relation gesetzt. Des Weiteren dient das Kontrollgen der Normalisierung der Proben untereinander. Das bedeutet, dass eventuelle Unterschiede in den Ausgangskonzentrationen der verschiedenen Proben mit Hilfe dieses Gens relativiert werden können. Dazu muss das Kontrollgen in den verschiedenen Zellen in gleicher Menge exprimiert werden. Gleichzeitig darf die Expression des Gens weder durch den Zellzyklus noch durch experimentelle Eingriffe beeinflusst werden. Typische „House Keeping Gene“ sind z.B. Ubiquitin und Gapdh.

Die eigentliche Quantifizierung der PCR Produkte erfolgt mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, z.B. SYBR® Green, der an die doppelsträngigen PCR-Produkte bindet und dadurch ein Fluoreszenz-Signal aussendet. Die Fluoreszenz nimmt in demselben Maß zu wie die PCR-Produkte und wird während jedes Zyklus gemessen und vom Computer erfasst. Eine korrekte Quantifizierung kann nur während der exponentiellen Phase der PCR durchgeführt werden, in der die Reaktionsbedingungen für die PCR optimal sind. Deshalb wird für die quantitative Analyse der Ct-Wert (cycle threshold) herangezogen, der am Anfang der exponentiellen Phase steht. Dieser Wert beschreibt den Zyklus, in dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Mit diesem Wert wird die Analyse der Genexpressionen durchgeführt.

## Prozedere

**Isolierung von RNA.** Ab Entnahme der Zellen aus ihren Kulturflaschen erfolgten alle Schritte auf Eis. Die Zellpellets wurden 2 x mit 4°C kaltem DPBS von Mediumresten gereinigt, abzentrifugiert (1400 rpm, 5 min) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde bei –80°C eingefroren und bis zur Isolierung der RNA gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen® RNeasy Mini Kit. Dabei wurde mit dem 2. Schritt des RNeasy Mini Protokolls für die Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen begonnen. Die Homogenisierung des Lysats wurde mit Qiagen® Qiashredder, wie in Schritt 3a des Protokolls beschrieben, durchgeführt. Nach der Isolierung wurden die RNA-Konzentrationen entsprechend der DNA-Konzentrationsbestimmung (vgl. in „Vermehrung und Isolierung der DNA-Plasmide S.36) gemessen und die RNA entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder bei –80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

**Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkriptase.** Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das Qiagen® Omniscript RT Kit, die Oligo dT Primer und der RNase Inhibitor RNaseOUT verwendet. Das Prozedere erfolgte gemäß dem Protokoll „Reverse Transcription Using Omniscript Reverse Transcriptase“ aus dem Omniscript Reverse Transcription Handbook 05/2004. Pro Ansatz wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt und mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Um die RT zu inaktivieren, wurde der Ansatz zusätzlich für 5 min bei 95°C inkubiert. Die cDNA wurde bis zu ihrem Gebrauch bei –20°C gelagert.

**PCR-Reaktion.** Für die real-time PCR-Reaktion wurde das Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG verwendet. Für Ubiquitin und jedes zu untersuchende Transkript wurden Doppelwerte angelegt. Pro Probe enthielt der Mastermix für ein Transkript:

15,60 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG  
 0,50 µl ROX Reference Dye, 0,05 µl Forward Primer  
 0,05 µl Reverse Primer, 8,00 µl aqua dest.

Pro Well einer MicroAmp™ 96-Well Platte wurden jeweils 24,2 µl des Mastermix und 0,8 µl der zu untersuchenden cDNA pipettiert. Die Platte wurde mit einer speziellen optischen Klebefolie verschlossen und zum Mischen des Ansatzes, das 5 min dauerte, auf einem Schüttler befestigt. Anschließend wurde die Platte abzentrifugiert (1400 rpm, 5 min).

Die real-time PCR wurde in dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector durchgeführt. Es wurden 40 Zyklen gemessen. Die einzelnen Schritte des Programms liefen wie folgt ab:

1 Zyklus:	50°C	2 min
	95°C	10 min
40 Zyklen:	95°C	15 sec
	60°C	1 min

Die Ct-Werte der Kontrollprobe wurden gleich 1 gesetzt und mit den Ct-Werten der übrigen cDNAs verglichen. Zur Standardisierung wurde das „House Keeping“ Gen Ubiquitin verwendet.

## 4.18 Western Blot

### Prinzip

Die Methode des Western Blots dient dem Nachweis bzw. der semiquantitativen Analyse von Proteinen in Zellen. Die Proteine werden zunächst mit Hilfe der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt, aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort fixiert. Es folgt die spezifische Detektion einzelner Proteine mittels zweier Antikörper. Der erste Antikörper bindet direkt an eine spezifische Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins, der zweite Antikörper bindet den ersten Antikörper und ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Die Antikörperbindung an das dazugehörige Protein kann mit Hilfe einer chemiluminiszenten Lösung sichtbar gemacht werden. Diese wird auf Röntgenfilmen festgehalten. Damit können das Vorkommen bestimmter Proteine in den untersuchten Zellen nachgewiesen und semiquantitative Analysen der Proteine einer Zelle durchgeführt werden. Um die Konzentrationen der einzelnen Proteine in den verschiedenen Proben untereinander vergleichen zu können, wird als Ladungskontrolle das Protein  $\beta$ -Actin verwendet.

### Prozedere

**Lyse.** Für die Zelllyse erfolgten ab Entnahme der Zellen aus ihren Kulturflaschen alle Schritte auf Eis. Die Zellpellets wurden 2 x mit 4°C kaltem DPBS von Mediumresten gereinigt, abzentrifugiert (1400 rpm, 5 min), der Überstand entfernt und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die eigentliche Zelllyse wurde das Zellpellet, je nach Größe, in 60 – 100  $\mu$ l, 4°C kaltem Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen mit einem SONOPULS Homogenisator über 5 Zyklen von jeweils 5 sec Dauer bei 40% Power sonifiziert, um das Zelllysate zu homogenisieren. Sodann wurde das Zelllysate für 2 min bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert und der Proteinüberstand abgenommen.

**Proteinbestimmung mit dem Bradford Protein Assay.** Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde der Bradford Protein Assay verwendet und gemäß der Benutzungsanweisung des Herstellers eingesetzt. Der Assay nutzt für die Konzentrationsmessung die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und die daraus resultierende Farbänderung.

**Laufgelherstellung.** Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde zunächst ein 10%-iges Trenngel (Zutaten siehe 3.1.6 Gele) hergestellt. Nach Polymerisation dieses Gels wurde das

Sammelgel (Zutaten siehe 3.1.6 Gele) auf das verfestigte Trenngel gegossen, der Kamm für die Bildung der Sammeltaschen eingespannt und die Polymerisation des Sammelgels abgewartet.

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).** Das Gel wurde in den Glasplatten in die Gelelektrophoresekammer gespannt und der Lauffuffer in die Kammer eingefüllt. Die Proteinproben wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentrationen mit Lysepuffer und 5x SDS-Ladepuffer auf die benötigte Proteinkonzentration verdünnt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben über einen Zeitraum von 5 min bei 95°C denaturiert, sodann in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert und die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

In eine der Taschen wurden 8 µl des Proteinstandards (Dualstandard) pipettiert. Sodann wurde die Gelelektrophoresekammer an eine regulierbare Stromquelle angeschlossen und eine Spannung von 60 V angelegt. Nach Durchlaufen der Proben durch das Sammelgel wurde je nach Laufzeit eine Spannung zwischen 30 und 150 V angelegt.

**Transfer.** Um die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen wurde der Semi-Dry Transfer angewendet. Dazu wurde das Gel vorsichtig von der Glasplatte getrennt, auf die in Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran aufgebracht und mit je 4 Schichten dünnen, ebenfalls in Transferpuffer getränkten Whatman-Papiers oben und unten in die Transferkammer eingespannt. Der Transfer für 50 min bei 20 V durchgeführt. Zum Nachweis des erfolgreichen Transfers, wurde die Membran einmalig mit Ponceau S Lösung gefärbt und mit PBS wieder gereinigt.

**Antikörpervermittelte Detektion der Proteine.** Um unspezifische Bindungen des Erstantikörpers auf der Membran zu vermeiden, wurde diese vorweg 60 min bei Raumtemperatur in 5%-iger Milch und erst danach über 12 h bei 4 °C in dem entsprechenden Erstantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit frischem PBS-Tween gewaschen und über eine Dauer von 50 min bei Raumtemperatur in dem Zweitantikörper inkubiert. Danach erfolgten 3 weitere 10 minütige Wäschen der Membran mit PBS-Tween und eine 30 minütige Wäsche mit reinem PBS. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit 2 ml einer 1:1 Mischung der beiden Komponenten der Entwicklerlösung von Pierce (je nach Protein Pico, Dura oder Femto) behandelt und in einer Klarsichthülle in eine Entwicklungskassette eingelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Film in die Entwicklungskassette eingelegt und je nach Signalstärke unterschiedlich lange mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde der Film im Röntgenbildentwickler entwickelt.

**Strippen der Membran.** Mit Hilfe der Restore Western Blot Stripping Lösung von Pierce kann die Bindung von Erstantikörpern an die Nitrozellulosemembran wieder gelöst werden

und eine erneute antikörpervermittelte Detektion der Proteine erfolgen. Das „Strippen“ der Membran wurde gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt und die Detektion unter 60 minütigem Blocken der Membran in 5%-iger Milch erneut begonnen.

### 4.19 Allgemeine Zellkultur

Die üblichen Methoden der Zellkultur wurden verwendet.

**Kultivierung von Zellen.** Die adhärenenten Zellen wurden zum Splitten mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Dazu wurde altes Medium abgesaugt und 20°C warmes DPBS in die Flasche pipettiert. Das DPBS wurde wieder abgesaugt, 1x-Trypsin auf den Zellrasen pipettiert und die Zellen 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen von der Unterlage lösten, wurde die Trypsinreaktion durch Verdünnung mit Medium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (1400 rpm, 5 min). Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frisches Medium aufgenommen und ein entsprechender Anteil an Zellen in einem neuen Kulturgefäß ausplattiert.

Das Splitten von Suspensionszellen vollzog sich, abgesehen davon, dass hier eine Trypsinierung nicht notwendig war, wie bei den adhärenenten Zellen.

**Zellzahlbestimmung.** Die Zellzahlbestimmung erfolgte in Neugebauer-Zählkammern. 50 µl der gut gemischten Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypan-Blau vermengt und 10 µl der Suspension in die Zählkammer pipettiert. Alle lebenden Zellen nehmen das Trypan-Blau zwar auf, transportieren es aber aktiv wieder aus der Zelle heraus und erscheinen damit weiß, während sich die toten Zellen blau färben. Alle lebenden Zellen in den vier großen Quadraten der Zählkammer wurden mit Hilfe einer Zähluhr gezählt. Die Zellzahl zweier Quadrate entsprach der 10<sup>4</sup>-fachen Anzahl von Zellen in 1 ml der Zellsuspension.

**Viabiles Einfrieren und Auftauen von Zellen.** Zum Einfrieren von Zellen wurde die Isopropanolfüllung eines Einfrierbehälters auf 4°C gebracht. Die Zellen wurden entnommen und nach der Zentrifugation und dem Abnehmen des Überstandes pro Einfriergefäß in 0,8 ml ihres 20°C kalten Kulturmediums resuspendiert. In jedes Einfriergefäß wurde jeweils 0,8 ml dieser Zellsuspension eingebracht und dazu 0,8 ml, 4°C kaltes 2x-Einfriermedium pipettiert. Nach Durchmischen wurden die Einfriergefäße in dem 4°C kalten Einfrierbehälter verpackt und bei -80°C eingefroren. Nach ca. 12 h wurden die Zellen für die dauerhafte Lagerung in einen Stickstofftank verbracht.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, wurden diese durch Auf- und Abpipettieren 0,5 ml 4°C kalten Mediums in dem Einfriergefäß aufgetaut und sofort in 20 ml, 4°C kaltes Medium überführt. Sodann wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (1400 rpm, 5 min) und der Überstand abgenommen. Hierauf wurden die Zellen in frischem, 4 °C kaltem Medium resuspendiert, ausplattiert und bei 37°C und unter Zufuhr von 5 – 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## 4.20 Stabile retrovirale Transfektion muriner Zellen

### Prinzip

Die stabile Transfektion bedeutet, dass das Transgen fest in das Genom der Zielzelle eingebaut wird, dort verbleibt und somit einen dauerhaften, „stabilen“ Effekt auf die Zelle ausübt. Die stabile Transfektion erfolgte mittels retroviraler Transfektion. Das Virus wurde mit Hilfe von der im Handel erhältlichen Phoenix-Eco-Zelllinie aus dem Nolan Lab der Stanford University durchgeführt. Diese Verpackungszelllinie enthält die für die Produktion der Virusproteine notwendigen Gensequenzen env, gag, und pol und exprimiert diese stabil. Den Zellen fehlt jedoch das für den Zusammenbau des Virus essentielle Verpackungssignal  $\psi$ . Dieses ist zusammen mit einer 3'-LTR- und einer 5'-LTR-Region und den zu übertragenden Transgenen in einem retroviralen Vektor, einem Plasmid, vorhanden. Wird die Verpackungszelllinie mit diesem Plasmid transfiziert, so wird der retrovirale Vektor transkribiert und dieses Transkript sowohl in Proteinform translatiert als auch in genomische RNA überführt. Die genomische RNA wird in neu entstehende Viren, deren Zusammenbau nun möglich ist, verpackt. Diese Viren werden in das umgebende Medium abgegeben. Murine Zellen werden in diesem Medium kultiviert und durch das Virus infiziert. Die das Transgen enthaltende genomische Virus-RNA wird mit Hilfe der reversen Transkriptase (pol) in DNA umgeschrieben und die DNA stabil in das Erbgut der Zielzelle integriert. Da der übertragenen genomischen RNA die Gene env, gag und pol fehlen, kann es zu keiner erneuten Virusvermehrung in den Zielzellen kommen. (Nolan)

Damit die das Transgen enthaltenden Zellen von den übrigen Zellen unterschieden und, wenn nötig, selektioniert werden können, enthält das Plasmid eine IRES-GFP-Region. Damit produzieren die transfizierten Zellen den Farbstoff EGFP und können sodann mit Hilfe des FACS-Gerätes von den nichttransfizierten Zellen unterschieden und gegebenenfalls gesortet werden.

### Prozedere der Transfektion muriner Zelllinien

**Virusproduktion.** Für die Virusproduktion wurden die Phoenix-Eco-Zellen mit Hilfe von Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 transfiziert. Dafür wurden die Phoenix-Eco-Zellen aufgetaut und für 3 Tage in Medium I kultiviert, bevor jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen pro 6 cm-Schale in 5 ml Medium I ausplattiert wurden. 16 h nach dem Ausplattieren wurden die Zellen bei einer Dichte von ca. 80 – 90% entweder mit dem Plasmid MSCV-IRES-GFP als Kontrollvektor oder mit dem Plasmid MSCV-MYC-IRES-GFP transfiziert. Dazu wurden pro Plasmid 2 Ansätze vorbereitet:

1. 0,5 ml Optimem + 10  $\mu$ g Plasmid pro zu transfizierende 6 cm-Schale
2. 0,5ml Optimem + 20  $\mu$ l Lipofectamin pro zu transfizierende 6 cm Schale

Die Ansätze 1 und 2 wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, gemischt und nochmals 30 – 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium I von den

ausplattierten Phoenix-Eco-Zellen abpipettiert und durch 4 ml frisches 37°C warmes Medium I pro Schale ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde pro Schale 1 ml des jeweiligen Ansatzes zu den Phoenixzellen hinzupipettiert und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach 8 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit 5 ml frischem, 37°C warmem Medium I. 24 h nach der Transfektion wurde der erste Virusüberstand abgenommen und erneut 5 ml frisches, 37 °C warmes Medium I zugegeben. Danach erfolgten noch zwei weitere Abnahmen von Virusüberständen, nämlich 36 und 48 h nach der Transfektion. Die Virusüberstände wurden gemischt und durch eine 0,45 µm Filtereinheit aus Zelluloseacetat gepresst, um Zellen bzw. Zellreste herauszufiltern. Sodann wurde der Virusüberstand lichtgeschützt bei 4°C 1 bis maximal 2 Wochen aufbewahrt.

**Transduktion.** Für die Transduktion wurden  $1 \times 10^5$  Zellen einer murinen Zelllinie in einer 6 cm-Platte bzw.  $2,5 \times 10^5$  Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Flasche in 5 bzw. 10 ml Medium I ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, 5 bzw. 10 ml des gewonnenen Virusüberstandes auf die Zellen pipettiert und jeweils 8 µg Polybren pro 1 ml Medium I hinzugefügt, um die Ladungsabstoßung zwischen den Viren und der Zelloberfläche zu neutralisieren und somit die Transduktion zu erleichtern. Dieser Vorgang wurde 24 bzw. 48 h nach der ersten Infektion wiederholt. Nach der letzten Transduktion wurden die Zellen für mindestens weitere 24 Stunden inkubiert, bevor die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie überprüft wurde.

### **Prozedere der Transfektion muriner Knochenmarkszellen**

Die retrovirale Transfektion muriner Knochenmarkszellen weicht in Teilen von der Transfektion muriner Zellen ab. Grund dafür ist, dass die Transfektionseffizienz bei primären Knochenmarkszellen geringer ist als bei murinen Zelllinien.

**Virusproduktion.** Für die Virusproduktion wurden die Phoenix-Eco-Zellen in 3 ml Medium I anstatt in 5 ml (vgl. S. 42) kultiviert und in der Folge in 2 ml an Stelle von 4 ml Medium I (vgl. S. 42) mit 1 ml des Transfektionsansatzes transfiziert. Der erste Mediumwechsel erfolgte erst 24 h anstatt 8 h nach der Transfektion. Dem entsprechend verschoben sich die Abnahmen des Virusüberstandes von 24, 36 und 48 h (vgl. S. 42) auf 36, 48 und 60 h nach der Transfektion. Die Virusüberstände wurden nicht gemischt, sondern getrennt filtriert und bei 4°C, lichtgeschützt aufbewahrt. Für jeden Überstand wurde die Virustitration einzeln durchgeführt. Im Übrigen erfolgte die Virusproduktion wie bei der Transfektion muriner Zelllinien.

**Virustitration.** Um die Potenz des Virusüberstandes und damit die Transfektionseffizienz abschätzen zu können wurde der so genannte Virustiter bestimmt, da der Virusüberstand erst ab einem bestimmten Wert für die Transfektion von Knochenmarkszellen geeignet ist.

Pro Virusüberstand wurden in 3 Wells einer 6-Well Platte jeweils  $2,5 \times 10^4$  NIH 3T3-Zellen in je 3 ml Medium I ausplattiert und die Zellen 24 h im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h wurde das alte Medium abgesaugt und durch 2 ml frisches Medium I ersetzt. Pro Virusüberstand wurde in je eines der 3 Wells 100  $\mu$ l, 10 $\mu$ l und 4 $\mu$ l des Virusüberstandes hinzugefügt, so dass die Transfektionseffizienz des Virusüberstands in den Verdünnungen 1:20, 1:200 und 1:500 getestet werden konnte. In alle Wells wurden pro 1 ml Medium 4  $\mu$ g Polybren zugegeben und sodann die Zellen über 48 h inkubiert.

Hernach wurden die Zellen, wie beim Splitten, mittels Trypsin vom Boden gelöst, in FACS-Röhrchen überführt, und ihre Transfektionseffizienz über die EGFP-Fluoreszenz der Zellen im FACS-Gerät untersucht. Über die in den einzelnen Verdünnungen festgestellten prozentualen Anteile an infizierten (EGFP<sup>+</sup>) Zellen wurde gemäß folgender Formel der jeweilige Virustiter berechnet:

$$\frac{\left( \left( \frac{(5 \times 10^4 \times \%)}{100} \right) \times a \right)}{2} = \text{Titer des Virusüberstands}$$

% = Prozentualer Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen

a = Kehrwert der Verdünnung (bei 1:20 = 20 usw.)

Aus den 3 errechneten Titern der verschiedenen Verdünnungen eines Virusüberstandes wurde jeweils der Mittelwert für jeden Virusüberstand gebildet. Ab einem mittleren Virustiter von größer  $2 \times 10^5$  wurde die Transduktion des Knochenmarks durchgeführt.

**Transduktion mittels Spininfection.** Zur Vorbereitung der ersten Spininfection wurde das Knochenmark aufgetaut und sofort in Medium I eingebracht. Die Zellen wurden bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Knochenmarkszellen wurden in 2 ml Medium V aufgenommen, in einer 6 cm-Schale ausplattiert, die Wachstumsfaktoren mIL-3 und mIL-6 in einer Konzentration von 10 ng/ml, mSCF in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben und das Knochenmark im Brutschrank über Nacht inkubiert. 16 h nach dem Auftauen der Zellen erfolgte die erste Spininfection. Das Knochenmark einer Maus wurde jeweils auf 2 Schälchender 12-Well-Platte verteilt. In jedes Schälchen wurden 500  $\mu$ l Medium V und 2 ml des dafür vorgesehenen Virusüberstandes pipettiert, und der jeweilige Ansatz mit den Wachstumsfaktoren und Polybren versetzt, wobei die Konzentrationen von mIL-3 und mIL-6 10 ng/ml, von mSCF 50 ng/ml und von Polybren 4  $\mu$ g/ml betragen. Zur Erhöhung der Infektionseffizienz wurden die in den Schälchen befindlichen Zellansätze bei 32 °C und 2400 rpm 90 min zentrifugiert und danach bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach einer 12-stündigen Inkubationszeit erfolgte die zweite Spininfection. Hierfür wurden aus den Schälchen der 12-Well-Platten jeweils 2 ml des Mediums abgenommen, sodass die am Schalenboden liegenden Zellen mit noch etwa 500  $\mu$ l Medium bedeckt blieben um nicht auszutrocknen. Das abgenommene Medium wurde bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, der

Überstand abgesaugt und die so versehentlich mitabgenommenen Knochenmarkszellen in 500 µl frisches Medium aufgenommen und wieder in das Schälchen zurückgegeben. Zu den jeweils vorhandenen 500 µl Medium wurden 2 ml des entsprechenden Virusüberstandes hinzupipettiert sowie Polybren und die Wachstumsfaktoren mIL-3, mIL-6 und mSCF entsprechend der oben genannten Zielkonzentrationen zugegeben. Hierauf erfolgte wiederum eine 90-minütige Zentrifugation bei 2400 rpm bei einer Temperatur von 32°C und danach eine Inkubation im Brutschrank über 12 h. In entsprechender Weise wurden die dritte und vierte Spininfektion durchgeführt.

### 4.21 Knochenmarkstransplantation der Maus

#### Prinzip

Murine hämatopoetische Vorläuferzellen werden aus dem Knochenmark entsprechender Spendermäuse gewonnen, das gewünschte Plasmid mittels stabiler, retroviraler Transfektion transfiziert und die somit gentechnisch veränderten hämatopoetischen Knochenmarkszellen in letal bestrahlte Empfängermause intravenös injiziert. Die gentechnisch veränderten Knochenmarkszellen siedeln sich an Stelle der eigenen zerstörten Knochenmarkszellen an. Damit kann der Effekt der gentechnisch vorgenommenen Veränderungen im hämatopoetischen System mittels Untersuchungen wie z.B. der Beobachtung klinischer Symptome oder Blutbild- und FACS-Analysen erkannt und verfolgt werden.

#### Prozedere

**Knochenmarksgewinnung.** Zur Gewinnung hämatopoetischer Vorläuferzellen wurden Spendermäuse mit dem Zytostatikum 5-FU behandelt. Dessen hämatotoxischer Effekt regt die Hämatopoese im Knochenmark und damit die vermehrte Bildung von hämatopoetischen Vorläuferzellen an. Dazu wurde den Mäusen 5 Tage vor Knochenmarksentnahme 150 µg/g KG 5-FU mittels einer Tuberkulin-Sicherheitspritze intraperitoneal injiziert.

Am Tag der Knochenmarksentnahme wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und ihnen jeweils Femur und Tibia entnommen. Alle folgenden Schritte wurden mit sterilen Gegenständen an einer Sterilbank durchgeführt. Die Knochen wurden mit einem Skalpell an beiden Enden eröffnet und mit einer Pinzette fixiert. Sodann wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 5 ml Spritze und einer Kanüle der Größe 20 mit 37°C warmen Medium I aus dem Knochen in eine 10 cm Platte gespült. Die Zellsuspension wurde durch einen Zellfilter (Poren 100 µm) gepresst und bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen viabel eingefroren.

**Transplantation.** Die Transfektion der Knochenmarkszellen fand, wie im Kapitel „Prozedere der Transfektion muriner Knochenmarkszellen“ (vgl. S. 42 ff) beschrieben, statt.

Am Tag der Transplantation wurde die Transduktionseffizienz der Zellen mit Hilfe des FACS-Gerätes über den Prozentsatz EGFP<sup>+</sup> Zellen ermittelt, die Anzahl an hämatopoetischen Vorläuferzellen pro  $\mu\text{l}$  Zellsuspension gemessen, und aus diesen beiden Werten die Gesamtzahl transduzierter Zellen (= EGFP<sup>+</sup> Zellen) annäherungsweise errechnet. Für den Transplantationsversuch musste eine ausreichende Menge an Zellen insgesamt sowie an transfizierten Zellen vorhanden sein und die prozentualen Anteile an EGFP<sup>+</sup> Zellen sollten in den Vergleichsgruppen nicht mehr als 10% auseinander liegen.

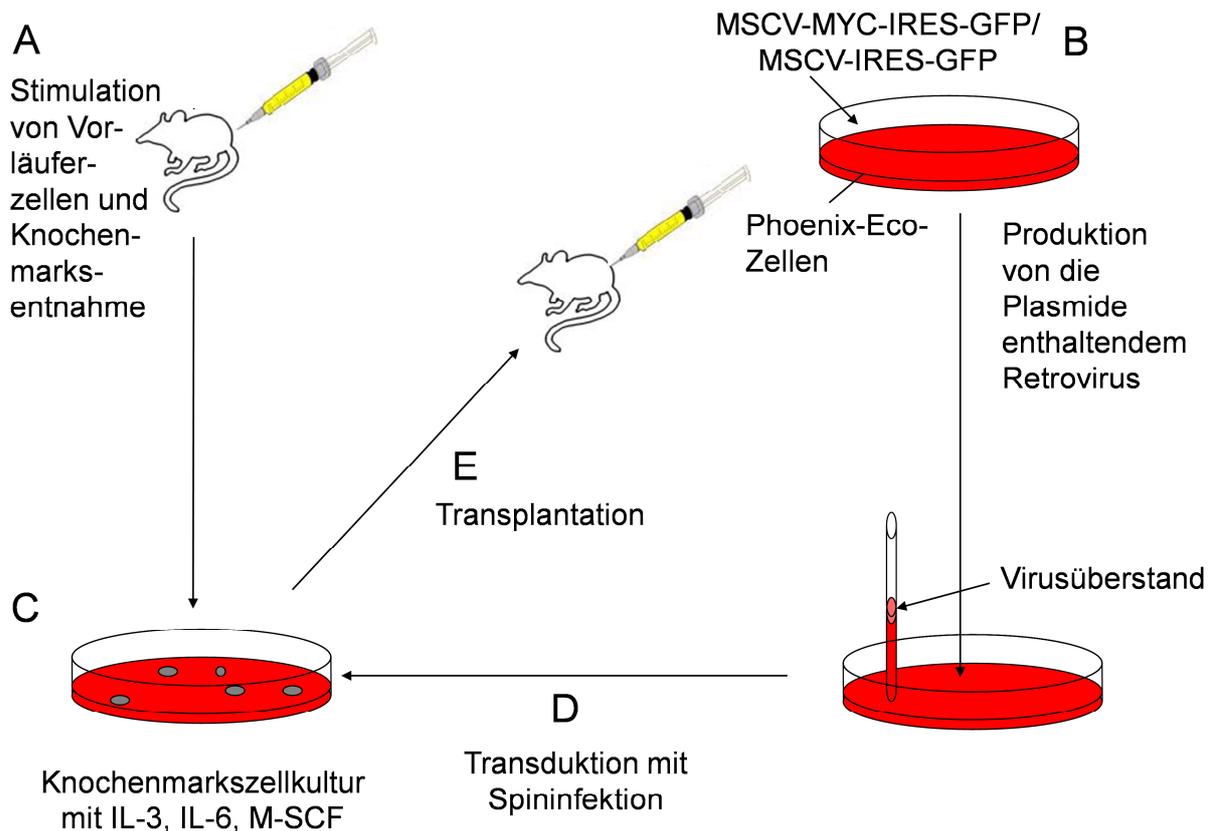


Abb. 3 Der Ablauf der Transplantation:

(A) Stimulation der Vorläuferzellen im Knochenmark der Mäuse mit Hilfe einer Injektion von 5-FU und nach 4 Tagen Gewinnung von Knochenmarkszellen. (B) Produktion eines Retrovirus mit Hilfe von Phoenix-Eco-Zellen, das das Plasmid MSCV-MYC-IRES-GFP bzw. MSCV-IRES-GFP in das Genom der Knochenmarkszellen einbringen kann. (C) Kultivierung der Knochenmarkszellen mit Wachstumsfaktoren für 3 Tage und (D) Transduktion des Plasmids in das zelluläre Genom mit Hilfe des Virus und 4-maliger Spininfektion. (E) Transplantation der transduzierten Knochenmarkszellen in letal vorbestrahlte C57BL/6 Mäuse durch intravenöse Injektion.

Die Zellsuspensionen wurden jeweils so verdünnt, dass die zu transplantierende Zellzahl in 150  $\mu\text{l}$  Hanks-Puffer aufgenommen werden konnte.

Die für die Transplantation bestimmten Mäuse wurden unmittelbar vor der Knochenmarkstransplantation mit einer Bestrahlungsquelle mit einer Dosis von 7 – 8 Gy bestrahlt. Im Anschluss erfolgte die Injektion der zu transplantierenden Zellen mit einer Tuberkulin-Sicherheitsspritze in eine Schwanzvene der Mäuse.

**Verlaufskontrollen der Mäuse nach Transplantation.** Die Mäuse wurden jeden 2. Tag auf Krankheitssymptome untersucht und einmal pro Woche vor der Blutentnahme gewogen. Die Beobachtung der Tiere bezog sich auf die Feststellung allgemeiner Krankheitssymptome wie Lethargie, Kurzatmigkeit, struppiges Fell bzw. Buckligkeit sowie speziell einer Schwäche bzw. Lähmung der Extremitäten.

Ab dem 6. Tag nach der Transplantation wurden wöchentlich Blutbilder mit dem Blutbildanalysegerät bestimmt. Für die FACS-Analysen wurde frühestens ab der 2. Woche zusätzlich Blut abgenommen. Die Blutentnahmen erfolgten unter der Sterilbank. Dabei wurde mit Hilfe einer Tuberkulin-Sicherheitspritze eine seitliche Schwanzvene der Maus punktiert und das heraustropfende Blut in S-Monovetten mit EDTA aufgefangen.

Sobald die Mäuse Symptome für den Ausbruch der Erkrankung zeigten, wurden sie durch Genickbruch getötet. Aus deren Herz wurde mit einer Tuberkulin-Sicherheitspritze Blut abgenommen. Außerdem wurden Milz sowie der Femur und Tibia beider Hinterbeine entnommen. Die Milz wurde gewogen und photographiert. 1/3 der Milz sowie ein Femur wurden für die histologische Untersuchung in 4%-igem Formalin fixiert. Die restliche Milz sowie der 2. Femur und die Tibiae wurden bis zur weiteren Verwendung in Hanks-Puffer aufbewahrt. Die Entnahme des Knochenmarks erfolgte wie bei der Knochenmarksgewinnung vor der Transplantation. Die Milz wurde mit einem Skalpell zerkleinert, in Medium aufgenommen und so lange durch ein Zellsieb mit 100 µm großen Poren gepresst, bis nur noch weißes Bindegewebe im Sieb zurück blieb. Die dabei entstandene Zellsuspension wurde bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, sodann der Überstand abgesaugt, in Medium resuspendiert und die Suspension wiederum durch das Zellsieb gespült. Die danach verbliebene Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Die gewonnenen Knochenmarks- und Milzzellen wurden zum Teil für die FACS-Analyse vorbereitet (siehe 4.23.3) während der andere Teil jeweils entweder viabel eingefroren oder für Western Blot und RT-PCR aufbewahrt wurde. Mit dem peripheren Blut wurden Blutbilder erstellt bzw. FACS-Analysen durchgeführt.

### 4.22 Durchflusszytometrie

#### Prinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, für die häufig auch die Bezeichnung FACS (fluorescence activated cell sorting) verwendet wird, können Zellpopulationen hinsichtlich Größe und Granulierung analysiert werden. Dazu werden die Zellen durch dünne Kapillaren gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Dabei streuen die Zellen den einfallenden Laserstrahl je nach Größe und Granulierung in unterschiedlicher Weise. Die Streuung wird mittels Detektoren nachgewiesen. Mit Hilfe des jeweiligen Streumusters können die Zellen bestimmten Populationen zugeordnet werden. Damit ist es möglich, im Blut z.B. myeloische

von lymphatischen Zellen zu unterscheiden. Gleichzeitig werden zur Zelldifferenzierung mit dem Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben gemessen, die an Antikörper gebunden sind, welche gegen Oberflächenmarker der Zellen gerichtet sind.

Die Messergebnisse wurden manuell „gated“ und mit Hilfe der FlowJo Software Version 7 analysiert. Die Messung erfolgte mit einem FACS-Gerät vom Typ Beckman Coulter EPICS XL.

### 4.22.1 Transfektions- und Infektionskontrolle

#### Prinzip

Zur Überprüfung des Anteils transfizierter Phoenixzellen oder Mauszellen mit den MIG-Vektoren enthält dieses Plasmid das Gen für das grün fluoreszierende Protein Egfp. Dieses kann mit Hilfe des FACS-Gerätes in den transfizierten Zellen detektiert werden.

#### Procedere

Die Zellen wurden mit Hilfe von DPBS vom Schalenboden gelöst und die Zellmasse durch Auf- und Abpipettieren in einzelne Zellen zerlegt. Die Zellen wurden entsprechend mit DPBS verdünnt und sodann mit dem FACS-Gerät unter Verwendung des F1 Laser Kanal (GFP) der prozentuale Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen ermittelt.

### 4.22.2 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung

#### Prinzip

Bei dieser Form der Zellzyklusanalyse lagert sich der Farbstoff Propidiumiodid (PI) zwischen die Basen der DNA bzw. RNA ein. Zur Verhinderung einer Bindung von PI an RNA, enthält die Propidiumiodidfärbelösung eine RNase. Da in den verschiedenen Zellzyklusphasen die DNA-Doppelstränge entweder einfach (G<sub>1</sub>-Phase) vorliegen, sich gerade in der Verdopplung (S-Phase) befinden, bereits doppelt (G<sub>2</sub>/M-Phase) vorhanden sind oder bei apoptotischen Zellen unvollständig (Sub G<sub>0</sub>-Phase) sind, können die jeweiligen Zellzyklusphasen durch die Fluoreszenzaktivität des eingelagerten Farbstoffes voneinander unterschieden werden.

#### Prozedere

Die Zellpellets wurden in 50 µl DPBS resuspendiert, in ein mit 1 ml eiskaltem 70%-igem Ethanol gefülltes FACS-Röhrchen unter ständigem Vortexen pipettiert und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Zellen abzentrifugiert, das Ethanol entfernt, das Zellpellet in 2 ml DPBS gewaschen, nochmals abzentrifugiert und sodann das DPBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 200 – 1000 µl einer PI-Färbelösung gegeben, unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur 30 min inkubiert und sodann im FACS-Gerät analysiert.

### **4.22.3 FACS-Analyse von peripheren Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen**

#### **Prinzip**

Für die Analyse der peripheren Blut-, Knochenmarks- und Milzzellen wurden die Zellpopulationen sowohl an Hand der Größe und der Granulierung als auch mit Hilfe spezifischer, mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE verbundenen, Oberflächenantikörper unterschieden.

#### **Prozedere**

Knochenmarks- und Milzzellen konnten direkt in den Fc-Block aufgenommen werden. Das periphere Blut musste zunächst durch jeweils 4 ml 1x-Erythrozytenlysepuffer von Erythrozyten befreit werden. Sodann wurde es gevortext, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, 4 min bei 1400 rpm zentrifugiert und vom Überstand befreit. Die jeweiligen Zellpellets wurden pro Fluoreszenzantikörper in 200 µl Fc-Block aufgenommen. Von der Suspension wurden für jeden Antikörper jeweils 200 µl in ein Well einer 96-Well Platte mit Rundboden pipettiert. In diese Mischung wurden 3 µl des entsprechenden Antikörpers pipettiert, der zuvor 1:10 mit dem FC-Block verdünnt worden war. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 30 min. Die Proben wurden bei 4°C 3 min bei 1450 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt, danach zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Im Anschluss wurden die Proben in 300 µl FACS-Puffer mit Propidiumiodidzusatz resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und im FACS-Gerät mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe EGFP und PE gemessen.

### **4.23 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Excel. Es wurden Mittelwerte, Median sowie Standardabweichung berechnet. Die Signifikanztestung erfolgte mit Hilfe des Student-T-Tests. Als signifikant wurde ein Unterschied nur bei  $p < 0,05$  akzeptiert. Die Fehlerindikatoren in den Diagrammen zeigen die für den jeweiligen Mittelwert errechnete Standardabweichung.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Überexpression von *c-MYC* induziert *CYCLIN B1*

Die Regulation von Cyclin B1 durch den Transkriptionsfaktor c-Myc lässt sich sowohl auf transkriptioneller Ebene mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR in Form der relativen RNA-Expression als auch mit Hilfe des Westernblots auf der Proteinebene zeigen. (Yin, Grove et al. 2001; Menssen and Hermeking 2002; Mao, Watson et al. 2003)

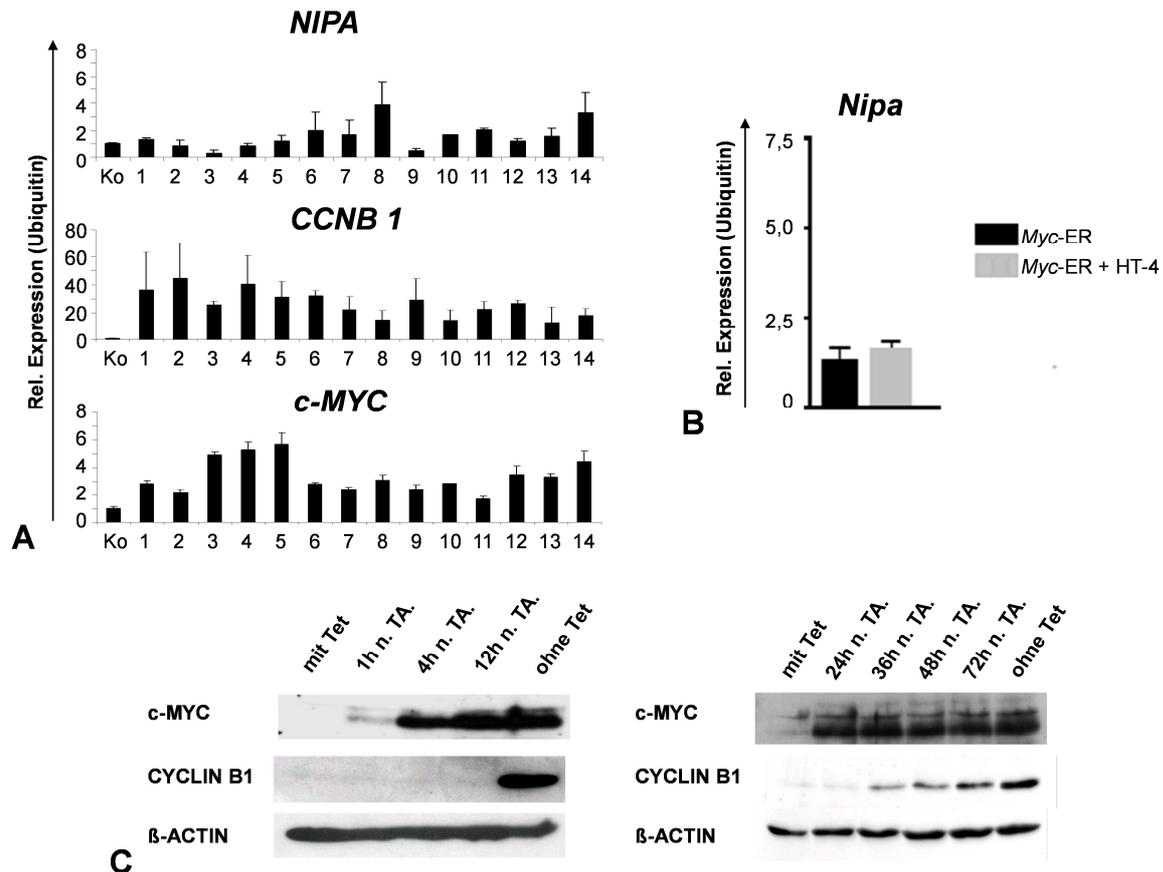


Abb. 4 RT-PCR von humanen Burkitt-Lymphomzellen, Darstellung von MEFs mit *Myc-ER*-System und Westernblot von P493-6-Zellen:

(A) Vergleich der Expressionslevel von *NIPA*, *CYCLIN B1* und *c-MYC* in B-Zellen von 14 humanen Burkitt-Lymphomen (Ziff1 - 14) und in B-Zellen einer gesunden Kontrollperson (Ko) mit semiquantitativer RT-PCR. (B) Vergleich der Expressionslevel von *Nipa* in MEF-Zellen, die mit dem durch HT-4 induzierbaren *Myc-ER*-System ausgestattet wurden, vor und nach Zugabe von HT-4 (Vordaten von PD Dr. Ulrich Keller). (C) Westernblot aus P493-6 Zellen zur Darstellung der Konzentrationen von c-MYC nach Ausschalten der *c-MYC*-Expression durch Kultivierung für 60 h in Gegenwart von 0,2 µg/ml Tetrazyklin (Tet) und Betrachtung verschiedener Zeitpunkte (1h, 4h, 12h...) nach Tet-Auswaschung (n.TA.) und der Konzentration von CYCLIN B1 in Abhängigkeit von der c-MYC Konzentration. Als Ladungskontrolle dienten die Proteinkonzentrationen von β-ACTIN.

Um zu zeigen, dass c-MYC die Expression von *CYCLIN B1* induziert, wurden mit Hilfe der RT-PCR 14 humane Burkitt-Lymphome mit B-Zellen einer gesunden Kontrollperson verglichen (vgl. Abb. 4 (A)). Die relative Expression von *c-MYC* war in jedem der 14 Burkitt-

Lymphome im Vergleich zu den Kontrollzellen um das 1,5- bis 6,5-fache erhöht. Ebenso zeigte die RT-PCR in den Burkitt-Lymphomzellen deutlich höhere relative Expressionslevel von *CYCLIN B1* als in den Kontrollzellen. Die Expressionszunahme lag zwischen dem 13,0- und 44,6-fachen der *CYCLIN B1*-Expression in gesunden B-Zellen. Jedoch korrelierte die Zunahme der *CYCLIN B1*-Expression nicht direkt mit der Zunahme der *c-MYC*-Überexpression.

Auch auf Proteinebene konnte die Induktion von *CYCLIN B1* durch *c-MYC* gezeigt werden. Dazu wurden P493-6-Zellen verwendet, die als Genkonstrukt das *c-MYC*-Gen unter der Kontrolle eines durch Tetrazyklin regulierten Promotors enthalten, der in Anwesenheit von Tetrazyklin die Expression von *c-MYC* supprimiert. Die Zellen wurden nach einer Expansionsphase für 60 h in Gegenwart von 0,2 µg/ml Tetrazyklin in Kultur gehalten. Nach dieser Inkubationsphase konnte im Westernblot in den mit Tetrazyklin behandelten Zellen weder der Transkriptionsfaktor *c-MYC* noch das Protein *CYCLIN B1* nachgewiesen werden (Abb. 4 (C) unter „mit Tet“). Nach dem Herauswaschen von Tetrazyklin aus dem Kulturmedium der Zellen und ihrer Weiterkultivierung in Medium ohne Tetrazyklin zeigte sich im Westernblot, dass *c-MYC* binnen 12 h nach Auswaschung von Tetrazyklin wieder auf Konzentrationen anstieg, die der *c-MYC*-Konzentration in Zellen ohne vorherige Tetrazyklinbehandlung entsprachen. In Folge des Anstiegs von *c-MYC* kam es 24 – 36 h nach dem Herauswaschen von Tetrazyklin auch zu einem Anstieg der Proteinkonzentrationen von *CYCLIN B1*, jedoch deutlich später und langsamer als bei *c-MYC* (Abb 4 (C) unter „ohne Tet 1h nach Auswaschung – 72h nach Auswaschung“). Bei supprimierter *c-MYC*-Expression war kein *CYCLIN B1* in den Zellen nachweisbar (Abb.4 (C)).

Sowohl in der RT-PCR als auch im Westernblot konnte die Bedeutung von *c-MYC* für die Induktion von *CYCLIN B1* und der Effekt einer Überexpression von *c-MYC* auf *CYCLIN B1*-Level gezeigt werden.

## 5.2 *c-MYC* reguliert *NIPA* nicht auf transkriptioneller Ebene

SCF<sup>Nipa</sup> ist ein wichtiger Regulator der nukleären Cyclin B1-Konzentration in der Interphase des Zellzyklus und ist somit maßgeblich an der Cyclin B1 Regulation beteiligt (Bassermann, Peschel et al. 2005). Mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR der 14 humanen Burkitt-Lymphome sollte untersucht werden, ob es Hinweise für eine direkte Beeinflussung von *NIPA* durch *c-MYC* gibt, wie dies bei *CYCLIN B1* der Fall ist.

Die Untersuchung einer möglichen Interaktion von *c-MYC* und *NIPA* auf Proteinebene mittels Westernblot scheiterte trotz mehrfacher Versuche, so dass zur Interaktion keine Aussage möglich ist.

Bei der semiquantitativen RT-PCR der 14 humanen Burkitt-Lymphome ist verglichen mit den B-Zellen der Kontrolle, kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der *c-MYC*-

Überexpression und der relativen Expression von *NIPA* zu erkennen (Abb. 4 (A)). Die *NIPA*-Expressionslevel der Burkitt-Lymphom-Zellen zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen teils geringere RNA-Level als die Kontrollzellen (vgl. Lymphome 3 und 9, Abb. 4 (A)), teils auch deutlich höhere relative Expressionen (vgl. Lymphome 8 und 14, Abb. 4 (A)). Diese Daten lassen eine Regulation von *NIPA* durch *c-MYC* zumindest auf transkriptioneller Ebene unwahrscheinlich erscheinen.

Eine vergleichbare Aussage ließ sich bereits auf Grund von Vordaten von Herrn PD Dr. Ulrich Keller aus semiquantitativen RT-PCR Untersuchungen von wt-MEF-Zellen treffen, die mit MEF-Zellen verglichen wurden, welche gentechnisch mit dem *Myc*-ER-System transduziert worden waren und somit über ein an- bzw. abschaltbares System für die *c-Myc*-Überexpression verfügten (Abb. 4 (B)). Nach Zugabe von HT-4 und dadurch erfolgter Aktivierung der *c-Myc*-Überexpression zeigte sich eine kaum erhöhte relative RNA Expression von *Nipa*, verglichen mit der *Nipa*-Expression in nicht *c-Myc*-überexprimierenden Zellen. Somit bot sich insgesamt kein Anhaltspunkt für eine direkte transkriptionelle Regulation von *Nipa* durch *c-Myc*.

### 5.3 Etablierung des *Myc*-AML-Mausmodells

Das hier verwendete *Myc*-AML-Mausmodell, das von Luo, Li et al. 2005 erstmals veröffentlicht wurde, benutzt die syngene Knochenmarkstransplantation, um *c-Myc* überexprimierendes Knochenmark in gesunde, zuvor letal bestrahlte Mäuse einzubringen, um damit zu zeigen, dass die Überexpression von *c-Myc* innerhalb von ca. 60 Tagen zur Entwicklung einer AML ohne Leukozytose führt, dies unabhängig von Defekten in den Apoptosewegen, insbesondere des *Arf-Mdm2-p53*-Signalweges, oder von chromosomalen Defekten (Luo, Li et al. 2005).

#### 5.3.1 Infektion von C57BL/6-Knochenmarkszellen mit dem MSCV-MYC-IRES-GFP-Vektor

Das für die Infektion verwendete Knochenmark wurde aus etwa 6 Wochen alten, männlichen C57BL/6-Mäusen gewonnen und über einen mit Hilfe von Phoenix-Eco-Zellen hergestellten Retrovirus entweder mit dem MSCV-IRES-GFP Leervektor oder dem MSCV-MYC-IRES-GFP Vektor infiziert. Um eine genügend hohe Infektionseffizienz sicherzustellen, wurde das Virus zum einen durch Virustitrierung auf seine Potenz hin getestet, zum anderen wurde die Transduktion mit Hilfe viermaliger Spininfektion durchgeführt. Die Infektionseffizienz der Knochenmarkszellen lag 12 h nach der letzten Spininfektion und damit unmittelbar vor der Transplantation bei den Zellen mit dem Leervektor bei 48,8% und bei denen mit dem *c-Myc*-Vektor bei 52,0%. Da die in den beiden Zellgruppen festgestellten jeweiligen prozentualen Anteile der Zellen, die das entsprechende Plasmid in ihr Genom aufgenommen hatten, nur wenig differierten, war eine diesbezüglich noch weitere Angleichung nicht notwendig.

### 5.3.2 Syngene Knochenmarkstransplantation und Rekonstitution des Knochenmarks

Das infizierte Knochenmark wurde zuvor letal bestrahlten C57BL/6-Mäusen durch Injektion in eine Schwanzvene transplantiert. Dabei erhielten 6 Mäuse das *c-Myc*-überexprimierende Knochenmark (MIG *c-Myc* Gruppe), während 3 Mäuse mit dem Kontrollknochenmark (MIG Gruppe) transplantiert wurden.

Die 6 Mäuse der MIG *c-Myc* Gruppe wurden zum Zweck der Transplantation einer jeweils unterschiedlich hohen Anzahl von Zellen nochmals in 3 Untergruppen aufgeteilt: Je 2 Mäusen wurde Knochenmark mit jeweils 100.000, 200.000 bzw. 400.000 EGFP<sup>+</sup> Zellen injiziert. Die Mäuse der MIG Gruppe wurden ebenfalls wegen der Injektion einer jeweils unterschiedlich hohen Anzahl von Zellen unterteilt: einer Maus wurden 100.000, den beiden anderen Mäusen jeweils 400.000 EGFP<sup>+</sup> Zellen transplantiert.

Alle Mäuse überlebten die Transplantation. 6 Tage nach Transplantation konnte bei allen Mäusen im Blutbild der nach einer Bestrahlung erwartete Leukozytenabfall gemessen werden. 12 bzw. 20 Tage nach Transplantation zeigten die Mäuse beider Gruppen eine Erholung ihrer Leukozytenwerte, was zugleich das erfolgreiche Anwachsen und somit die Rekonstitution des transplantierten Knochenmarks bedeutete (Abb. 5 (A)).

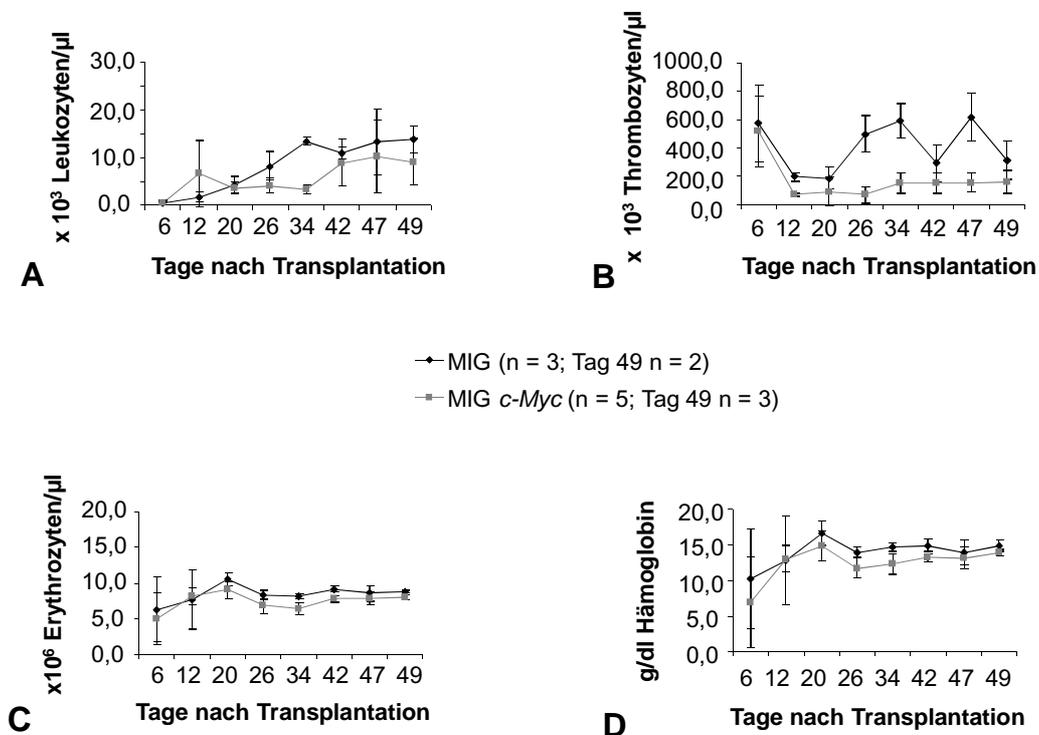
### 5.3.3 *c-Myc*-Überexpression induziert keine Leukozytose

Um das periphere Blut auf mögliche Veränderungen während der Krankheitsentstehung zu kontrollieren, wurden alle 6 – 8 Tage, beginnend ab Tag 6 nach Transplantation Blutentnahmen aus den Schwanzvenen der Mäuse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Tiere der MIG *c-Myc* Gruppe, wie schon in der Arbeit von Luo, Li et al. 2005 beschrieben, keine Leukozytose im peripheren Blut entwickelten (Luo, Li et al. 2005). Die Leukozytenzahlen der Mäuse der MIG *c-Myc* Gruppe lagen, verglichen mit den Leukozytenzahlen der Kontrolltiere, sogar etwas niedriger (Abb. 5 (A)).

Die bei den beiden Mausgruppen gemessenen Erythrozytenzahlen und Hämoglobinwerte zeigten keine großen Unterschiede und lagen jeweils im Referenzbereich. Beide Werte blieben vor und während der Erkrankung bis zum Tod der Mäuse stabil und gaben keinen Hinweis auf die sich entwickelnde Krankheit (Abb. 5 (C) und (D)).

Die Anzahl der Thrombozyten fiel eine Woche nach Transplantation bei den Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe ebenso wie bei der Kontrollgruppe stark ab, stieg jedoch danach im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht mehr so deutlich an (Abb. 5 (B)). So war die Anzahl der Thrombozyten in der MIG *c-Myc* Gruppe von Tag 26 bis Tag 49 nach Transplantation mit einem Mittelwert von  $135.600 \pm 73.200/\mu\text{l}$  (Median  $143.000/\mu\text{l}$ ) niedriger und zeigte sich deutlich konstanter als die der MIG Gruppe in diesem Zeitraum mit einem Mittelwert von  $473.300 \pm 183.100/\mu\text{l}$  (Median  $385.000/\mu\text{l}$ ) (Abb. 5 (B)). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) bei der Anzahl der Thrombozyten zwischen den beiden Gruppen ergaben sich bezüglich der

Blutuntersuchungen an den Tagen 12, 26, 34 und 47 (Abb. 5 (B)). Auch im Vergleich aller untersuchten Thrombozytenwerte von Tag 26 bis Tag 49 nach der Transplantation zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen der MIG *c-Myc* Gruppe und der MIG Gruppe (Abb. 5 (B)).

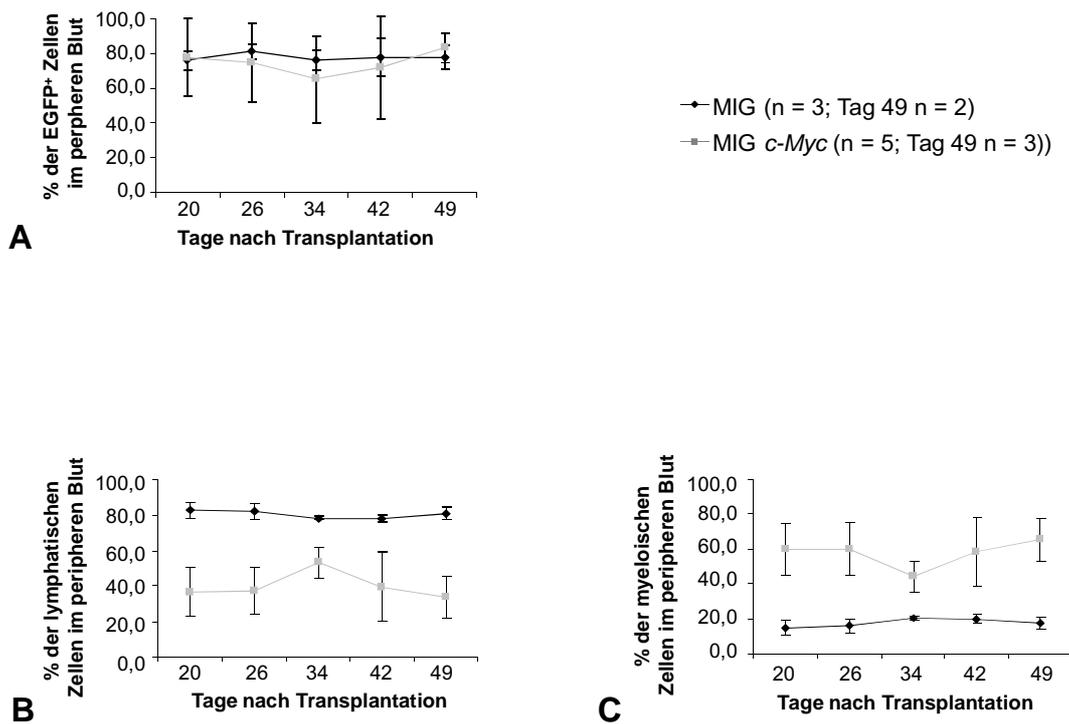


**Abb. 5** Vergleich der Mittelwerte der (A) Leukozytenzahl, (B) Thrombozytenzahl, (C) Erythrozytenzahl und (D) der Konzentration von Hämoglobin bei den Mäusen der MIG und MIG *c-Myc* Gruppe der ersten Transplantation, gewonnen aus Blutbildkontrollen ab Tag 6 nach der Transplantation.

Aus den Blutbildkontrollen bleibt festzuhalten, dass sich bei der MIG *c-Myc* Gruppe, wie auf Grund der Vordaten von Luo, Li et al. 2005 zu erwarten war, keine periphere Leukozytose zeigte. Auffallend war jedoch die bei dieser Gruppe im Vergleich zur MIG Gruppe im Mittel konstant deutlich niedrigere Anzahl der Thrombozyten, insbesondere nach Tag 20 nach Transplantation.

### 5.3.4 *c-Myc*-Überexpression erhöht die Anteile myeloischer Zellen im peripheren Blut

Das periphere Blut der Mäuse wurde ab dem 20. Tag nach Transplantation zusätzlich zur Blutbildkontrolle zeitgleich mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden der Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen sowie die Anteile der lymphatischen und myeloischen Populationen bestimmt (Abb. 6).



**Abb. 6 FACS-Analyse des peripheren Blutes der Mäuse der MIG und der MIG *c-Myc* Gruppe zur Feststellung der Prozentanteile (A) EGFP<sup>+</sup> Zellen, (B) lymphatischer Zellen und (C) myeloischer Zellen bei beiden Gruppen ab Tag 20 nach Transplantation.**

Der 20 Tage nach Transplantation erstmals festgestellte Mittelwert EGFP<sup>+</sup> Zellen war mit  $77,5 \pm 22,3\%$  (Median 86,6%) bei der MIG *c-Myc* Gruppe und  $76,0 \pm 5,3\%$  (Median 76,1%) bei der MIG Gruppe bei beiden Gruppen nahezu gleich (Abb. 6 (A)). Die Messergebnisse blieben bei den weiteren Untersuchungen während des gesamten Beobachtungszeitraums, 20 – 49 Tage nach Transplantation mit Werten zwischen  $72,2 \pm 29,5\%$  und  $83,3 \pm 8,2\%$  in der MIG *c-Myc* Gruppe bzw. zwischen  $76,4 \pm 5,6\%$  und  $81,1 \pm 4,2\%$  in der MIG Gruppe relativ konstant (Abb. 6 (A)). Ursache der hohen Standardabweichung bei der MIG *c-Myc* Gruppe waren konstant niedrigere Werte bei einer zu dieser Gruppe zählenden Maus. Die aus allen EGFP-Messungen beider Gruppen während des Beobachtungszeitraumes nach Transplantation gewonnenen beiden Medianwerte unterschieden sich mit 81,3% bei der MIG *c-Myc* Gruppe und 76,6% bei der MIG Gruppe kaum voneinander.

Signifikante Abweichungen zwischen den beiden Gruppen wurden bei der Untersuchung der Anteile lymphatischer (Abb. 6 (B)) und myeloischer Zellen (Abb. 6 (C)) sichtbar. So lagen im beobachteten Zeitraum in der MIG *c-Myc* Gruppe sowohl der Median aller Messungen von Lymphozytenanteilen mit 39,2%, als auch die Mittelwerte der Lymphozytenanteile zu den einzelnen Messzeitpunkten mit Prozentzahlen zwischen  $33,8 \pm 12,1\%$  und  $53,2 \pm 8,9\%$  signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) als die entsprechenden Werte bei der MIG Gruppe, welche

beim Median einen Wert von 79,1% und bei den Prozentzahlen zu den einzelnen Messzeitpunkten Werte zwischen  $78,3 \pm 2,4\%$  und  $82,7 \pm 4,7\%$  ergaben (Abb. 6 (B)).

Gerade umgekehrt verhielt es sich hinsichtlich des festgestellten Anteils myeloischer Zellen bei der MIG *c-Myc* Gruppe bzw. der MIG Gruppe. Hier war bei der MIG *c-Myc* Gruppe der Median aller Werte im Beobachtungszeitraum mit 59,4% signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als bei der MIG Gruppe mit einem Wert von 19,1%. Die Mittelwerte der myeloischen Zellanteile betrug zu den einzelnen Messzeitpunkten bei der MIG *c-Myc* Gruppe zwischen  $44,2 \pm 8,8\%$  und  $65,2 \pm 12,3\%$ , bei der MIG Gruppe zwischen  $14,6 \pm 4,3\%$  und  $20,4 \pm 1,1\%$ . Dabei waren die Anteile myeloischer Zellen in beiden Gruppen im Untersuchungszeitraum jeweils relativ konstant, wie die jeweiligen Mittelwerte an den einzelnen Untersuchungstagen zeigen (Abb. 6 (C)).

Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen typische Oberflächenmarker wurden die Anteile EGFP<sup>+</sup> B- und T-Lymphozyten sowie die Anteile EGFP<sup>+</sup> Granulozyten eruiert (Abb. 7).

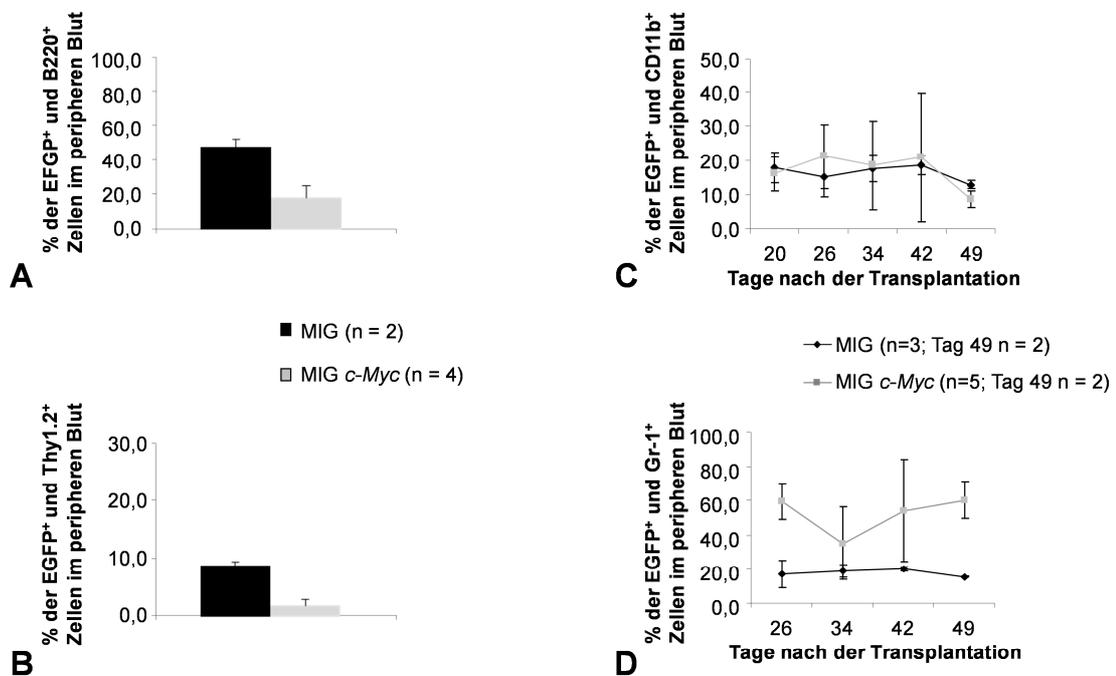
Die Detektion der B-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe von Antikörpern gegen den Oberflächenmarker B220. Dabei fanden sich in der MIG *c-Myc* Gruppe  $16,5 \pm 6,2\%$  (Median 17,5%) EGFP<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> B-Lymphozyten, in der MIG Gruppe  $43,6 \pm 4,1\%$  (Median 43,6%) (Abb. 7 (A)). Für den Nachweis der T-Lymphozyten wurden Antikörper gegen den Oberflächenmarker Thy1.2 verwendet. An EGFP<sup>+</sup> und Thy1.2<sup>+</sup> Zellen ergaben sich in der MIG *c-Myc* Gruppe  $1,68 \pm 1,0\%$  und in der MIG Gruppe  $8,7 \pm 0,7\%$  (Abb. 7 (B)). Mithin fanden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in der MIG *c-Myc* Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) geringere Prozentanteile an B- und T-Lymphozyten.

Zur Feststellung von EGFP<sup>+</sup> Granulozyten wurden die Erkenntnisse aus den Untersuchungen von Luo, Li et al. 2005 genutzt, wonach die AML-Zellen als CD11b<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> beschrieben worden waren. Deshalb wurde das periphere Blut der beiden Mäuse-Gruppen im Untersuchungszeitraum mit CD11b und GR-1 analysiert (Abb. 7 (C) u. (D)).

Bei der Analyse mit CD11b zeigten sich in Bezug auf die Anzahl der Anteile EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut der beiden Mäuse-Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die im Beobachtungszeitraum gewonnenen Mittelwerte der EGFP<sup>+</sup> bzw. CD11b<sup>+</sup> Zellanteile lagen bei der MIG *c-Myc* Gruppe zwischen  $8,6 \pm 2,3\%$  und  $21,1 \pm 9,5\%$  und bei der MIG Gruppe zwischen  $12,8 \pm 1,1\%$  und  $18,5 \pm 2,8\%$  (Abb. 7 (C)). Die Medianwerte waren trotz einer größeren Streubreite bei den Einzelmessungen bei der MIG *c-Myc* Gruppe (1,3% bis 44,1% im Vergleich zu 9,1% bis 23,0% in der MIG Gruppe) mit 14,9% bei der MIG *c-Myc* Gruppe und 15,7% bei der MIG Gruppe annähernd gleich.

Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen fanden sich bei den Analysen des peripheren Blutes der Mäuse mit dem GR-1-Antikörper. Während an den 4 Untersuchungstagen bei der MIG *c-Myc* Gruppe die Mittelwerte der Anteile EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen zwischen  $35,2 \pm 21,3\%$  und  $60,3 \pm 10,8\%$  lagen, betrug sie bei der MIG Gruppe zwischen  $15,5 \pm 0,3\%$  und  $20,2 \pm 1,4\%$  (Abb. 7 (D)). Ursache der hohen

Standardabweichung innerhalb der MIG *c-Myc* Gruppe waren die konstant niedrigen Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen bei einer Maus mit Werten von 0,6 bis 4,0%. Die Streubreite bei den Einzelmessungen der Anteile EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen bei der MIG *c-Myc* Gruppe ohne die zuvor angesprochene „Ausreißer-Maus“ lag zwischen 35,4 und 72,7%, bei der MIG Gruppe zwischen 11,6 und 22,6%. Dieser gravierende Unterschied zeigt sich auch bei den Medianwerten mit 55,5% bei der MIG *c-Myc* Gruppe und 19,5% bei der MIG Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben sich allerdings nicht an allen 4 Untersuchungstagen. Die nicht signifikanten Unterschiede an Tag 34 und 42 ( $p > 0,05$ ) waren auf die vergleichsweise niedrigen Prozentzahlen besagter „Ausreißer-Maus“ zurückzuführen. Der Vergleich aller, an den 4 Untersuchungstagen gemessenen Werte offenbarte bei der MIG *c-Myc* Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Prozentsätze EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen als bei der MIG Gruppe.



**Abb. 7** FACS-Analyse des peripheren Blutes der Mäuse der MIG und der MIG *c-Myc* Gruppe zur Feststellung der verschiedenen EGFP<sup>+</sup> Leukozytenanteile mit Hilfe spezieller Oberflächenantikörper: (A) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> B-Lymphozyten mit B220 an Tag 26 nach Transplantation (im folgenden abgekürzt n.T.), (B) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit Thy1.2<sup>+</sup> an Tag 26 n. T., (C) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> myeloischer Zellen mit CD11b ab Tag 20 n.T., (D) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> myeloischer Zellen mit GR-1 ab Tag 26 n.T. jeweils bei beiden Gruppen.

Somit zeigte die FACS-Analyse des peripheren Blutes bei den Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe eine deutliche Verschiebung von der lymphatischen zur myeloischen Zellpopulation mit einem im Vergleich deutlich höheren Anteil an EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen.

### 5.3.5 *c-Myc*-Überexpression induziert eine akute myeloische Leukämie

Die bei den beiden Mausgruppen im peripheren Blut festgestellten Unterschiede deuteten auf die Entstehung einer myeloischen Erkrankung der Mäuse der MIG *c-Myc* Gruppe hin, wie sie bei Luo, Li et al. 2005 beschrieben worden war.

Während die 3 Mäuse der MIG Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum keinerlei Krankheitszeichen aufwiesen, wurde die erste Maus der MIG *c-Myc* Gruppe bereits sehr früh diesbezüglich auffällig, nämlich am Tag 27 nach Transplantation. Die übrigen 5 Mäuse dieser Gruppe entwickelten Krankheitssymptome zwischen Tag 49 und 51 nach Transplantation (Abb. 8 (A)). Damit betrug die mediane Latenzzeit 50 Tage (Abb. 8 (A)). Die Krankheitszeichen waren plötzliches Auftreten von Lethargie, Kurzatmigkeit und Paresen einer oder mehrerer Extremitäten, insbesondere der hinteren Extremitäten. Die Anzahl transplanteder EGFP<sup>+</sup> bzw. *c-Myc*-überexprimierender Knochenmarkszellen zeigte keine Auswirkung auf die Dauer bis zum Auftreten der ersten Symptome.

Die erkrankten Mäuse wiesen bei der Sektion ausnahmslos eine stark vergrößerte Milz auf (Abb. 8 (B) u. (D)), während die Lymphknoten und der Thymus unauffällig waren.

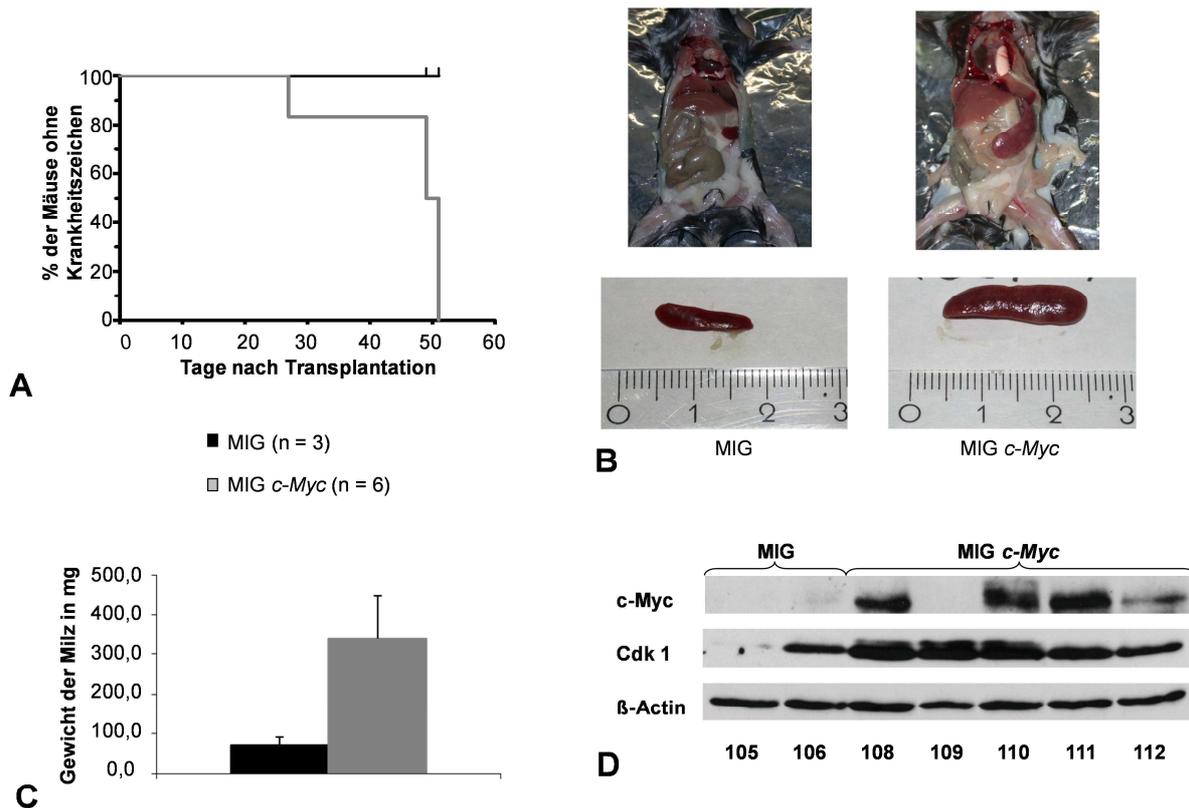
Die Mäuse der MIG Gruppe hatten eine normal große Milz, dementsprechend bestanden signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen dem Milzgewicht der beiden Gruppen. Eine Milz in den Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe wog im Mittel  $339 \pm 108,5$  mg (Median 312,5 mg), in der MIG Gruppe  $71 \pm 20,1$  mg (Median 73 mg) (Abb. 8 (C)).

Das aus dem Knochenmark und der Milz gewonnene Zellmaterial wurde wie das periphere Blut mittels der FACS-Analyse untersucht. Zunächst wurden die Anteile EGFP<sup>+</sup> Zellen sowie die Anteile lymphatischer und myeloischer Populationen bestimmt (Abb. 9).

Das zu untersuchende Knochenmark stammte von 3 Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe sowie von einer Maus der MIG Gruppe, das zu analysierende Milzgewebe von 5 Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe und 3 MIG Mäusen.

Was das Knochenmark betrifft, lag der festgestellte Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen bei den 3 Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe mit einem Mittelwert von  $94,8 \pm 5,5\%$  (Median 96,6%) deutlich höher als bei der Maus der MIG Gruppe mit nur 61,6% (Abb. 9 (A)). Der Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen in der Milz belief sich bei der MIG *c-Myc* Gruppe auf  $83,4 \pm 11,0\%$  und bei der MIG Gruppe auf  $72,9 \pm 13,8\%$ . Die Medianwerte zeigten mit 89,0% bei der MIG *c-Myc* Gruppe und 78,3% bei der MIG Gruppe keine signifikanten Unterschiede (Abb. 9 (B)).

Während bei den 3 MIG *c-Myc* Mäusen der Anteil lymphatischer Zellen im Knochenmark im Mittel nur  $5,9 \pm 3,3\%$  betrug, lag er bei der MIG Maus bei 39,6% (Abb. 9 (A)). Der Anteil myeloischer Zellen im Knochenmark bezifferte sich dagegen bei den 3 MIG *c-Myc* Mäusen auf  $92,5 \pm 3,6\%$ , bei der MIG Maus auf 57,5% (Abb. 9 (A)). Wegen der geringen Anzahl untersuchter Knochenmarksproben war eine Signifikanztestung hier nicht möglich.



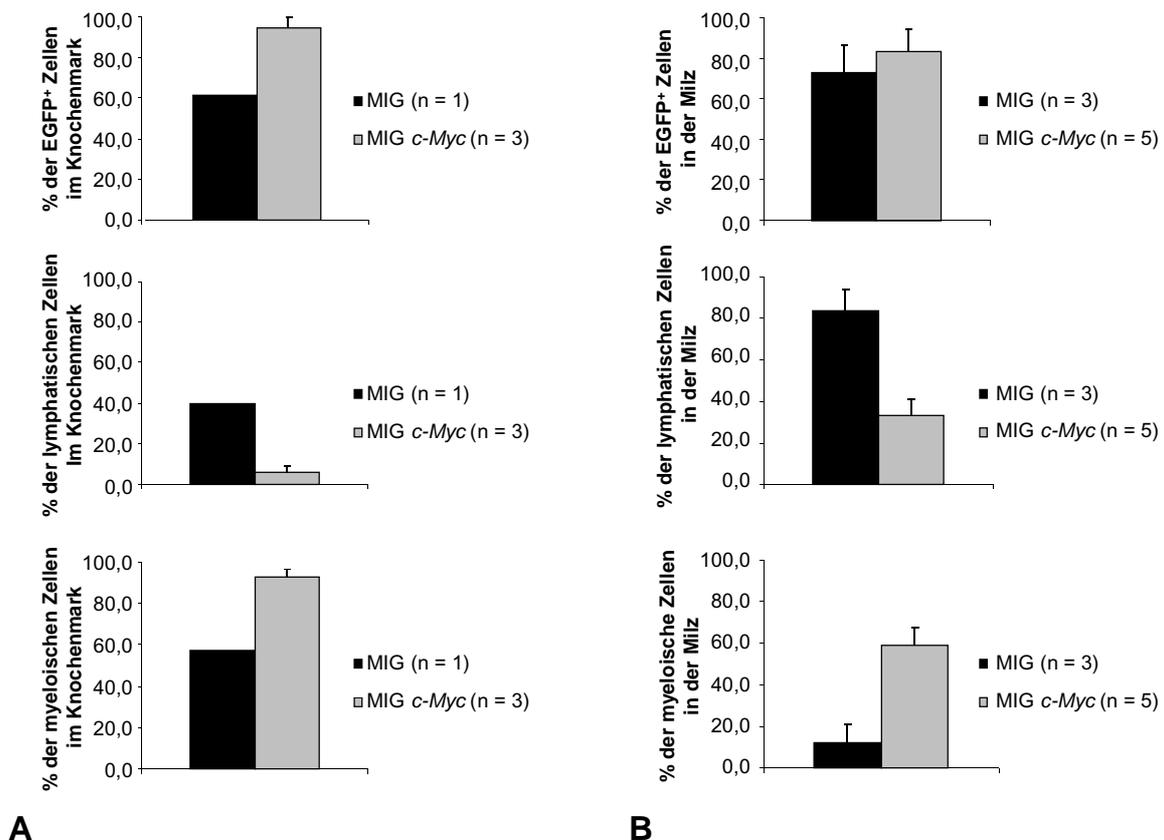
**Abb. 8** Vergleich der Erkrankungskurven, des Milzgewichtes und des Westernblots aus Milzgewebe der Mäuse der MIG und MIG *c-Myc* Gruppe: (A) Erkrankungskurven. (B) Je eine Milz der beiden Gruppen in situ und nach Entnahme. (C) Milzgewicht. (D) Westernblots von c-Myc, Cdk1 mit  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle.

Ähnlich deutlich zeigten sich bei den beiden Maus-Gruppen die Unterschiede in Bezug auf die lymphatischen bzw. myeloischen Zellanteile der jeweiligen Milzgewebe. Bei der MIG *c-Myc* Gruppe waren im Mittel  $33,4 \pm 7,5\%$  (Medianwert 32,7%) der Zellen lymphatischen Ursprungs gegenüber  $84,0 \pm 10,0\%$  (Medianwert 89,7%) bei der MIG Gruppe (Abb. 9 (B)). An myeloischen Zellen wiesen die Milzgewebe der Mäuse der MIG *c-Myc* Gruppe  $58,9 \pm 8,6\%$  (Medianwert 59,4%), die Mäuse der MIG Gruppe  $12,3 \pm 8,8\%$  (Medianwert 7,3%) auf (Abb. 9 (B)). Somit fanden sich im Milzgewebe der Mäuse der MIG *c-Myc* Gruppe signifikant weniger lymphatische Zellen ( $p < 0,05$ ) und signifikant mehr myeloische Zellen ( $p < 0,05$ ) als im Milzgewebe der Kontrollmäuse.

Mithin konnte bei den Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe auch im Knochenmark und in der Milz die bereits im peripheren Blut festgestellte Populationsverschiebung von den lymphatischen zu den myeloischen Zellen beobachtet werden.

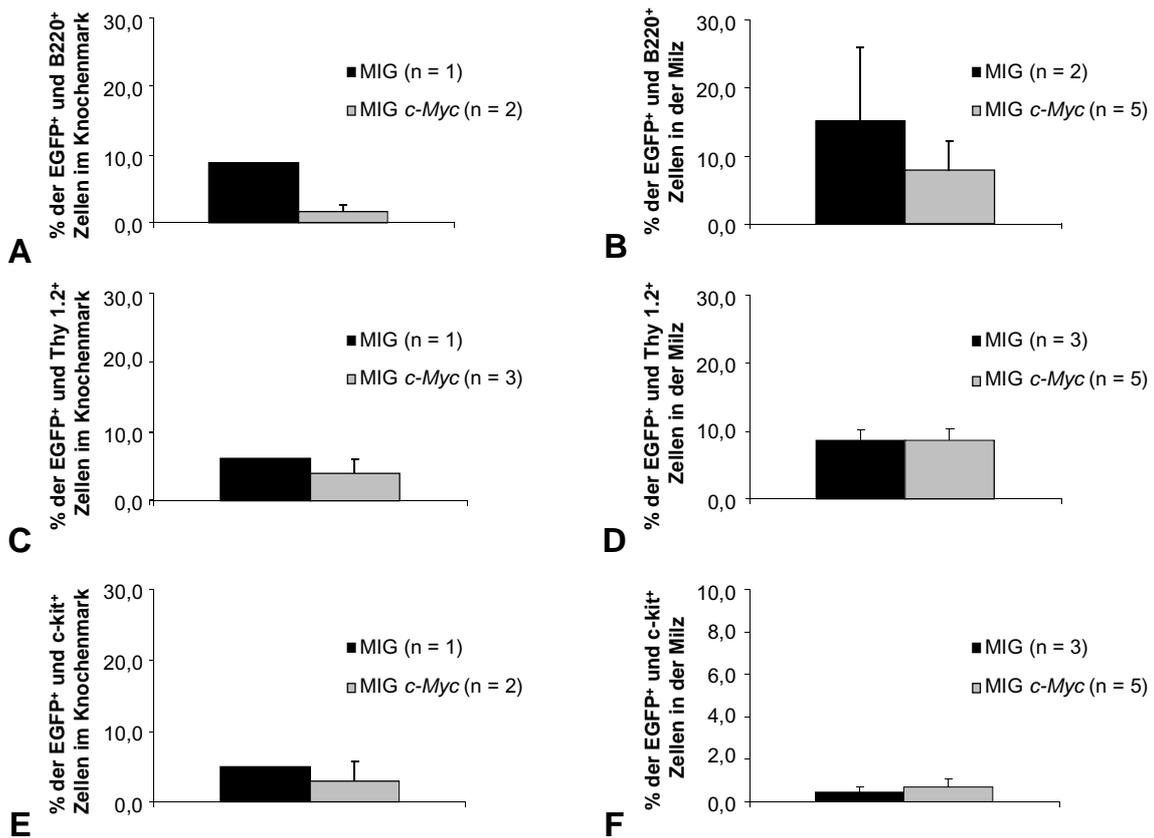
Wie bei der Untersuchung des peripheren Blutes erfolgte die weitere Differenzierung der Lymphozyten im Knochenmark und in der Milz mit Hilfe der Antikörper gegen die Oberflächenmarker B220 zur Feststellung von B-Lymphozyten und mit Thy1.2 zum Nachweis von T-Lymphozyten. Dabei betrug der Anteil  $EGFP^+$  B-Lymphozyten im

Knochenmark der MIG *c-Myc* Mäuse  $1,6 \pm 1,0\%$ , der der Kontrollmaus  $8,8\%$  (Abb. 10 (A)). Im Milzgewebe der MIG *c-Myc* Mäuse fanden sich als Mittelwert  $8,0 \pm 4,2\%$  EGFP<sup>+</sup> B-Zellen mit einem Median von  $5,0\%$ , während bei den beiden Kontrollmäusen im Mittel  $15,1 \pm 10,8\%$  (Median  $15,1\%$ ) B-Lymphozyten festgestellt wurden (Abb. 10 (B)). Was die T-Lymphozytenanteile angeht, so befanden sich im Knochenmark der MIG *c-Myc* Gruppe  $3,9 \pm 2,0\%$  EGFP<sup>+</sup> und Thy1.2<sup>+</sup> Zellen gegenüber  $6,2\%$  bei der MIG Maus (Abb. 10 (C)). Im Milzgewebe wiesen die Anteile EGFP<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei der MIG *c-Myc* Gruppe  $8,7 \pm 1,6\%$ , bei der MIG Gruppe  $8,6 \pm 1,6\%$  auf (Abb. 10 (D)). Die Medianwerte lagen mit  $8,9\%$  (MIG *c-Myc* Gruppe) und  $8,1\%$  (MIG Gruppe) ebenfalls nur geringfügig auseinander.



**Abb. 9 FACS-Analyse des Knochenmarks und des Milzgewebes der Mäuse der MIG und der MIG *c-Myc* Gruppe: Prozentanteile jeweils an EGFP<sup>+</sup>, lymphatischen und myeloischen Zellen (A) im Knochenmark, (B) in der Milz.**

Mit Hilfe des Antikörpers gegen den Oberflächenmarker *c-kit* wurden die Knochenmarks- und Milzzellen auf das Vorkommen früher myeloischer Vorläuferzellen analysiert. Dabei fanden sich im Knochenmark der beiden MIG *c-Myc* Mäuse  $3,0\% \pm 2,7\%$  EGFP<sup>+</sup> und *c-kit*<sup>+</sup> Zellen gegenüber  $4,9\%$  bei den Knochenmarkszellen der MIG Maus (Abb. 10 (E)). Im Milzgewebe waren bei der MIG *c-Myc* Gruppe  $0,7 \pm 0,3\%$  der Zellen EGFP<sup>+</sup> und *c-kit*<sup>+</sup>, bei der MIG Gruppe hingegen nur  $0,4 \pm 0,2\%$  der Zellen (Abb. 10 (F)). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erbrachte die Untersuchung des Knochenmarks und des Milzgewebes weder in Bezug auf die B220<sup>+</sup>, die Thy1.2<sup>+</sup> noch auf die *c-kit*<sup>+</sup> Zellen ( $p > 0,05$ ).



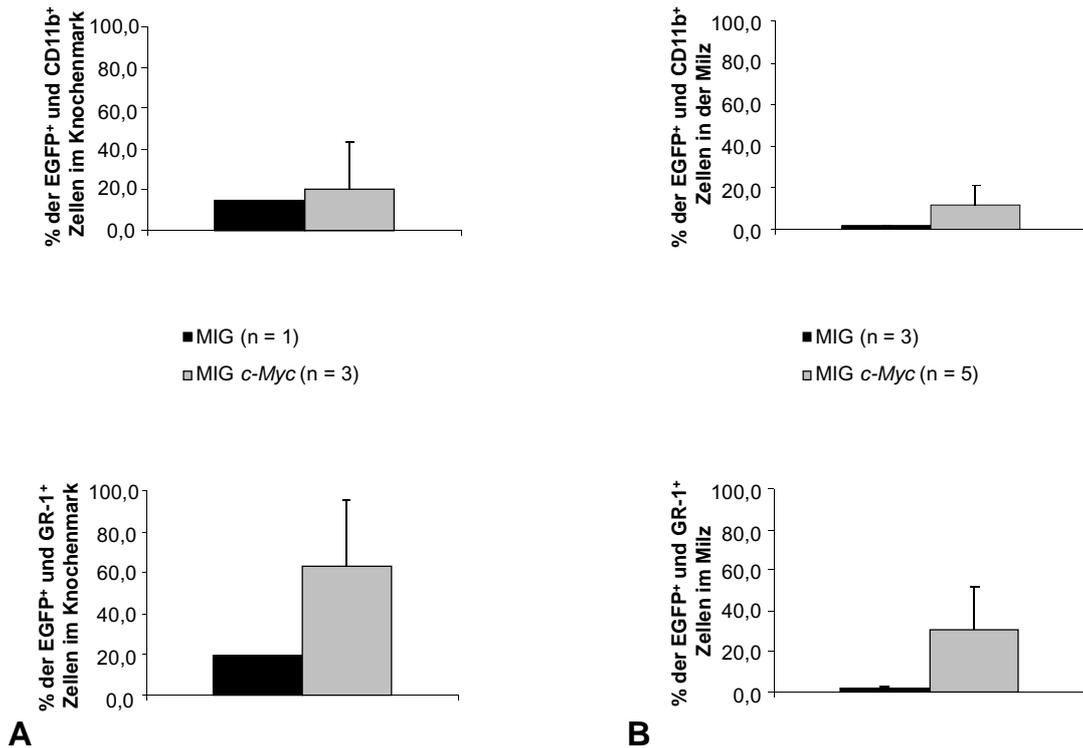
**Abb. 10 FACS-Analyse des Knochenmarks und des Milzgewebes der Mäuse der MIG und MIG *c-Myc* Gruppe zur Feststellung der verschiedenen EGFP<sup>+</sup> Lymphozytenanteile und der EGFP<sup>+</sup> myeloischen Zellen mit Hilfe der Oberflächenmarker B220, Thy1.2 bzw. c-kit:**

Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen (A) im Knochenmark, (B) in der Milz, Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und Thy1.2<sup>+</sup> Zellen (C) im Knochenmark, (D) in der Milz, Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und c-kit<sup>+</sup> Zellen (E) im Knochenmark, (F) in der Milz.

Zur weiteren Charakterisierung der myeloischen Zellpopulation im Knochenmark und im Milzgewebe wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD11b und GR-1 angefärbt. Die Analyse mit CD11b ergab im Knochenmark bei der MIG *c-Myc* Gruppe 20,5 ± 23,1% EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen mit einem Medianwert von 9,6%, bei der Kontrollmaus 14,9% EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen (Abb. 11 (A)). Im Milzgewebe zeigten sich durch die Anfärbung mit CD11b bei der MIG *c-Myc* Gruppe 11,8 ± 9% der Zellen EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> mit einem Median von 10,5%, während bei der MIG Gruppe nur 1,5 ± 0,0% der Zellen EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> bei einem Median von 1,5% waren (Abb. 11(B)). Die Mäuse der MIG *c-Myc* Gruppe wiesen danach gegenüber denen der Kontrollgruppe im Milzgewebe erwartungsgemäß zwar einen höheren Anteil an CD11b<sup>+</sup> Zellen auf, jedoch zeigte der Unterschied mit  $p = 0,06$  kein ausreichendes Signifikanzniveau.

Die Analyse mit GR-1 erbrachte im Knochenmark bei der MIG *c-Myc* Gruppe im Mittel 63,1 ± 32,6% EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen mit einem Medianwert von 80,0%, wohingegen der Anteil EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen bei der MIG Maus 19,4% betrug (Abb. 11 (C)). Die erhebliche Standardabweichung und der deutliche Unterschied zwischen Mittelwert und Median bei der

MIG *c-Myc* Gruppe basierten darauf, dass die festgestellten Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen bei einer zu dieser Gruppe zählenden Maus im Vergleich zu den anderen Mäusen dieser Gruppe wesentlich geringer waren. Die Anfärbung der Milzzellen der Mäuse mit Gr-1 brachte als Ergebnis, dass der Anteil EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen bei der MIG *c-Myc* Gruppe mit  $30,5 \pm 21,0\%$  und einem Medianwert von  $28,4\%$  signifikant höher ( $p < 0,05$ ) war als der bei der MIG Gruppe mit  $2,1 \pm 0,5\%$  EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen und einem Medianwert von  $2,24\%$  (Abb. 11 (D)).



**Abb. 11 FACS-Analyse des Knochenmarks und des Milzgewebes der Mäuse der MIG und der MIG *c-Myc* Gruppe zur weiteren Charakterisierung der myeloischen Zellpopulation mit Hilfe der Oberflächenantikörper CD11b bzw. GR-1:**

**Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen bzw. GR-1<sup>+</sup> Zellen (A) im Knochenmark und (B) in der Milz.**

Die bei den Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe gewonnenen Daten wiesen auf eine Erkrankung der Hämatopoese der myeloischen Zellpopulation hin. Bei der durch Prof. Dr. med. Falko Fend erfolgten histologischen Auswertung des Knochenmarks und der Milzgewebe der MIG *c-Myc* Mäuse zeigte sich nach seinen Erläuterungen eine AML M2. In Verbindung mit den Blutbildkontrollen konnte damit, wie bereits von Luo, Li et al. 2005 beschrieben, gezeigt werden, dass die *c-Myc*-Überexpression eine AML FAB M2 ohne periphere Leukozytose verursacht.

Die Westernblots von *c-Myc* aus den Milzzellen sämtlicher Mäuse zeigten wie erwartet bei den mit dem MSCV-MYC-IRES-GFP-Vektor infizierten Knochenmark transplantierten

Mäusen höhere c-Myc Proteinlevel, als bei jenen, denen das mit dem Leervektor infizierte Knochenmark übertragen worden war (Abb. 8 (D)). Die Westernblots von Cdk1 aus den Milzgeweben der Mäuse erbrachten bei den Mäusen der MIG *c-Myc* Gruppe ein im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhtes Cdk1 Proteinlevel (Abb. 8 (D)). Das Protein Cyclin B1 konnte trotz wiederholter Versuche nicht hinreichend nachgewiesen werden.

#### **5.4 Funktionelle Überprüfung der Bedeutung von *Nipa* für die c-Myc-induzierte Krebsentwicklung am Modell der AML**

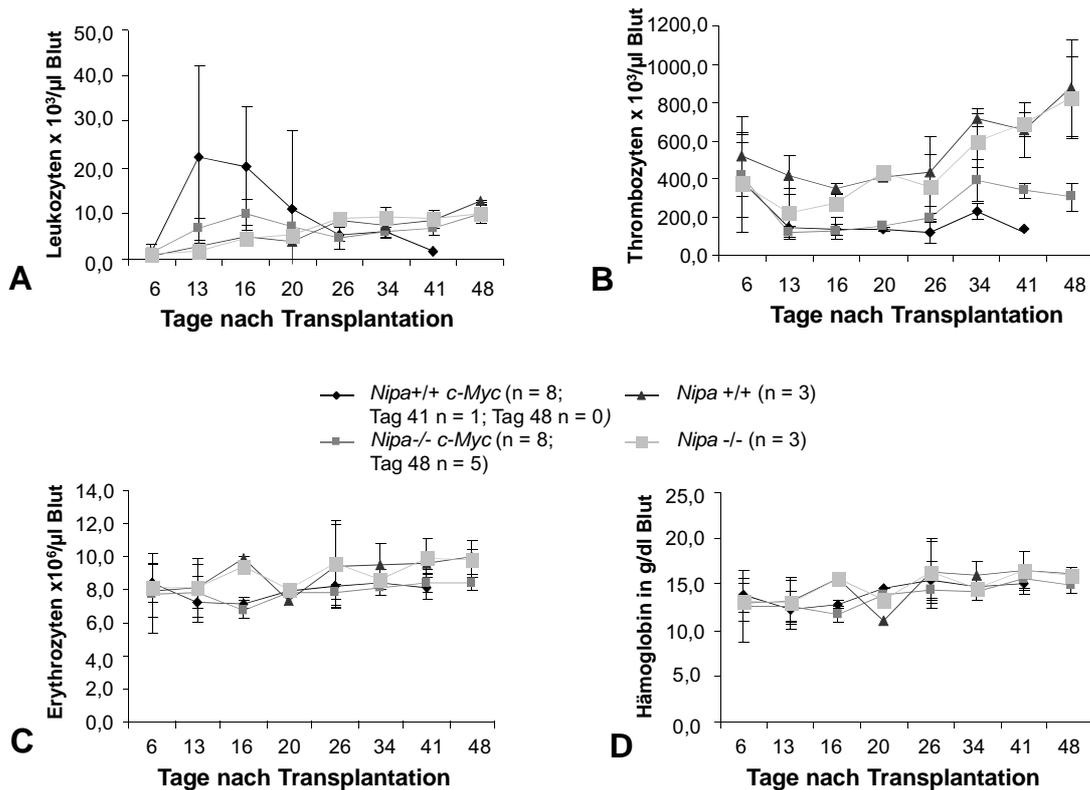
Zur Untersuchung ob und welche Rolle *Nipa* bei der c-Myc induzierten Krebsentstehung spielt, wurden Mausknorpelmarkszellen der Genotypen *Nipa*-wt (*Nipa*<sup>+/+</sup>) und *Nipa*-ko (*Nipa*<sup>-/-</sup>) mit dem Plasmid MSCV-MYC-IRES-GFP transfiziert, das infizierte Knochenmark in C57BL/6 Mäuse transplantiert und die Mäuse sodann in Bezug auf die Entwicklung der Krebserkrankung beobachtet.

Die für die Transplantation benötigten Knochenmarkszellen wurden aus 6 Wochen alten *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup> Geschwistermäusen gewonnen. Die retrovirale Transfektion der Knochenmarkszellen erfolgte mit dem MSCV-MYC-IRES-GFP Vektor. Die mit Hilfe der FACS-Analyse 12 h nach der letzten Spininfektion und direkt vor der Transplantation ermittelte Infektionseffizienz der Knochenmarkszellen zeigte im *Nipa*<sup>+/+</sup> Knochenmark 60,2% und im *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark 58,8% EGFP<sup>+</sup> und damit *c-Myc*-überexprimierende Zellen auf. Wegen des zwischen den Gruppen geringen Unterschieds an EGFP<sup>+</sup> Zellen war auch bei dieser Transplantation eine weitere Angleichung der Prozentanteile nicht erforderlich. Das infizierte *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark wurde zuvor letal bestrahlten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen durch Injektion in eine Schwanzvene übertragen.

Von den insgesamt 22 Mäusen wurden jeweils 8 Mäuse mit dem jeweiligen *c-Myc*-überexprimierenden *Nipa*<sup>+/+</sup> Knochenmark (*Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe) bzw. *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark (*Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe) und jeweils 3 Mäuse als Kontrollgruppen mit jeweils nicht infiziertem *Nipa*<sup>+/+</sup> Knochenmark (*Nipa*<sup>+/+</sup> Gruppe) und *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark (*Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppe) transplantiert.

##### **5.4.1 Schnellere Rekonstitution des Knochenmarks bei den *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen**

Zur Kontrolle des peripheren Blutes auf mögliche Hinweise der Krebserkrankung wurden wie bei der ersten Transplantation wöchentliche Blutbildkontrollen durchgeführt. 6 Tage nach Transplantation waren wie erwartet alle transplantierten Mäuse im Nadir. Bereits 13 Tage nach Transplantation gab es ausweislich des Leukozytenanstiegs Anzeichen für eine Rekonstitution des Knochenmarks (Abb. 12 (A)).



**Abb. 12** Blutbild der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe sowie der Kontrollgruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup> im Vergleich:

(A) Leukozytenanzahl, (B) Thrombozytenanzahl, (C) Erythrozytenanzahl und (D) die Hämoglobinkonzentrationen ab Tag 6 nach Transplantation.

Dabei fiel auf, dass die Leukozyten der mit *c-Myc*-überexprimierenden Knochenmarkszellen transplantierten Mäuse schneller auf signifikant höhere Werte angestiegen waren, als die der Kontrollgruppen ( $p < 0,05$ ). Zu der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe ist anzumerken, dass deren Leukozytenzahlen in den ersten 16 Tagen nach Transplantation den Normwert deutlich überstiegen. An Tag 13 nach Transplantation zeigten die Leukozyten bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe im Mittel mit  $22,5 \pm 19,8 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l die höchsten Werte, im Vergleich zu  $6,7 \pm 2,3 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe. Deutlich unter diesen Werten lagen die Kontrollgruppen mit Leukozytenzahlen von  $2,9 \pm 0,6 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> Gruppe bzw.  $1,8 \pm 0,8 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppe. Auch die Medianwerte der verschiedenen Gruppen wiesen an Tag 13 nach der Transplantation beträchtliche Unterschiede auf. Sie betragen  $12,3 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l bei *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc*,  $6 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l bei *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc*,  $3 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l bei *Nipa*<sup>+/+</sup> und  $1,9 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l bei *Nipa*<sup>-/-</sup>. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) bezüglich der Leukozytenwerte ergaben sich an Tag 13 zwischen den Mäusen mit *c-Myc*-überexprimierendem Knochenmark (*Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc*) und den Kontrolltieren (*Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup>), ebenso zwischen der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>+/+</sup> Gruppe und schließlich zwischen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppe. An Tag 16 nach der Transplantation waren die Leukozytenzahlen zwischen den *c-Myc*-

überexprimierenden Gruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* ebenfalls signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). Während des restlichen Beobachtungszeitraums trat zwischen den beiden Gruppen keine diesbezügliche Signifikanz mehr auf. Jedoch zeigte sich beim Vergleich aller gemessenen Leukozytenwerte bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe signifikant höhere Werte ( $p < 0,05$ ).

Die Leukozytenzahlen der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe sanken nach Tag 13 der Transplantation wieder ab, besonders deutlich während der 3. Woche nach Transplantation. Auch bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe war ab der 3. Woche ein, wenn auch nur leichtes Abfallen der Leukozytenwerte festzustellen. Bei den Kontrollgruppen waren die Leukozytenzahlen nach Transplantation nur langsam, jedoch stetig angestiegen, so dass die Mittelwerte in der 4. Woche nach Transplantation die Leukozytenzahlen der *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen sogar leicht übertrafen (Abb. 12 (A)).

Die Erythrozytenwerte und Hämoglobinkonzentrationen im peripheren Blut blieben bei sämtlichen Mausgruppen über alle Verlaufskontrollen hinweg relativ konstant und zeigten wie bei der ersten Transplantation nur geringfügige Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 12 (C) u. (D)).

Hinsichtlich der Thrombozyten konnte festgestellt werden, dass wie bereits bei der ersten Transplantation die Gruppen ohne *c-Myc*-Überexpression während des gesamten Beobachtungszeitraums im Mittel konstant höhere Werte aufwiesen als die *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe. Dies bedeutet indessen nicht, dass die Unterschiede an allen Untersuchungstagen signifikant waren. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Thrombozytenwerten der *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen und ihrer Kontrollgruppen traten erst nach längerem zeitlichem Abstand von der Transplantation auf. So zwischen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>+/+</sup> an Tag 26 und 34 und zwischen *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> an Tag 34 und 48. An Tag 41 ergab sich beim Vergleich zwischen *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,11$ ). Für die *Nipa*<sup>+/+</sup> Gruppen war an Tag 41 eine Signifikanztestung nicht mehr möglich, da die *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe nur noch durch eine Maus repräsentiert wurde. Die Mittelwerte der Thrombozytenzahlen waren ab Tag 20 bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe niedriger als bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe (Abb. 12 (B)). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) lieferte hier jedoch lediglich die Messung an Tag 34 und der Vergleich der Summen aller Thrombozytenwerte, die bei den *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen jeweils über den gesamten Beobachtungszeitraum festgestellt wurden. Schließlich zeigten sich auch beim Vergleich der Summen der Thrombozytenwerte zwischen der Gruppe *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* bzw. *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* und deren jeweiliger Kontrollgruppe signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

### 5.4.2 Moderate Unterschiede im peripheren Blut zwischen der *Nipa+/+* *c-Myc* und der *Nipa-/-* *c-Myc* Gruppe

Ab dem 13. Tag nach Transplantation wurde das periphere Blut der Mäuse der beiden *c-Myc* Gruppen wie bei der vorangegangenen Transplantation zusätzlich zur wöchentlichen Kontrolle des Blutbildes mittels des FACS-Gerätes auf den Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen und die Anteile der lymphatischen und myeloischen Populationen (Abb. 13) sowie auf bestimmte Oberflächenmarker (Abb. 14) hin analysiert.

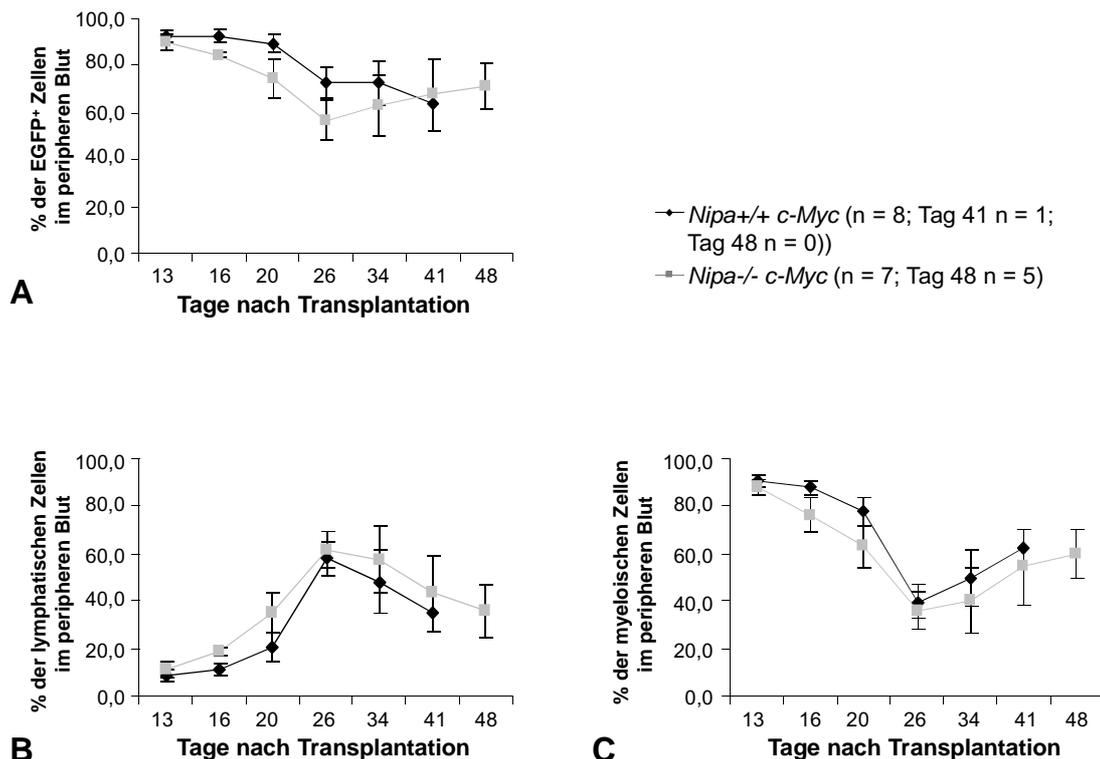


Abb. 13 FACS-Analyse des peripheren Blutes der beiden Mausgruppen *Nipa+/+* *c-Myc* und *Nipa-/-* *c-Myc* zur Feststellung der Prozentanteile (A) EGFP<sup>+</sup> Zellen insgesamt, (B) lymphatischer Zellen sowie (C) myeloischer Zellen bei beiden Gruppen ab Tag 13 nach Transplantation.

Die Untersuchungen an Tag 13 nach Transplantation erbrachten in Bezug auf die Anteile an EGFP<sup>+</sup> Zellen bei der *Nipa+/+* *c-Myc* Gruppe mit  $92,8 \pm 2,5\%$  (Median 92,5%) und bei der *Nipa-/-* *c-Myc* Gruppe mit  $90,2 \pm 3,3\%$  (Median 91,1%) nahezu gleich hohe Mittelwerte. Bis zum Tag 26 nach Transplantation fiel der Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen in der *Nipa+/+* *c-Myc* Gruppe langsamer ab und zeigte signifikant höhere Werte ( $p < 0,05$ ) als in der *Nipa-/-* *c-Myc* Gruppe. Danach stiegen die Anteile EGFP<sup>+</sup> Zellen in der *Nipa-/-* *c-Myc* Gruppe wieder leicht, sodass sich keine signifikanten Unterschiede mehr ergaben. Der Mittelwert EGFP<sup>+</sup> Zellen in der *Nipa+/+* *c-Myc* Gruppe fiel während der gesamten Beobachtungszeit stetig ab und erreichte 41 Tage nach Transplantation – zu diesem Zeitpunkt lebte nur noch eine Maus – mit 64,1% den niedrigsten Wert. In der *Nipa-/-* *c-Myc* Gruppe fiel der Mittelwert der EGFP<sup>+</sup> Zellen nur

bis Tag 26 nach Transplantation ab, nämlich auf  $56,7 \pm 8,5\%$  (Median 60,3%) und stieg sodann wieder bis Tag 48 auf  $71,6 \pm 9,9\%$  an (Median 72,2%) (Abb. 13 (A)).

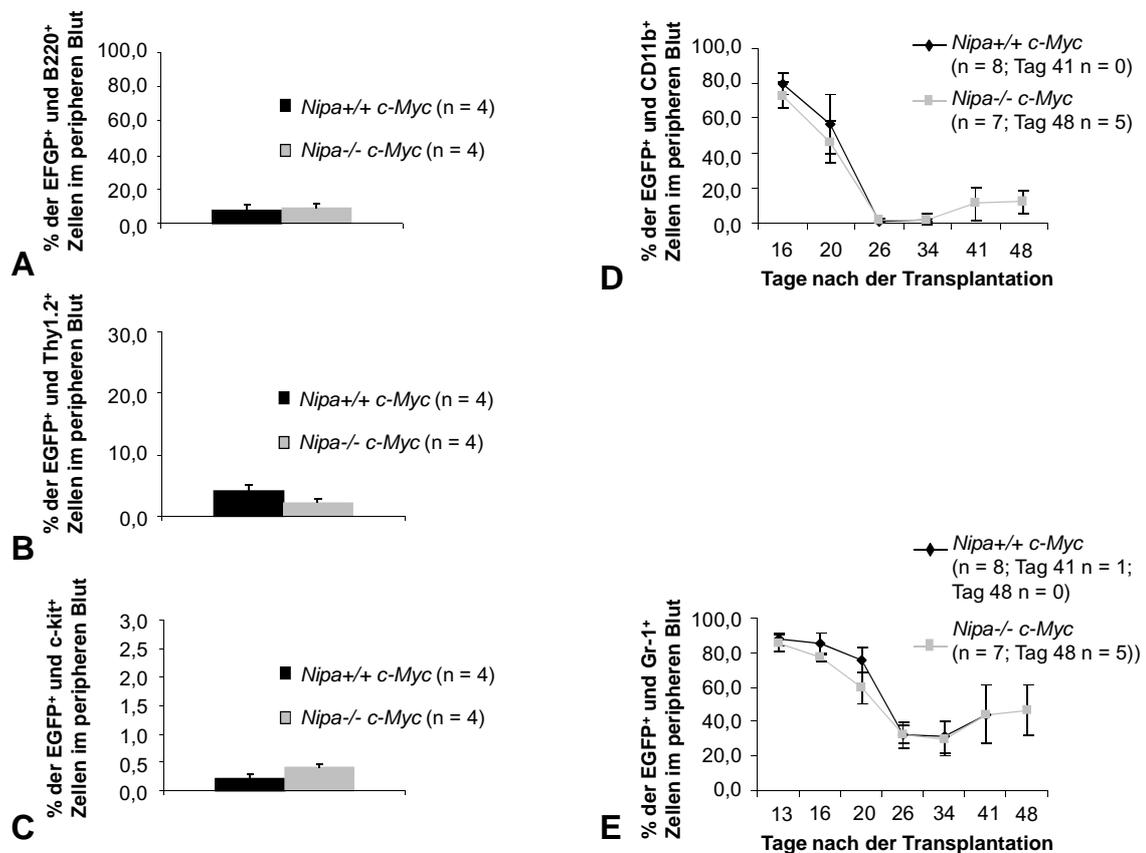


Abb. 14 FACS-Analyse des peripheren Blutes der beiden Mausgruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* zur Feststellung der verschiedenen EGFP<sup>+</sup> Leukozytenanteile mit Hilfe der Oberflächenantikörper B220, Thy1.2, c-kit, CD11b bzw. GR-1:

(A) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> B-lymphatischer Zellen mit B220 an Tag 20 nach Transplantation (im folgenden abgekürzt n.T.), (B) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> T-lymphatischer Zellen mit Thy1.2 an Tag 20 n.T., (C) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> früher myeloischer Vorläuferzellen mit c-kit an Tag 20 n.T., (D) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> myeloischer Zellen mit CD11b ab Tag 16 n.T., (E) Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> myeloischer Zellen mit GR-1 ab Tag 13 n.T. jeweils bei beiden Gruppen.

Die Analysen des peripheren Blutes der Mäuse der beiden *c-Myc* Gruppen bezogen sich des Weiteren auf die Feststellung der Anteile lymphatischer und myeloischer Zellpopulationen. Zunächst sei angemerkt, dass, bezogen auf den Normwert, in beiden Gruppen wie schon bei der ersten Transplantation die Anteile lymphatischer Zellen erniedrigt, während die der myeloischen Zellen deutlich erhöht waren. An Tag 13 nach Transplantation betrug der Anteil der Zellen lymphatischen Ursprungs bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe im Mittel  $8,4 \pm 2,5\%$  (Median 9,3%), der Anteil an myeloischen Zellen  $90,7 \pm 2,6\%$  (Median 89,7%). Bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe betrug der Anteil lymphatischer Zellen  $10,9 \pm 3,3\%$  (Median 9,6%) und der Anteil myeloischer Zellen  $88,0 \pm 3,8\%$  (Median 89,5%). Bis Tag 26 nach Transplantation stiegen die Mittelwerte lymphatischer Zellen in beiden Gruppen an, nämlich bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe auf knapp  $57,8 \pm 6,9\%$  (Median 58,3%) und bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe auf

61,7 ± 7,8% (Median 58,1%). Danach sanken die Werte wieder ab, so bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bis auf 35,2% an Tag 41. Zu diesem Zeitpunkt lebte von dieser Gruppe nur noch eine Maus. Beim letzten Untersuchungstermin 48 Tage nach Transplantation waren alle Mäuse der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe tot. Bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe sanken die Werte bis auf 35,8 ± 10,9% (Median 37,8%) an Tag 48 nach Transplantation (Abb. 13 (B)).

Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei der Feststellung der Anteile myeloischer Zellen im peripheren Blut der Mäuse der *c-Myc* Gruppe. Bis Tag 26 nach Transplantation fielen die myeloischen Anteile beider Gruppen ab, und zwar bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe auf 39,7 ± 7,3% (Median 39,5%) bzw. bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe auf 36 ± 7,6% (Median 39,9%). Danach stiegen sie bis zu den letzten Untersuchungsterminen, bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe Tag 41, bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppe Tag 48 nach Transplantation, wieder an, nämlich bei der Maus der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe auf 62,4%, bei den Mäusen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe auf 59,9 ± 10,4% (Median 58,2%) (Abb. 13 (C)). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit *c-Myc*-überexprimierendem Knochenmark fanden sich nicht.

Zur weiteren Analyse wurden die peripheren Blutzellen der Mäuse der beiden *c-Myc* Gruppen wie bei der ersten Transplantation mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmarker B220, Thy1.2, c-kit sowie CD11b und GR-1 angefärbt (Abb. 14). Für die Feststellung etwaiger Auffälligkeiten bzw. Unterschiede bei den Lymphozytenpopulationen des peripheren Blutes der beiden Gruppen wurden die Blutzellen am 20. Tag nach Transplantation mit dem B220-Antikörper auf B-Lymphozyten und dem Thy1.2-Antikörper auf T-Lymphozyten untersucht. Dabei fanden sich an B-Lymphozyten bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe 8,0 ± 3,0% (Median 8,0%), bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe 8,9 ± 2,4% (Median 9,6%) der jeweiligen Zellen (Abb. 14 (A)). Ebenso zeigten sich bei der Ermittlung der T-Lymphozytenanteile der beiden Gruppen hinsichtlich der EGFP<sup>+</sup> und Thy1.2<sup>+</sup> angefärbten Zellen mit 4,1 ± 0,9% (Median 4,1%) der Zellen bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe und 2,3 ± 0,7% (Median 2,2%) der Zellen bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe keine besonderen Auffälligkeiten (Abb. 14 (B)).

Die ebenfalls an Tag 20 nach Transplantation durchgeführte Untersuchung des peripheren Blutes der beiden Mausgruppen auf EGFP<sup>+</sup> und c-kit<sup>+</sup> Zellen erbrachte Werte, die sich mit Prozentanteilen von 0,2 ± 0,1% der Zellen und einem Median von 0,2% bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bzw. von 0,4 ± 0,1% der Zellen und einem Median von 0,4% bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe als unauffällig erwiesen (Abb. 14 (C)).

Die bestehenden Vordaten aus der ersten Transplantation sowie die an Tag 20 nach Transplantation hinsichtlich der Lymphozytenpopulationen und in Bezug auf EGFP<sup>+</sup> und c-kit<sup>+</sup> Zellen festgestellten Unauffälligkeiten ließen es zu, in der Folgezeit auf weitere Untersuchungen des peripheren Blutes der Mäuse mit den Antikörpern B220, Thy1.2 und c-kit zu verzichten.

Zur Feststellung von EGFP<sup>+</sup> Granulozyten wurde das periphere Blut der beiden Mäuse-

Gruppen im Beobachtungszeitraum mit den Antikörpern CD11b und GR-1 analysiert. Bei den ersten Untersuchungen mit CD11b ergaben sich mit  $79,4 \pm 6,4\%$  in der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe mit einem Median von 82,9% und mit  $72,8 \pm 7,7\%$  in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe mit einem Median von 72,5% bei beiden Gruppen hohe Anteile an EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen. Im weiteren Verlauf, insbesondere zwischen dem 20. und 26. Tag nach Transplantation, fiel der Anteil EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen in den *c-Myc* Gruppen deutlich bis auf Werte von  $1,1 \pm 0,3\%$  (Median 1,0%) bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bzw.  $1,7 \pm 0,6\%$  (Median 1,6%) bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe ab. Diese Werte blieben bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bis Tag 34 nach Transplantation unverändert niedrig. Entsprechendes war bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe festzustellen, allerdings stieg der Anteil EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen nach Tag 34 wieder bis auf  $12,0 \pm 6,9\%$  (Median 14,1%) an Tag 48 nach Transplantation an (Abb. 14 (D)).

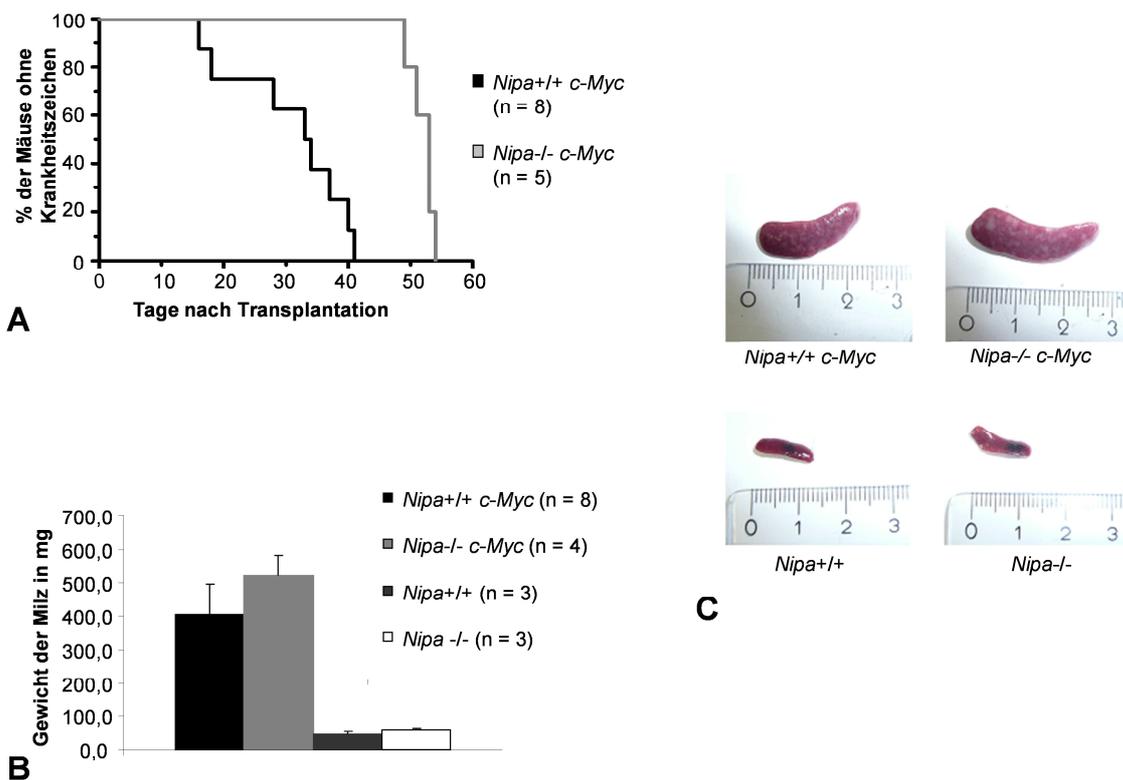
Auch die Analyse mit GR-1 erbrachte bei beiden Mausgruppen bei den Eingangsuntersuchungen des peripheren Blutes mit  $87,7 \pm 3,4\%$  in der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe mit einem Median von 88,3% bzw. mit  $85,4 \pm 4,8\%$  in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe mit einem Median von 86,6% hohe Anteile EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen. Diese Werte fielen danach bis Tag 26 nach Transplantation bei beiden Gruppen ab, bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe zunächst langsam (Tag 16), sodann deutlicher (Tag 20) und schließlich stark bis auf  $32,6 \pm 5,0\%$  (Median 31,5%) an Tag 26, bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe von Untersuchungstermin zu Untersuchungstermin stetig immer deutlicher bis auf  $32,1 \pm 7,8\%$  (Median 32,5%) an Tag 26. Zwischen Tag 16 und Tag 20 nach Transplantation sank der Anteil EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe langsamer ab als bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe und zeigte an Tag 20 signifikant höhere Anteile EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ) als die *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe. Im weiteren Verlauf wiesen beide Gruppen nahezu gleich hohe Anteile EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen auf, die bis Tag 41 nach Transplantation nochmals bis auf 44,2 % bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe ( $n = 1$ ) und  $44,2 \pm 16,8\%$  (Median 49,9%) bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe ( $n = 5$ ) anstiegen (Abb. 14 (E)).

Die Mäuse wurden vor jeder Blutentnahme gewogen. Dabei zeigten sich zwischen den Gruppen keine wesentlichen Unterschiede. Insbesondere vor Auftreten der Krankheitssymptome war bei den Mäusen kein Gewichtsverlust festzustellen.

### 5.4.3 Verlust von *Nipa* verzögert das Auftreten der *c-Myc*-induzierten AML

Die Mäuse der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe erkrankten zwischen dem 16. und dem 41. Tag nach Transplantation (Abb. 15 (A)). Die mediane Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Krankheitszeichen betrug 33,5 Tage. Die Tiere zeigten jeweils sämtliche Symptome, wie Lethargie, Kurzatmigkeit und Schwäche bzw. Paresen der hinteren Gliedmaßen. Bei allen Mäusen fand sich bei der Sektion eine Splenomegalie, jedoch keine Vergrößerung der Lymphknoten und des Thymus.

An Tag 36 nach Transplantation wurden für einen Vergleich mit den zu diesem Zeitpunkt bereits symptomatisch gewordenen Mäusen der *Nipa+/+* *c-Myc* Gruppe aus der *Nipa-/- c-Myc* Gruppe zwei symptomfreie Mäuse als sogenannte Kontrolltiere getötet und analysiert. Diese Mäuse wiesen ebenso wie die erkennbar erkrankten Tiere der *Nipa+/+* *c-Myc* Gruppe bei der Sektion eine deutliche Splenomegalie sowie keine Vergrößerung der Lymphknoten und des Thymus auf. Auch die FACS-Analyse des peripheren Blutes, des Knochenmarks und des Milzgewebes der beiden *Nipa-/- c-Myc* Kontrollmäuse erbrachte keine Unterschiede gegenüber den symptomatischen Tieren der *Nipa+/+* *c-Myc* Gruppe.



**Abb. 15** Erkrankungskurven der *Nipa+/+* *c-Myc* und *Nipa-/- c-Myc* Mäuse, Milzgewicht bei den *Nipa+/+* und *Nipa-/-* Gruppen mit und ohne *c-Myc*-Überexpression und Milzabbildungen:

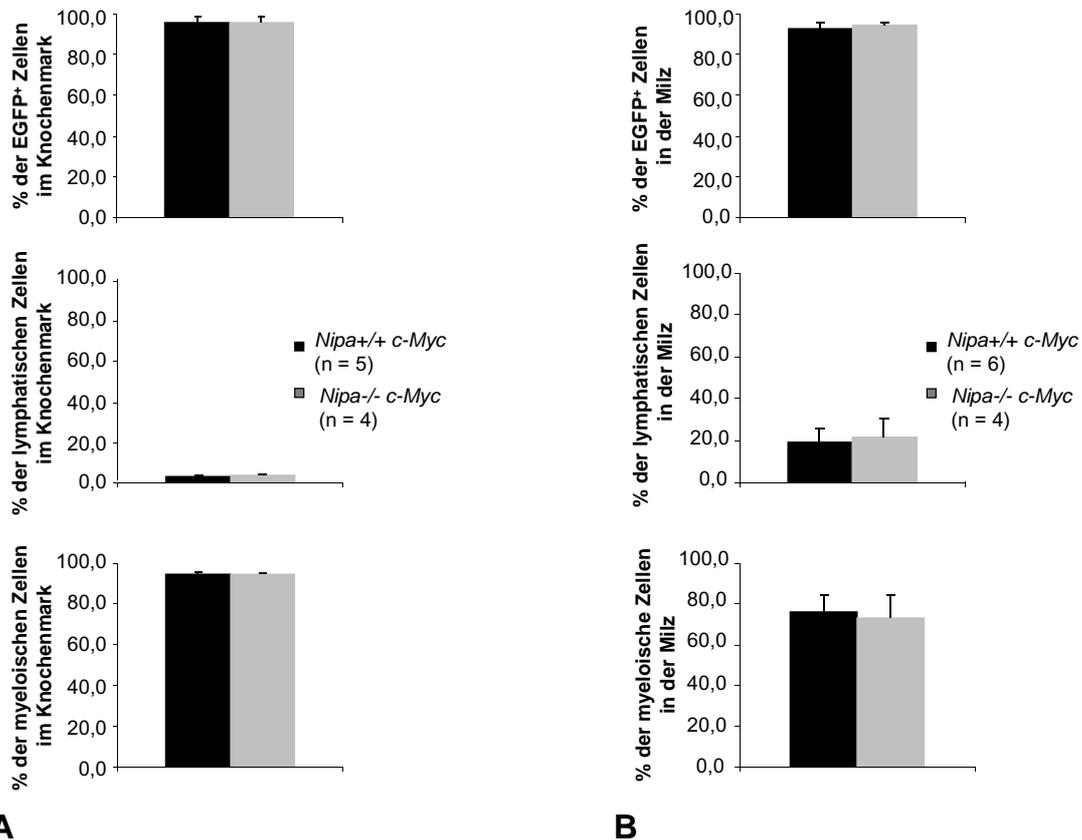
(A) Diagramm zum Auftreten erster Krankheitszeichen bei den Mäusen der *Nipa+/+* *c-Myc* und *Nipa-/- c-Myc* Gruppe. (B) Mittleres Milzgewicht der *Nipa+/+* *c-Myc* und *Nipa-/- c-Myc* Gruppen sowie der Kontrollgruppen *Nipa+/+* und *Nipa-/-*. (C) Abbildungen von je einer Milz der Gruppen *Nipa+/+* *c-Myc*, *Nipa-/- c-Myc*, *Nipa+/+* und *Nipa-/-*.

Die nicht getöteten Mäuse der *Nipa-/- c-Myc* Gruppe entwickelten zwischen Tag 49 und Tag 54 nach der Transplantation erste Krankheitszeichen (Abb. 15 (A)). Die mediane Latenzzeit betrug hier 53 Tage. Dabei zeigten die *Nipa-/- c-Myc* Tiere dieselben Symptome wie die Mäuse der *Nipa+/+* *c-Myc* Gruppe. Bei ihrer Sektion ergaben sich ebenfalls eine Splenomegalie ohne Lymphknoten- und Thymusvergrößerungen.

Die *Nipa+/+* und *Nipa-/-* Kontrollmäuse hatten zu keinem Zeitpunkt Zeichen einer

Erkrankung. Sie wurden 60 Tage nach Transplantation für die Gewinnung von Kontrollmaterial getötet.

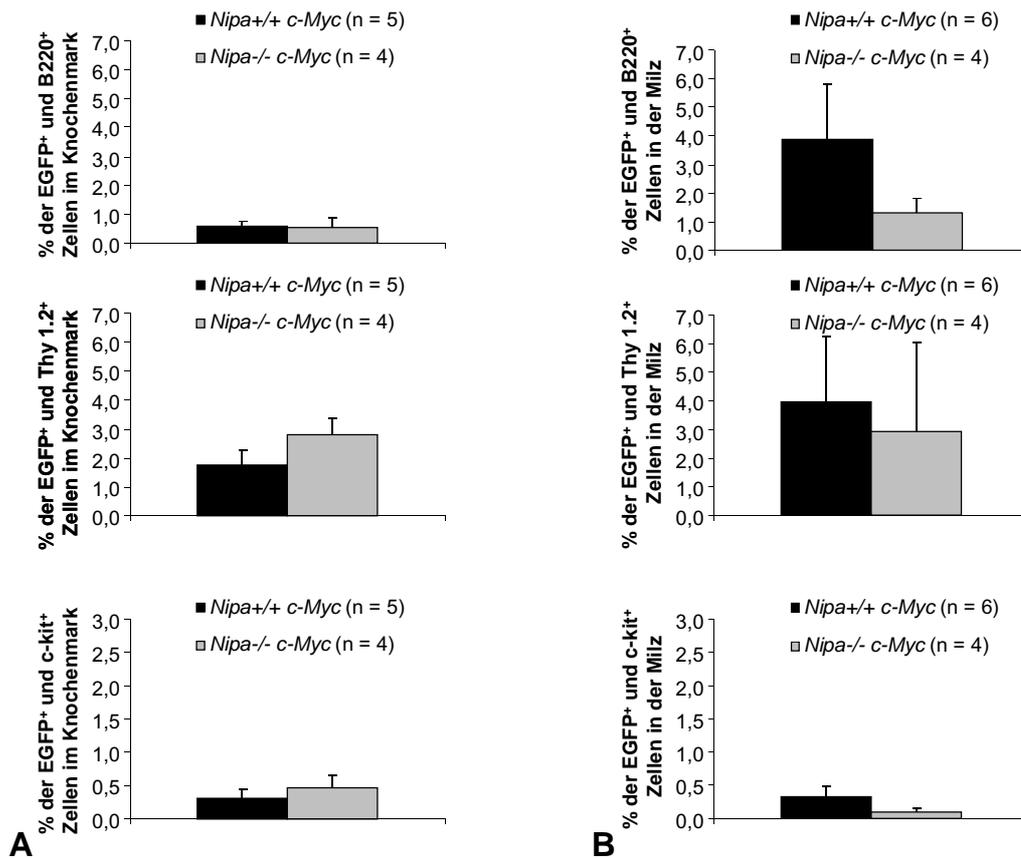
Bei den mit *c-Myc*-überexprimierendem *Nipa*<sup>+/+</sup> Knochenmark transplantierten Mäusen traten die Erkrankungserscheinungen signifikant früher ( $p < 0,05$ ) auf (Median 33,5 d) als bei den Tieren, denen *c-Myc*-überexprimierendes *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark transplantiert worden war (Median 53 d) (Abb.15 (A)).



**Abb. 16** FACS-Analyse des Knochenmarks und des Milzgewebes der Mausgruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* zur Feststellung der Prozentanteile EGFP<sup>+</sup>, lymphatischer und myeloischer Zellen bei beiden Gruppen (A) im Knochenmark und (B) in der Milz.

Die bei der Sektion sämtlicher am Versuch beteiligter Mäuse vorgenommene Untersuchung der Milz erbrachte wie erwartet bei den Organen der Tiere der beiden mit *c-Myc*-überexprimierendem Knochenmark transplantierten Gruppen signifikant höhere Gewichts- und Größenmaße ( $p < 0,05$ ) als bei den beiden Kontrollgruppen (Abb. 15 (B) und (C)). So erreichte die Milz in den *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäusen mit einem Gewicht von im Mittel  $405,5 \pm 92,2$  mg (Median 369 mg) nahezu das 10-fache des Mittelwertes des Milzgewichtes bei den Kontrolltieren in Höhe von  $45,7 \pm 11,2$  mg (Median 50 mg). Ähnlich große Unterschiede zeigten sich zwischen den beiden *Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppen, indem das Milzgewicht bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen im Durchschnitt  $523,0 \pm 58,7$  mg (Median 540,5 mg) betrug, im Gegensatz zu  $59,0 \pm 2,7$  mg (Median 60 mg) bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> Kontrolltieren. Auffallend war noch, dass bei den Mäusen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe das Milzgewicht höher war als bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc*

Gruppe, eine Signifikanz ergab sich dafür allerdings nicht (Abb. 15 (B)).



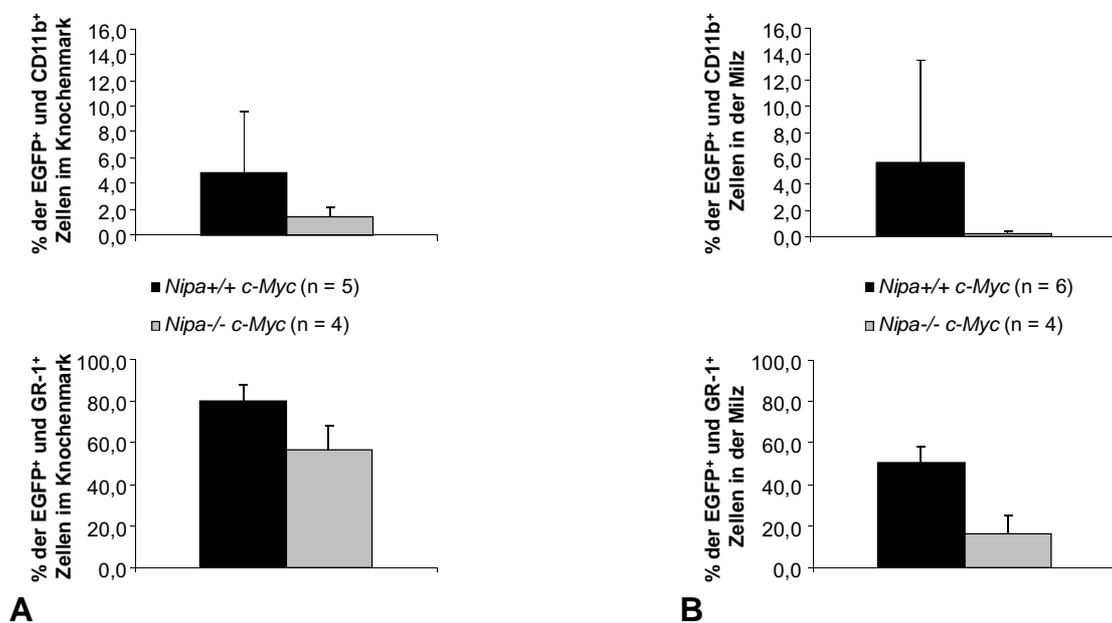
**Abb. 17 FACS-Analyse des Knochenmarks und des Milzgewebes der Mausgruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* zur Feststellung der verschiedenen EGFP<sup>+</sup> Lymphozytenanteile mit Hilfe der Oberflächenantikörper B220 und Thy1.2 und der EGFP<sup>+</sup> myeloischen Vorläuferzellen mittels des Antikörpers c-kit:**

**Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen, EGFP<sup>+</sup> und Thy1.2<sup>+</sup> Zellen sowie EGFP<sup>+</sup> und c-kit<sup>+</sup> Zellen (A) im Knochenmark, (B) in der Milz.**

Das von den beiden mit dem MSCV-MYC-IRES-GFP-Vektor infizierten Mausgruppen aus dem Knochenmark und der Milz gewonnene Zellmaterial wurde mit Hilfe des FACS-Gerätes weiter untersucht (Abb. 16). Dabei zeigte sich, dass sowohl im Knochenmark als auch in der Milz die Anteile EGFP<sup>+</sup> Zellen bei jeweils beiden Gruppen nahezu gleich hoch waren. Im Knochenmark der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäuse betrug der Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen  $96,1 \pm 3,0\%$  (Median 97,5%), in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe  $95,9 \pm 2,8\%$  (Median 96,6%) (Abb. 16 (A)). In der Milz lag der Anteil EGFP<sup>+</sup> Zellen bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bei  $92,7 \pm 2,9\%$  (Median 93,9%) und bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe bei  $94,4 \pm 1,6\%$  (Median 94,5%) (Abb. 16 (B)). Was die Leukozytenanteile angeht, so waren im Knochenmark und in der Milz bei beiden Gruppen der jeweilige Anteil lymphatischer Zellen im Verhältnis zu der myeloischen Population deutlich verringert (Abb. 16). Im Knochenmark konnte bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe ein Lymphozytenanteil von  $2,9 \pm 0,9\%$  (Median 2,9%) der Zellen und bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe in Höhe von  $3,3 \pm 0,7\%$  (Median 3,6%) der Zellen festgestellt werden, während die Anteile an Zellen myeloischen Ursprungs bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe  $94,8 \pm$

0,8% (Median 94,4%) bzw.  $94,7 \pm 0,6\%$  (Median 94,7%) bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe ausmachten (Abb. 16 (A)).

Bei der Milz, die im Vergleich zum Knochenmark normalerweise einen höheren Anteil an lymphatischen Zellen aufweist, erbrachten die Untersuchungen bei den *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäusen Lymphozytenanteile mit  $18,9 \pm 7,1\%$  (Median 17,1%) der Zellen gegenüber  $21,5 \pm 9,3\%$  (Median 21,2%) der Zellen bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe (Abb. 16 (B)). Dennoch zeigte sich auch in der Milz ein deutlich erhöhter Infiltrationsgrad mit myeloischen Zellen. So waren bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe  $76,0 \pm 8,4\%$  (Median 77,5%) der Zellen des Milzgewebes myeloischen Ursprungs, bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen  $73,0 \pm 11,6\%$  (Median 73,6%) der Zellen (Abb. 16 (B)).



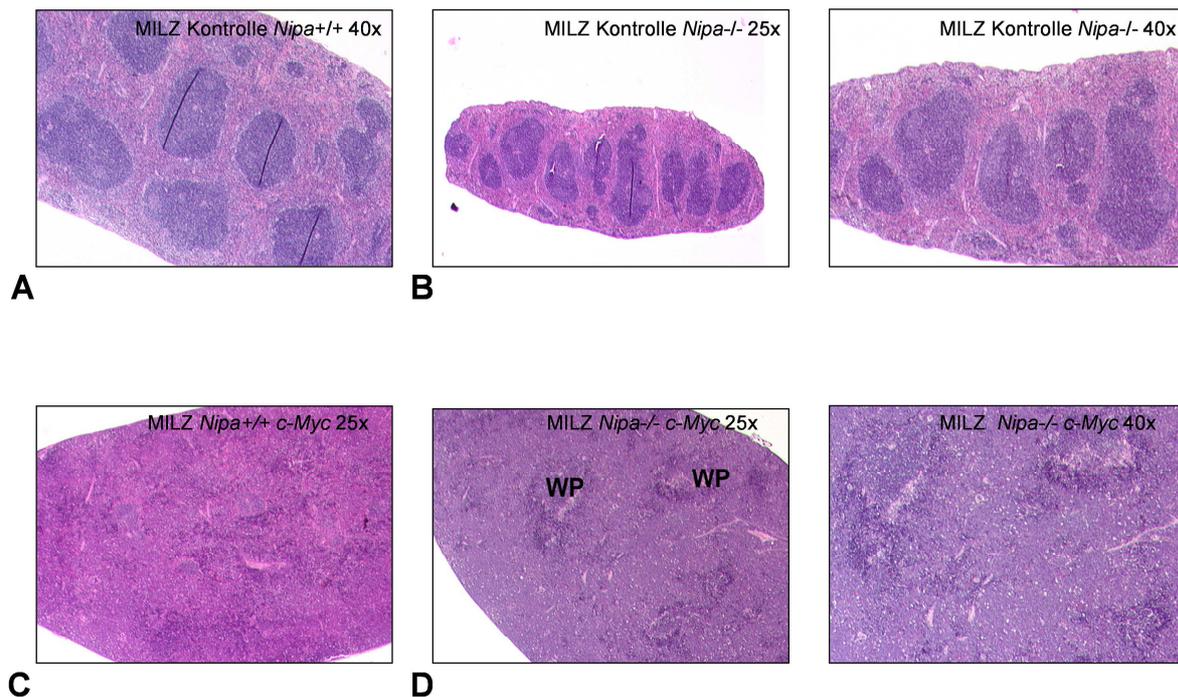
**Abb. 18** FACS-Analyse des Knochenmarks und des Milzgewebes der Mausgruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* zur weiteren Charakterisierung der myeloischen Zellpopulation mit Hilfe der Oberflächenantikörper CD11b bzw. GR-1:

Prozentanteile EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> bzw. EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen (A) im Knochenmark, (B) in der Milz.

Die weitere Differenzierung der Lymphozyten im Knochenmark und im Milzgewebe der beiden *c-Myc*-überexprimierenden Mausgruppen erfolgte wiederum durch Anfärben mit B220 zum Nachweis von B-Zellen und mit Thy1.2 zur Bestimmung von T-Zellen. Danach ergab sich in Bezug auf die Feststellung von B-Lymphozyten im Knochenmark bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe ein Anteil EGFP<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen von  $0,6 \pm 0,2\%$  (Median 0,6%), bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe von  $0,6 \pm 0,3\%$  (Median 0,6%) (Abb. 17 (A)) sowie in der Milz bei den

*Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäusen ein Anteil von  $3,9 \pm 1,9\%$  (Median 3,2%) und bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe von nur  $1,3 \pm 0,5\%$  (Median 1,2%) EGFP<sup>+</sup> und B220<sup>+</sup> Zellen (Abb. 17 (B)).

Hinsichtlich der T-Lymphozyten lagen die Anteile an EGFP<sup>+</sup> und Thy1.2<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bei  $1,8 \pm 0,5\%$  (Median 2,0%) und bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe bei  $2,8 \pm 0,6\%$  (Median 2,8%) der Zellen (Abb. 17 (C)), in der Milz bei den *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäusen bei  $4,0 \pm 2,3\%$  (Median 2,8%) und bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen bei  $2,9 \pm 3,1\%$  (Median 1,7%) der Zellen (Abb. 17 (D)).



**Abb. 19** Milzgewebeschnitte von explorierten Mausgruppen nach HE-Färbung in verschiedenen Vergrößerungsstufen:

(A) *Nipa*-Wildtyp Maus (*Nipa*<sup>+/+</sup>), (40x), (B) *Nipa*-Knockout Maus (*Nipa*<sup>-/-</sup>), (25x + 40x), (C) *Nipa*-Wildtyp Maus mit *c-Myc*-Überexpression (*Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc*), (25x), (D) *Nipa*-Knockout Maus mit *c-Myc*-Überexpression (*Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc*), (25x + 40x). (WP = Weiße Pulpa)

Zur Feststellung früher myeloischer Vorläuferzellen erfolgte die Anfärbung des Zellmaterials aus dem Knochenmark und dem Milzgewebe der beiden *c-Myc*-überexprimierenden Mausgruppen mit *c-kit*. Dies erbrachte im Knochenmark der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe einen Anteil an EGFP<sup>+</sup> und *c-kit*<sup>+</sup> Zellen von lediglich  $0,3 \pm 0,2\%$  (Median 0,3%) und bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe von  $0,5 \pm 0,2\%$  (Median 0,5%) der Zellen (Abb. 17 (E)). Ähnlich niedrige Anteile ergaben sich für EGFP<sup>+</sup> und *c-kit*<sup>+</sup> Zellen auch im Milzgewebe mit  $0,3 \pm 0,2\%$  (Median 0,3%) in der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bzw.  $0,1 \pm 0,1\%$  (Median 0,1%) bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen (Abb. 17 (F)).

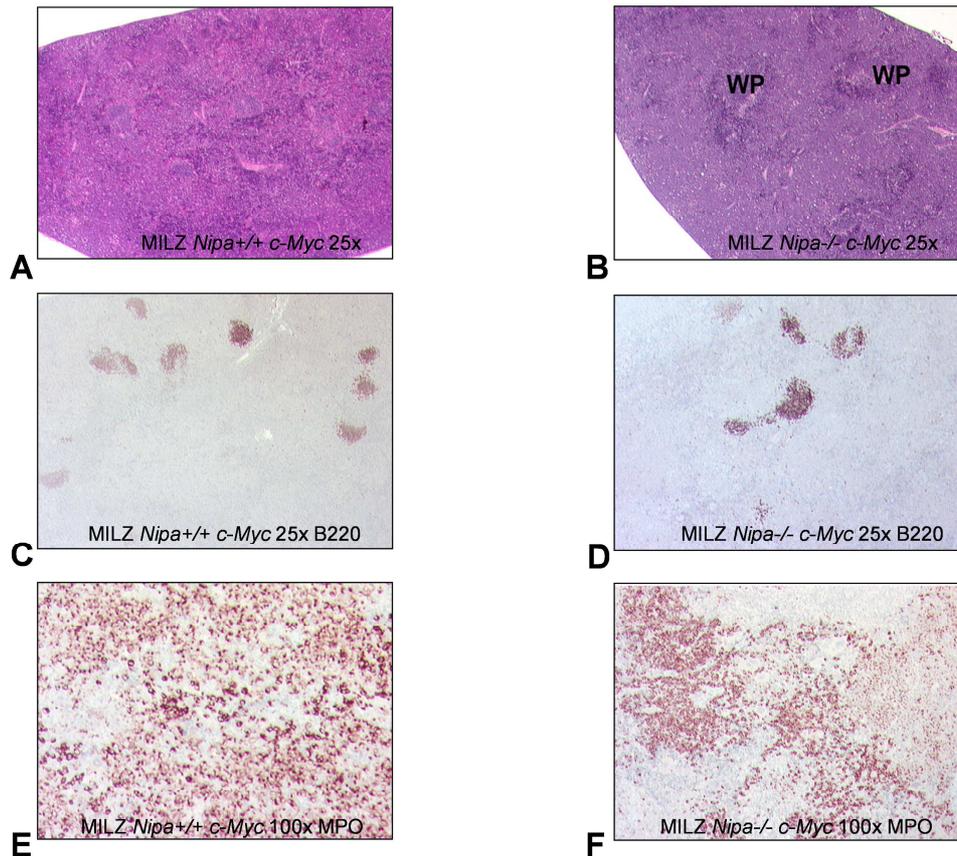
Bei der zur weiteren Charakterisierung der myeloischen Zellpopulation im Knochenmark und im Milzgewebe der beiden explorierten Mausgruppen vorgenommenen Anfärbung mit CD11b wurde wie schon bei der Untersuchung in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraums beim peripheren Blut festgestellt, dass das Zellmaterial des Knochenmarks und des Milzgewebes nur einen geringen Prozentanteil EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen aufwies. Im Knochenmark betrug der Anteil EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe nur  $4,9 \pm 4,7\%$  (Median 3,1%) der Zellen, bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen war der Anteil mit  $1,4 \pm 0,7\%$  (Median 1,2%) der Zellen sogar noch niedriger (Abb. 18 (A)). In der Milz fanden sich bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe  $5,7 \pm 7,9\%$  (Median 2,0%), bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe lediglich  $0,3 \pm 0,2\%$  (Median 0,3%) EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen (Abb. 18 (B)). Die Analyse mit CD11b erbrachte in Bezug auf die Anteile EGFP<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark und in der Milz keine signifikanten Unterschiede zwischen der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe ( $p > 0,05$ ).

Die Untersuchung des Zellmaterials des Knochenmarks und des Milzgewebes beider Mausgruppen mit GR-1 ergab gegenüber der Anfärbung mit CD11b insbesondere bei den *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäusen vergleichsweise deutlich höhere Werte an entsprechenden Anteilen EGFP<sup>+</sup> Zellen. So konnte an EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe ein Anteil von  $80,4 \pm 7,6\%$  (Median 80,1%), bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe jedoch nur von  $56,5 \pm 11,8\%$  (Median 55,8%) der Zellen (Abb. 18 (C)) festgestellt werden, während der Anteil EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen in der Milz der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäuse  $50,7 \pm 7,9\%$  (Median 50,3%) gegenüber  $16,3 \pm 9,0\%$  (Median 16,3%) bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Tieren (Abb. 18 (D)) betrug. Damit waren bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe sowohl im Knochenmark als auch in der Milz die mit den myeloischen Oberflächenmarkern GR-1 ausgestatteten Anteile EGFP<sup>+</sup> Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe, und dies, obgleich die *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Tiere bei Tötung die gleichen Krankheitszeichen wie die *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäuse aufwiesen.

Als Ergebnis der histologischen Aufarbeitung fanden sich bei den mit *c-Myc*-überexprimierendem Knochenmark transplantierten Mausgruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* eindeutige Zeichen einer AML mit Ausreifung. Dabei zeigte die Milz weitgehend diffuse Infiltrationen mit großen Zellen, die blastäres Chromatin, prominente Nukleoli und wenig Zytoplasma aufwiesen.

Im Milzgewebe von Tieren der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe konnten myeloische Zellen in den verschiedensten Reifestadien erkannt werden, was zu der Diagnose einer AML mit Ausreifung führte (Abb. 19). Die myeloische Differenzierung der Zellen wurde durch die immunhistochemische Analyse bestätigt, indem mittels Anfärbung des Milzgewebes mit Myeloperoxidase (MPO)-Antikörper aufgezeigt werden konnte, dass die Mehrzahl der Zellen positiv für MPO waren (Abb. 20 (E) und (F)). Die Oberflächenmarker CD3 und B220 waren auf Tumorzellen der Milz abwesend, auf dort verbliebenen normalen B- und T-Lymphozyten

jedoch feststellbar (Abb. 20 (C) und (D)).



**Abb. 20** Milzgewebeschnitte von *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen nach HE- und immunhistologischer Färbung in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen:

Gewebeschnitte nach HE-Färbung einer (A) *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Maus, (25x) und einer (B) *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Maus, (25x). Gewebeschnitte nach immunhistologischer Färbung mit B220-Antikörpern einer (C) *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Maus, (25x), und einer (D) *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Maus, (25x). Gewebeschnitte nach immunhistologischer Färbung mit MPO-Antikörpern einer (E) *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Maus, (100x), und einer (F) *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Maus, (100x). (WP = Weiße Pulpa)

Die histologische Untersuchung förderte ebenso wie die makroskopische Betrachtung und die FACS-Analysen hinsichtlich ihrer jeweiligen spezifischen Feststellung der Krebserkrankung zwischen den beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* keine wesentlichen Unterschiede zutage.

Sowohl die *Nipa*<sup>+/+</sup> als auch die *Nipa*<sup>-/-</sup> Tiere erkrankten durch *c-Myc*-Überexpression an einer AML mit Ausreifung. Die Erkrankung trat bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe allerdings verzögert auf. Bei den Kontrolltieren zeigte sich die Milz erwartungsgemäß völlig unauffällig. Sie wiesen die normalen Strukturen und Zellen einer gesunden Milz auf.

## 5.5 Gesteigerte Apoptose in *c-Myc*-überexprimierendem *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark

Der Umstand, dass sowohl *c-Myc* als auch *Nipa* die Regulation des Zellzyklus beeinflussen, gab Anlass zur Untersuchung, ob zwischen den Knochenmarkszellen der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und

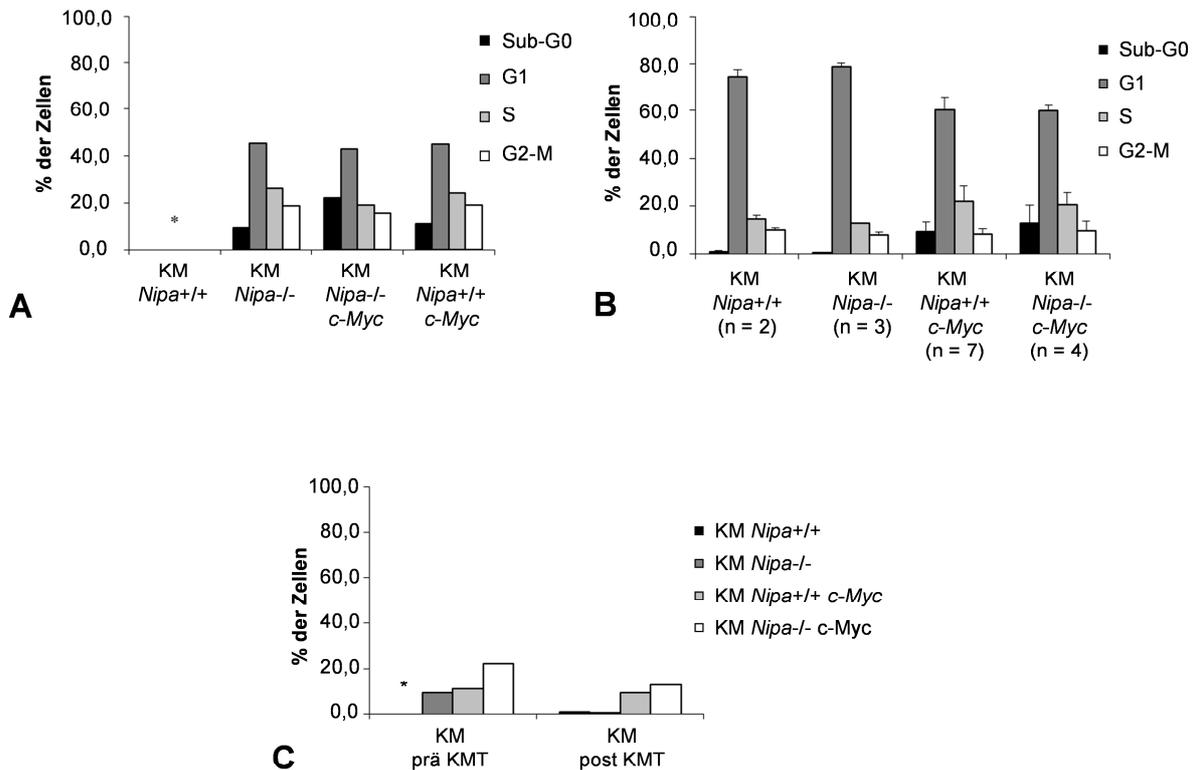
der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe Unterschiede im Zellzyklus bestehen, wodurch sich der bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe festgestellte verzögerte Krankheitsbeginn möglicherweise erklären ließe. Hierfür wurde bei den für die Transplantation vorbereiteten, jedoch danach hierzu nicht benötigten *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmarkszellen eine Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid durchgeführt (Abb. 21 (A)). Nichttransfizierte Knochenmarkszellen mit dem *Nipa*<sup>+/+</sup> Genotyp waren nicht mehr vorhanden. Dabei zeigte sich, dass bei den prämaligen Knochenmarkszellen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe der Anteil an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub> Phase (22,2%) nahezu doppelt so hoch war wie bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe (11,2%). Mituntersuchte nicht-transfizierte Knochenmarkszellen mit dem *Nipa*<sup>-/-</sup> Genotyp wiesen zum Vergleich einen Anteil von lediglich 9,3% an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub> Phase auf (Abb. 21 (A)).

Eine weitere Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid erfolgte sodann bei den Knochenmarks- und Milzzellen der transplantierten Mäuse nach dem Tod der Tiere. Da die Untersuchungsergebnisse in Bezug auf die Milzzellen keinerlei Abweichungen bzw. Auffälligkeiten von bzw. gegenüber den Resultaten bei den Knochenmarkszellen zutage brachten, sondern mit diesen Werten übereinstimmten, wurde von einer weiteren Diskussion der gewonnenen Milzzellenwerte abgesehen. Bei der Zellzyklusuntersuchung der von den erkrankten und getöteten Mäusen herrührenden Knochenmarkszellen ergab sich hinsichtlich des Anteils an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub> Phase, dass dieser bei den *c-Myc*-überexprimierenden Zellen mit einem Mittelwert von  $9,5 \pm 4,1\%$  (Median 8,44%) bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe bzw. von  $12,7 \pm 7,6\%$  (Median 12,8%) bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe zwar signifikant ( $p < 0,05$ ) höher war als bei den Kontrollzellen der *Nipa*<sup>+/+</sup> Gruppe mit  $0,7 \pm 0,6\%$  (Median 0,7%) bzw. der *Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppe mit  $0,6 \pm 0,1\%$  (Median 0,6%), dass jedoch die bei den beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen festgestellten Mittelwerte der Anteile zum Todeszeitpunkt der Mäuse deutlich weniger voneinander differierten als zum Zeitpunkt der Transplantation und keinen signifikanten Unterschied mehr ( $p > 0,05$ ) zeigten (Abb. 21 (B)).

In Bezug auf den Anteil an Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase wiesen die *c-Myc*-überexprimierenden Knochenmarkszellen signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Werte auf als die Knochenmarkszellen der Kontrollgruppen. So betragen diese Anteile bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe im Mittel  $60,4 \pm 5,5\%$  (Median 60,4%) bzw. bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe im Mittel  $59,9 \pm 2,8\%$  (Median 60,1%) der Zellen gegenüber einem Mittelwert von  $74,5 \pm 3,0\%$  (Median 74,5%) bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> Gruppe bzw.  $78,7 \pm 1,4\%$  (Median 79,1%) bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppe (Abb. 21 (B)). Die *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen unterschieden sich auch in dieser Phase nicht signifikant voneinander. Was den Anteil an Zellen in der S-Phase angeht, so waren diese bei den beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen mit  $22,0 \pm 7,0\%$  (Median 21,1%) bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe und  $20,5 \pm 5,1\%$  (Median 20,2%) bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe höher als die entsprechenden Anteile bei den Kontrollgruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> mit  $14,6 \pm 1,4\%$  (Median 14,6%) bzw. *Nipa*<sup>-/-</sup> mit  $12,7 \pm 0,5\%$  (Median 12,8%) (Abb. 21 (B)). Signifikant ( $p < 0,05$ ) war hier jedoch nur der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit *Nipa*<sup>+/+</sup> Knochenmark,

während sich die Werte weder zwischen den Gruppen mit *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark mit einem p-Wert von 0,06 noch zwischen den *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen signifikant voneinander unterscheiden.

Schließlich zeigte die Zellzyklusanalyse der Knochenmarkszellen von den getöteten Mäusen hinsichtlich der Anteile an Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase zwischen allen 4 explorierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 21** Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid bei Knochenmarkszellen (KM) der Mausgruppen *Nipa*-Wildtyp (*Nipa*<sup>+/+</sup>), *Nipa*-Knockout (*Nipa*<sup>-/-</sup>), *Nipa*-Wildtyp mit *c-Myc*-Überexpression (*Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc*) und *Nipa*-Knockout mit *c-Myc*-Überexpression (*Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc*)

(A) Prozentanteile an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase zum Zeitpunkt der Transplantation (prä KMT). (\*KM *Nipa*<sup>+/+</sup> prä KMT nicht vorhanden) (B) Prozentanteile an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase zum Todeszeitpunkt der Mäuse (post KMT). (C) Vergleich der Prozentanteile an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>-Phase zwischen prä KMT und post KMT der Mäuse. (\* KM *Nipa*<sup>+/+</sup> prä KMT nicht vorhanden).

Zu der Zellzyklusanalyse ist anzumerken, dass bezüglich sämtlicher Zellzyklusphasen die Ergebnisse der jeweiligen Analysen bei den einzelnen Mäusen innerhalb einer Gruppe sehr heterogen waren (Daten nicht gezeigt).

Danach kann festgehalten werden:

Bezüglich der Knochenmarkszellen vor Transplantation war bei einem Vergleich der Zellen der Gruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc*, *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> bei den prä-malignen *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Zellen eine höhere Apoptoserate erkennbar (Abb. 21 (C)). Bei den Zellzyklusanalysen der

Knochenmarkszellen der erkrankten, getöteten Mäuse konnte hinsichtlich der Apoptoserate der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe ein höherer Wert als bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe festgestellt werden, der sich aber nicht mehr ganz so deutlich von dem Wert der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe unterschied wie vor der Transplantation und der keine Signifikanz aufwies.

## 6 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor c-Myc spielt auf Grund der großen Anzahl der Gene und Genprodukte die mit ihm interagieren sowohl in der gesunden als auch in der kranken Zelle eine wichtige Rolle. Schätzungen zufolge ist c-Myc an der Regulation von bis zu 15% aller Gene des menschlichen Genoms beteiligt (Li, Van Calcar et al. 2003; Dang, O'Donnell et al. 2006). Dementsprechend schwerwiegende Folgen löst eine Dysregulation dieses Transkriptionsfaktors aus. Bekanntlich hat das Protoonkogen *c-Myc* bei mindestens 20% gegebenenfalls sogar bei bis zu 70% aller humanen Tumoren den Schritt zum aktivierten Onkogen vollzogen. Damit erweist es sich als eines der am häufigsten aktivierten Onkogene (Dang, O'Donnell et al. 2006; Dang 2012). Bei einer Aktivierung zum Onkogen stehen der Zelle sowohl p53-abhängige Mechanismen wie z.B. der proapoptotische Arf-p53-Signalweg als auch p53-unabhängige Mechanismen zur Verfügung (Sakamuro, Eviner et al. 1995), welche die Zelle für die Apoptose sensibilisieren und es ihr damit ermöglichen, den Organismus vor Transformationen und somit vor genetischer Instabilität zu schützen (Nilsson and Cleveland 2003; Meyer, Kim et al. 2006). Werden diese Schutzfunktionen umgangen, steigt die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung stark an. Das Onkogen *c-Myc* kann dann bei der Krebsentwicklung mit anderen Gendefekten kooperieren.

Für die Entwicklung einer c-Myc-induzierten Krebserkrankung ist allerdings das Nichtfunktionieren der p53-abhängigen bzw. unabhängigen Schutzmechanismen nicht zwingend erforderlich. Vielmehr genügt hierfür, wie von Luo, Li et al. am Beispiel eines *Myc*-AML-Mausmodells demonstriert, eine Überexpression von *c-Myc*. Bei diesem Mausmodell führte die *c-Myc*-Überexpression trotz des funktionierenden Schutzmechanismus der Zelle in Gestalt eines intakten Arf-p53-Signalweges bzw. einer normalen *Bcl-2*-Expression bei allen Mäusen zur Ausbildung einer AML (Luo, Li et al. 2005).

Für das Verstehen der Entwicklung von Krebserkrankungen ist die Entdeckung von dafür mitverantwortlichen Kooperationspartnern von c-Myc, welche z.B. aus Untersuchungen an  $\epsilon\mu$ -Myc-Mäusen bekannt wurden, von großer Bedeutung. So bewirkte der Synergismus zwischen c-Myc und *Bcl-2* bei Mäusen, die neben *c-Myc* zusätzlich *Bcl-2* überexprimierten, eine kürzere Latenzzeit der Erkrankung und die Entwicklung einer Leukämie an Stelle eines Lymphoms (Strasser, Harris et al. 1990). Auch bei den Untersuchungen von Luo, Li et al. zeigte sich, dass im Vergleich zu der reinen *c-Myc*-Überexpression, die eine eindeutig und konstant auftretende myeloische Erkrankung auslöste, eine zusätzliche Mutation, wie die Deaktivierung des p53-Arf-Signalwegs oder die zusätzliche Überexpression von *Bcl-2* nicht nur zum schnelleren Auftreten der Erkrankung, sondern gleichzeitig auch zur Veränderung des klinischen, immunphänotypischen und histologischen Bildes der Erkrankung führte. Sowohl die *Ink4a*<sup>-/-</sup> Mäuse als auch die MSCV *Myc*+*Bcl-2* Mäuse entwickelten zusätzlich zur Splenomegalie und Parese der Hinterbeine eine Leukozytose im peripheren Blut sowie eine

Lymphadenopathie und Thymusvergrößerung. Histologisch und immunphänotypisch zeigten sich im Knochenmark zwei maligne Zellpopulationen, von denen die eine myeloblastische, die andere lymphoblastische Charakteristika aufwies (Luo, Li et al. 2005).

Die Bedeutung der Störung des Arf-p53-Signalweges für die c-Myc-induzierte Tumorgenese wurde im Übrigen schon durch andere, frühere Experimente an E $\mu$ -Myc-Mäusen deutlich. Dabei zeigte sich, dass bei 28% der c-Myc-induzierten E $\mu$ -Myc-Lymphome zusätzlich ein Verlust der p53-Funktion und bei weiteren 24% ein Verlust der Arf-Funktion auftrat (Eischen, Weber et al. 1999). Damit übereinstimmend ergaben Untersuchungen an Biopsiematerial von humanen Burkitt-Lymphomen in 30% der Fälle einen p53-Verlust (Bhatia, Gutierrez et al. 1992). Kausal bzw. mitursächlich für die Umgehung bzw. die Störung der Schutzmechanismen der Zelle sind molekulargenetische Ereignisse wie beispielsweise Mutationen oder Translokationen (Eischen, Weber et al. 1999; Schmitt, McCurrach et al. 1999; Lindstrom, Klangby et al. 2001; Meyer, Kim et al. 2006).

c-Myc reguliert den Zellzyklus und wirkt dabei über Zielgene wie z.B. *Cyclin D2* (Bouchard, Dittrich et al. 2001), *Cdk4* (Menssen and Hermeking 2002) oder *Gadd 45* (Marhin, Chen et al. 1997; Barsyte-Lovejoy, Mao et al. 2004). Ein weiteres wichtiges Zielgen von c-Myc ist *Cyclin B1*. Es entfaltet seine proliferative Wirkung am G<sub>2</sub>/M-Übergang (Menssen and Hermeking 2002) und ist von entscheidender Bedeutung für den Eintritt der Zelle in die Mitose. An der Regulation dieses wichtigen Schrittes ist unter anderem auch die Ubiquitinligase SCF<sup>Nipa</sup> beteiligt (Ouyang, Bai et al. 2003; Bassermann, von Klitzing et al. 2005).

Während *Cyclin B1* ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors c-Myc darstellt (Yin, Grove et al. 2001; Menssen and Hermeking 2002), übernimmt das nukleäre Protein Nipa eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen und posttranslationalen Kontrolle nukleärer Cyclin B1 Konzentrationen. Der SCF<sup>Nipa</sup>-Komplex ubiquitiniert Cyclin B1 während der Interphase und gibt es damit zum Abbau durch das Proteasom frei. Zur Mitte der G<sub>2</sub>-Phase hin wird der SCF<sup>Nipa</sup>-Komplex inaktiviert, so dass die Ubiquitinierung nicht mehr erfolgen kann. Die Inaktivierung des SCF<sup>Nipa</sup>-Komplexes ist ein wichtiger Mechanismus, der zum Anstieg der Cyclin B1-Konzentration im Nukleus führt und damit den Übergang der Zelle in die Mitose ermöglicht. (Bassermann, von Klitzing et al. 2005)

Während das Fehlen von c-Myc zu einer Verlängerung der G<sub>2</sub>-Phase führt und damit einen verspäteten Eintritt der Zelle in die Mitosephase bewirkt (Mateyak, Obaya et al. 1997), veranlasst der Verlust von Nipa die Zelle in vitro zu einem vorzeitigen Eintritt in die Mitosephase (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Umgekehrt ist bekannt, dass c-Myc durch vermehrte Expression von *Cyclin B1* den Zellzyklus antreibt und die Proliferation steigern kann (Meyer and Penn 2008), wohingegen eine fehlende Deaktivierung der SCF<sup>Nipa</sup>-Funktion einen langsameren nukleären Cyclin B1-Anstieg und damit einen verzögerten

Mitoseeintritt bzw. eine Verlängerung des Zellzyklus zur Folge hat (Bassermann, von Klitzing et al. 2005).

Da sowohl c-Myc als auch Nipa eine regulatorische Wirkung auf Cyclin B1 ausüben und dessen intrazelluläre Verteilung von entscheidendem Einfluss auf den G<sub>2</sub>/M-Übergang ist (Hagting, Karlsson et al. 1998; Yang, Bardes et al. 1998; Hagting, Jackman et al. 1999), stellte sich die Frage, ob eine Änderung in der Funktionalität von SCF<sup>Nipa</sup> Einfluss auf die c-Myc-induzierten Zellzyklusveränderungen und damit die c-Myc-induzierte Tumorgenese nehmen könnte.

Während ein indirekter Einfluss zwischen c-Myc und Nipa auf Grund ihrer beider Wirkung auf ein und dasselbe Protein als sehr wahrscheinlich gelten konnte, sollte unter anderem auch die Möglichkeit untersucht werden, ob c-Myc und Nipa auch auf direktem Wege aufeinander einwirkten. Im Hinblick auf die große Anzahl an Genen, bei denen c-Myc als Transkriptionsfaktor agiert und auf Grund der Tatsache, dass auch eine Regulation der Nipa-Funktion dem Wirkschema von c-Myc sehr gut entspräche, erschien ein direkter Einfluss von c-Myc auf *Nipa*/Nipa plausibel. c-Myc würde damit nicht nur über die Expression von *Cyclin B1* direkten Einfluss auf die Cyclin B1-Konzentration nehmen, sondern auf diese auch indirekt über Nipa posttranskriptionell oder posttranslational einwirken bzw. über Nipa die Verteilung von Cyclin B1 auf die verschiedenen Zellkompartimente regulieren. Für den Fall, dass c-Myc *Nipa* transkriptionell beeinflusst, erschienen potentiell zwei Regulationsszenarien möglich:

1. c-Myc induziert die Expression von *Nipa*. Vermehrte Nipa-Konzentrationen würden im Nukleus zu einer gesteigerten Ubiquitinierung von Cyclin B1 führen. In der Folge würde der Anstieg der nukleären Cyclin B1 Konzentrationen nur verlangsamt erfolgen und damit den G<sub>2</sub>/M-Übergang hinauszögern. Damit würde c-Myc die gesteigerte Expression von *Cyclin B1* auf posttranslationaler Ebene antagonisieren und einer gesteigerten Proliferation entgegenwirken. In diesem Fall wäre die c-Myc-*Nipa* Interaktion gleichsam als eingebauter Selbstschutz für die Zelle zu deuten, der die Zelle vor der Wirkung der c-Myc-Überexpression auf den G<sub>2</sub>/M-Übergang gänzlich schützen oder diese Wirkung zumindest reduzieren und somit die Gefahr der malignen Transformation verringern soll.
2. *Nipa* wird durch c-Myc supprimiert. Geringere Nipa-Konzentrationen würden im Nukleus zu einer verringerten Ubiquitinierung von Cyclin B1 während der Interphase führen. In der Folge käme es zu einem rascheren nukleären Konzentrationsanstieg von Cyclin B1, der dann einen verfrühten G<sub>2</sub>/M-Übergang mit den Konsequenzen einer beschleunigten Proliferation und einer erhöhten Genominstabilität auslösen könnte. Auf diese Weise könnte c-Myc nicht nur transkriptionell für eine erhöhte Cyclin B1-Konzentration in der Zelle sorgen, sondern zugleich durch Suppression von *Nipa* auch die für den G<sub>2</sub>/M-Übergang entscheidende, zelluläre Verteilung der Cyclin

B1-Konzentrationen beeinflussen. Dies würde die proliferative Wirkung von c-Myc verstärken, was mit der Wirkungsweise von c-Myc gut in Einklang gebracht werden könnte.

Die Ergebnisse der RT-PCR an humanen Lymphomzellen und von MEF's, die mit einem *Myc-ER* System ausgestattet waren, ließen eine Regulation von *Nipa* durch c-Myc auf transkriptioneller Ebene, sei sie direkt oder indirekt als unwahrscheinlich erscheinen (Abb.4). Während die relative RT-PCR mit Zellmaterial aus 14 humanen Burkitt-Lymphomen erwartungsgemäß eine konstant vorhandene Überexpression von *c-MYC* und dementsprechend auch von *CYCLIN B1* in den Lymphomzellen zeigte (Yin, Grove et al. 2001; Menssen and Hermeking 2002), waren die relativen Expressionen von *NIPA* in den Zellen der verschiedenen Burkitt-Lymphome mit Werten von stark erhöht bis zu erniedrigt sehr unterschiedlich. Da die Resultate keine einheitliche Tendenz weder in Bezug auf eine Induktion noch auf eine Suppression der relativen Expressionen von *NIPA* erkennen ließen, war eine Regulation der *NIPA*-Expression durch *c-MYC* als unwahrscheinlich anzusehen. Ein ähnliches Ergebnis hatte bereits die von Herrn PD Dr. Ulrich Keller durchgeführte semiquantitative RT-PCR mit Material aus MEFs ergeben, die mit dem induzierbaren *Myc-ER*-System versehen worden waren. Die Induktion von *c-Myc* führte lediglich zu einem leichten Anstieg der relativen *Nipa*-Expression bei den mit HT-4 behandelten MEFs. Eine Signifikanz konnte dabei aber nicht festgestellt werden. Eine transkriptionelle Beeinflussung von *Nipa* durch c-Myc war demnach nicht nachweisbar.

Eine Aussage über eine mögliche posttranskriptionelle Regulation von *Nipa* durch c-Myc konnte hier nicht getroffen werden, da der Versuch, die relativen Proteinkonzentrationen von *Nipa* mit Hilfe von Westernblots zu ermitteln trotz mehrfacher Versuche nicht gelang. In dem konditionellen *c-MYC*-System der P493-6 Zellen zeigte sich lediglich erneut die wichtige Rolle, die *c-MYC* für die Regulation der Proliferation und der *CYCLIN B1*-Konzentrationen der Zelle spielt. Erst nach Aktivierung der *c-MYC*-Expression traten messbare Konzentrationen des Proteins *CYCLIN B1* auf (Abb. 4). Bei den Zellen, die keine *c-MYC*-Expression und keine messbaren *CYCLIN B1*-Konzentrationen aufwiesen, war demzufolge keine Proliferation feststellbar.

Dennoch kann eine posttranskriptionelle bzw. posttranslationale Regulation von *Nipa* durch c-Myc nicht ausgeschlossen werden. So könnte c-Myc z.B. auf die Halbwertszeit der bei der Transkription entstehenden mRNA von *Nipa* oder auch auf die Halbwertszeit des Proteins *Nipa* selbst Einfluss nehmen. Dadurch wäre gleichfalls eine Regulation in beide Richtungen denkbar. Eine Verkürzung der Halbwertszeit der mRNA würde mit einer verringerten Translation von *Nipa* einhergehen, während die Verkürzung der Halbwertszeit von *Nipa* selbst eine verkürzte Wirkdauer des Proteins bedeutete. In beiden Fällen wäre ein schnellerer Anstieg nukleärer Cyclin B1-Level mit den daraus resultierenden Folgen eines vorzeitigen Mitoseeintritts vorstellbar. Umgekehrt könnte die Verlängerung der Halbwertszeit

der mRNA zu einer verstärkten Translation von *Nipa* führen bzw. die Verlängerung der Halbwertszeit von *Nipa* eine entsprechend längere Wirkdauer des Proteins auslösen. Dies wiederum könnte eine Verzögerung des Mitoseeintritts zur Folge haben.

Diese Überlegungen lassen es für sinnvoll erscheinen, die relativen *Nipa*-Konzentrationen in der Zelle und mögliche Veränderungen durch *c-Myc*-Überexpression mit Hilfe eines geeigneten Antikörpers für den Westernblot in einer gesonderten Untersuchung außerhalb der vorliegenden Arbeit weiter zu untersuchen.

Unabhängig von einer Regulation von *Nipa* durch *c-Myc* spielen indessen beide Proteine bei der Regulation von Cyclin B1 und des Zellzyklus eine wichtige Rolle. Bei einer Störung der normalen Regulation von *Nipa* galt deshalb ein Effekt auf die *c-Myc*-induzierte Krebsentstehung als sehr wahrscheinlich (Abb. 2). Der Frage, welche Auswirkung ein Verlust der SCF<sup>*Nipa*</sup>-Funktion auf die *c-Myc*-induzierte Krebsentstehung haben und welche Form sie annehmen würde, wurde unter Zuhilfenahme des *Myc*-AML-Mausmodells (Luo, Li et al. 2005) nachgegangen.

Die erste Transplantation, die ausschließlich mit Knochenmarkszellen vom *Nipa*<sup>+/+</sup> Genotyp durchgeführt wurde, diente der Etablierung des beschriebenen Mausmodells. Wie bei Luo, Li et al. entwickelten sämtliche mit dem *c-Myc*-überexprimierenden Knochenmark transplantierten Mäuse ca. 50 Tage nach Transplantation eine myeloische Erkrankung vom Typ einer AML mit Ausreifung ohne Leukozytose, wohingegen die mit normalem Knochenmark transplantierten Mäuse keinerlei Krankheitszeichen zeigten (Abb. 6 - 12).

Beim wöchentlich kontrollierten Blutbild fiel bei der MIG *c-Myc* Gruppe eine Besonderheit auf. Die Thrombozytenzahlen der MIG *c-Myc* Gruppe waren konstant niedriger als die der MIG Gruppe (Abb. 5B). Während die Anzahl an Thrombozyten bei der MIG Gruppe stark schwankte, jedoch stets über den Zahlen der MIG *c-Myc* Gruppe lag, differierten die Blutplättchenwerte bei der MIG *c-Myc* Gruppe kaum. Dabei wiesen die Unterschiede zwischen den jeweiligen Summen der im Beobachtungszeitraum bei den beiden Gruppen gewonnenen Messergebnisse eine Signifikanz auf ( $p < 0,05$ ). Der hier beschriebenen Auffälligkeit sollte gegebenenfalls mit Hilfe größerer Versuchszahlen weiter nachgegangen werden, um eine noch genauere Aussage zur Signifikanz der Unterschiede treffen zu können.

Eine mögliche Erklärung für die niedrigeren Thrombozytenzahlen bei der MIG *c-Myc* Gruppe könnte die Verdrängung anderer hämatopoetischer Zelllinien im Knochenmark durch die expandierende myeloische Zellpopulation sein. Dies würde mit den von Luo, Li et al. beschriebenen histologischen Befunden korrelieren, die von einem mit Myeloblasten vollgepackten Knochenmark sprachen (Luo, Li et al. 2005). Andererseits ist die Auswirkung einer *c-Myc*-Überexpression auf die Megakaryogenese nicht zu unterschätzen. Während hierzu einige Untersuchungen eine positive Rolle von *c-Myc* für die Proliferation der Megakaryozyten beschrieben (Thompson, Zhang et al. 1996; Thompson, Zhao et al. 1996),

zeigten andere Forschungsergebnisse bei *c-Myc*-defizienten Mäusen höhere Thrombozytenzahlen als bei den Kontrolltieren (Guo, Niu et al. 2009). Zur Auflösung dieser durchaus widersprüchlichen Ergebnisse könnten neuere Untersuchungsdaten beitragen, wonach die strenge Regulation der *c-Myc*-Expression der entscheidende Faktor für den korrekten Ablauf der Thrombozytopoese ist (Takayama, Nishimura et al. 2010). Dabei erwies sich nicht nur die anfängliche Steigerung der *c-Myc*-Expression als sehr wichtig für eine geregelte Thrombozytopoese sondern auch die darauf folgende Reduktion der *c-Myc*-Expression in den Megakaryozyten. Dies erkennt man daran, dass eine konstant starke *c-Myc*-Expression zu einer verringerten Thrombozytenproduktion durch die Megakaryozyten führte (Takayama, Nishimura et al. 2010). Es ist gut möglich, dass die niedrigen Thrombozytenwerte bei der MIG *c-Myc* Gruppe die Folge der Kombination der beiden beschriebenen Effekte der *c-Myc*-Überexpression nämlich die Verdrängung der Vorläuferzellen der Megakaryozyten durch die expandierende myeloische Zellpopulation und die fehlende Reduktion der *c-Myc*-Expression ist.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Luo, Li et al., wiesen die Mäuse mit *c-Myc*-Überexpression keine bzw. keine ausgeprägte Leukozytose im peripheren Blut auf. Auch die Hämoglobin- und Erythrozytenwerten unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht, was ggf. gegen die Theorie einer Verdrängung der hämatopoetischen Zelllinien durch die expandierende myeloische Zellpopulation spricht.

Des Weiteren fiel bei den FACS-Untersuchungen des peripheren Blutes auf, dass bei der Gruppe der *c-Myc*-überexprimierenden Mäuse eine Verschiebung der Zellpopulationen von den normalerweise dominierenden lymphatischen Zellen hin zu einer sehr großen myeloischen Zellpopulation erfolgt war. Dies spricht für die Entstehung einer malignen myeloischen Erkrankung (Abb. 6B und C). Dementsprechend waren die Anteile an B220<sup>+</sup> und EGFP<sup>+</sup> Zellen in der MIG Gruppe im Vergleich zur MIG *c-Myc* Gruppe signifikant höher. Bei den *c-Myc*-überexprimierenden Mäusen fanden sich indessen an Tag 49 nach der Transplantation im peripheren Blut signifikant höhere Anteile an GR-1<sup>+</sup> und EGFP<sup>+</sup> Zellen. Entsprechende Veränderungen ergaben sich auch aus den FACS-Analysen des Knochenmarks und der Milz.

Die hier festgestellten, auffallenden Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sowohl beim peripheren Blut, beim Knochenmark als auch im Milzgewebe sind mit den Untersuchungsergebnissen von Luo, Li et al. vereinbar, die bei Ihren FACS-Analysen von einer dominanten GR-1<sup>+</sup> Zellpopulation und einem deutlich verringerten Anteil B220<sup>+</sup> Zellen des Knochenmarks der *c-Myc*-überexprimierenden Mäuse berichten (Luo, Li et al. 2005). Signifikante Unterschiede bei den CD11b<sup>+</sup> und EGFP<sup>+</sup> Zellen konnten hier im Gegensatz zu den Ergebnissen von Luo, Li et al. nicht festgestellt werden.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Aussagen zum Vorliegen der Signifikanz der Ergebnisse auf Grund der kleinen Fallzahl und einer aus dem Rahmen

fallenden MIG *c-Myc* Maus nur eingeschränkt möglich war. Der „Maussonderling“ zeigte zwar die gleichen Symptome wie die anderen Tiere dieser Gruppe sowie eine stark vergrößerte Milz, jedoch waren bei ihm im peripheren Blut die Prozentsätze EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen deutlich niedriger als bei den übrigen Tieren der MIG *c-Myc* Gruppe.

Die Beobachtungen an den hier explorierten Mäusen stimmten insgesamt mit den Untersuchungsdaten der Mausgruppe von Luo, Li et al. überein, deren erkrankte Tiere weder eine Mutation des p53-Arf-Signalweges noch eine Überexpression von *Bcl-2* aufwiesen (Luo, Li et al. 2005). Demnach ist festzustellen, dass bei *c-Myc*-überexprimierenden Mäusen allein die *c-Myc*-Überexpression in 100% der Fälle zum Ausbruch der myeloischen Leukämie führt. Die bei dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen annehmen, dass die jeweilige absolute Anzahl an transplantierten *c-Myc*-überexprimierenden Zellen keine entscheidende Rolle für die Latenzzeit der Erkrankung spielt. Alle Mäuse der ersten Transplantation, gleich ob mit 100.000, 200.000 oder 400.000 EGFP<sup>+</sup> Zellen transplantiert, wurden innerhalb von 72 h, nachdem die erste Maus Krankheitszeichen aufwies, symptomatisch. Fraglich ist allerdings, ob dasselbe auch für den jeweiligen Prozentanteil an *c-Myc*-überexprimierenden Zellen gilt. Die Transplantation wurde mit hohen, ca. 50% betragenden Anteilen an *c-Myc*-überexprimierenden Zellen durchgeführt. Das Ergebnis der 2. Transplantation legt nahe, dass niedrigere oder höhere Prozentanteile an *c-Myc*-überexprimierenden Zellen Einfluss auf die Latenzzeit haben. Dabei wurden die Mäuse der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe mit 60% *c-Myc*-überexprimierenden Zellen transplantiert und zeigten ihre Krankheitszeichen signifikant ( $p < 0,05$ ) früher (Median 33,5 d) verglichen mit den *c-Myc*-überexprimierenden Mäusen der ersten Transplantation (Median 50 d). Die Richtigkeit dieser Vermutung oder ob die frühere Erkrankung der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäuse durch andere Faktoren verursacht wurde kann nur durch weitere Transplantationsversuche verifiziert werden.

Für die Bearbeitung der zentralen Fragestellung dieser Arbeit wurde eine weitere Transplantation mit einer *c-Myc*-überexprimierenden *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup> Gruppe sowie je einer Kontrollgruppe mit *Nipa*<sup>+/+</sup> bzw. *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark durchgeführt. Dabei ergaben sich zunächst ähnliche Ergebnisse wie bei der ersten Transplantation.

So zeigten auch bei der zweiten Transplantation die Blutbilder bei den *c-Myc*-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen geringere Thrombozytenzahlen (Abb. 12). Die Unterschiede bei den Thrombozytenwerten zwischen der Gruppe *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* bzw. *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* und deren jeweiliger Kontrollgruppe bezüglich der einzelnen Untersuchungstage waren nicht immer signifikant. Größere Fallzahlen könnten eine fundierte Aussage zur Signifikanz bieten. Was die Unterschiede zwischen den beiden *c-Myc* Gruppen angeht, sind die gegenüber der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe signifikant niedrigeren Thrombozytenzahlen bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe hervorzuheben, die im einen Fall einen einzelnen Untersuchungstag (Tag 34 nach Transplantation) und im anderen Fall die Summe

der über den gesamten Beobachtungszeitraum gewonnenen Werte betrafen. Diese Ergebnisse könnten einerseits für eine langsamere Verdrängung des normalen Knochenmarks durch die malignen myeloischen Zellen bei den Mäusen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe sprechen, andererseits ist bei diesen Feststellungen auch an einen Zusammenhang mit der Rolle von *Nipa* bei der Proliferation der Progenitorzellen der Megakaryozyten zu denken. Während die konstante *c-Myc*-Überexpression alleine zu einer geringeren Thrombozytenproduktion führt, könnte der Funktionsverlust von SCF<sup>*Nipa*</sup> die Proliferation der Megakaryozyten derart verstärken, dass es trotz der konstanten *c-Myc*-Überexpression zu einer vermehrten Thrombozytenproduktion in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe kommt. Weitere Versuche und größere Fallzahlen sind notwendig, um die festgestellten Unterschiede zu untermauern und den dahinterliegenden Mechanismus aufzudecken (Takayama, Nishimura et al. 2010).

Nach den beiden Transplantationen zeigte sich bei den Blutbildern der *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen neben den Unterschieden bei den Thrombozytenwerten ein schnellerer Anstieg der Leukozyten, deren Werte von den Kontrollmäusen erst 2 – 3 Wochen nach Transplantation aufgeholt wurden. Während der Anstieg der Leukozytenwerte bei der ersten Transplantation bei der *c-Myc*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant schneller ablief, wiesen bei der zweiten Transplantation beide *c-Myc*-Gruppen gegenüber den Kontrollmäusen zunächst signifikant höhere Leukozytenzahlen auf. Diese Resultate könnten für eine schnellere Rekonstitution des Knochenmarks bei den *c-Myc*-Gruppen und für einen *c-Myc*-induzierten Proliferationsvorteil sprechen, der sich bei den Kontrollgruppen nach Abschluss der Rekonstitution des Knochenmarks ca. 2 – 3 Wochen nach Transplantation wieder ausgleicht. Während die Ergebnisse der Leukozytenwerte bei den beiden *c-Myc*-Gruppen nach der zweiten Transplantation an den einzelnen Untersuchungstagen trotz vereinzelt auftretender Leukozytosen bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den *c-Myc* Gruppen aufwiesen, erbrachte der Vergleich der Summen der Leukozytenwerte, die bei beiden *c-Myc* Gruppen jeweils über den gesamten Untersuchungszeitraum gemessen wurden, bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe signifikant höhere Werte (Abb. 12). Auch hier ist festzuhalten, dass die Signifikanz der Ergebnisse auf Grund der geringen Fallzahlen und der zum Teil großen Streuung bei den Werten innerhalb der Gruppen nur eine beschränkte Aussagekraft besitzt und durch eine quantitative Steigerung der Versuche bestätigt werden muss.

Die auch bei der zweiten Transplantation durchgeführten FACS-Analysen des peripheren Blutes beider *c-Myc*-überexprimierender Gruppen zeigten in der symptomfreien Zeit wie bei der ersten Transplantation die deutliche Verschiebung der Leukozytenuntergruppen im Sinne einer dominanten myeloischen Population (Abb. 13). Dementsprechend entwickelten beide *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen, unabhängig von ihrem *Nipa*-Genotyp, in 100% der

Fälle die von Luo, Li et al. 2005 beschriebene myeloische Erkrankung mit denselben Symptomen, die bei der ersten Transplantation aufgetreten waren. Hingegen wiesen die beiden Kontrollgruppen wie schon die Kontrollgruppe bei der ersten Transplantation keinerlei Symptome einer Erkrankung auf. Bei der *c-Myc*-Maus führte der zusätzliche *Nipa*-Knockout, anders als die Kompromittierung der Apoptose bei der MSCV *Myc+Ink4a*<sup>-/-</sup> Maus oder bei der MSCV *Myc+Bcl-2* Maus von Luo, Li et al. nicht zu einer Veränderung des immunphänotypischen oder histologischen Bildes der Erkrankung.

Allerdings bestanden zwischen der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe bezüglich der Dauer der Latenzzeit der Tumorerkrankung signifikante Unterschiede. Während die Mäuse der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe nach 33,5 Tagen (Median) symptomatisch wurden, traten bei den Tieren der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe erst nach 53 Tagen (Median) entsprechende Krankheitszeichen auf (Abb. 15A). Dieser Unterschied deutet auf eine wichtige Rolle der SCF<sup>Nipa</sup> Funktion bei der *c-Myc*-induzierten Krebsentstehung hin.

Der Verlust des Proteins *Nipa* scheint keinen Einfluss auf die Art der malignen Erkrankung zu haben und kann die Erkrankung nicht verhindern, jedoch bewirkt der Verlust von *Nipa* eine deutliche Verlängerung der Latenzzeit und hat damit einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Erkrankung. Der zusätzlich zur *c-Myc*-Überexpression auftretende Verlust der Regulationseinheit SCF<sup>Nipa</sup> scheint demnach zunächst einen protektiven Effekt auf die Integrität der *c-Myc*-überexprimierenden Zellen auszuüben, der allerdings im weiteren Verlauf umgangen werden kann.

Die Beobachtungen zur unterschiedlichen Dauer der Latenzzeit bei den beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen werfen die Frage auf, wie es zu einer Verlängerung der Latenzzeit kommen kann, obwohl die genetischen Veränderungen, die *c-Myc*-Überexpression und der *Nipa*-Knockout, auf den ersten Blick einen proliferationsfördernden Effekt auf die Zelle haben müssten. *c-Myc* wirkt über die Induktion der *Cyclin B1*-Expression proliferationsfördernd (Menssen and Hermeking 2002). Der *Nipa*-Knockout führt zum Verlust der SCF<sup>Nipa</sup> Funktion und damit zu einem entsprechend früheren Anstieg der nukleären *Cyclin B1*-Konzentrationen, die wiederum einen beschleunigenden Effekt auf den G<sub>2</sub>/M-Übergang haben (Bassermann, von Klitzing et al. 2005) und damit einen ebenfalls proliferationsfördernden Effekt auf die Zelle erwarten lassen. Die Kombination der beiden Veränderungen legt eine verstärkte Proliferation der betroffenen Zellen nahe, was auf den ersten Blick zu einer verkürzten Latenzzeit führen müsste. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Eine mögliche Erklärung für die zeitliche Verzögerung des Auftretens der Krankheitssymptome könnte das Vorliegen eines Zellzyklusarrests sein, wie er bereits in vitro bei mit siRNA gegen *Nipa* behandelten HeLa Zellen beschrieben ist. Der *Nipa*-Verlust löste in diesen Zellen einen früheren Eintritt in die Mitosephase aus, ging allerdings auch mit einem Zellzyklusarrest in der Prometaphase einher (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Der bei den behandelten HeLa Zellen beschriebene Zellzyklusarrest muss indessen in vivo

überwindbar oder komplett vermeidbar sein, da *Nipa*-Knockout Mäuse zwar unfruchtbar und kleiner als ihre *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>+/-</sup> Geschwistertiere, jedoch dennoch überlebensfähig sind (Illert, Fritz et al. 2008; Illert, Kawaguchi et al. 2012). Die Überexpression von *c-Myc* allein führt in den betroffenen Zellen zur Apoptose oder sensibilisiert sie zumindest für andere apoptotische Reize (Evan, Wyllie et al. 1992). Dass eine Kombination der beiden genetischen Veränderungen ebenfalls zur Aktivierung von Schutzmechanismen in den betroffenen Zellen führt, wäre somit durchaus nachvollziehbar. Dies insbesondere, da beide Proteinprodukte an der Regulation der Cyclin B1- bzw. der MPF-Konzentration beteiligt sind und damit auf eine der wichtigsten Zellzyklusphasen, nämlich den G<sub>2</sub>/M-Übergang, Einfluss nehmen. Somit wäre es durchaus möglich, dass die Kombination aus *c-Myc*-Überexpression und *Nipa*-Funktionsverlust durch einen vorzeitigen und raschen Cyclin B1-Anstieg über einen Zellzykluskontrollpunkt eine wesentlich stärkere proapoptotische bzw. zellzyklusarretierende Wirkung auf die Zellen ausübt, als es die Apoptosesensibilisierung durch die reine Überexpression von *c-Myc* oder die Aktivierung des Zellzyklusarrests durch einen *Nipa*-Verlust allein bewirken könnten. Ein solcher zusätzlich aktivierter Schutzmechanismus könnte damit die Verlängerung der Latenzzeit in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe erklären. Wenn man diese Hypothese weiterverfolgt, kann dieser Zellzykluskontrollpunkt auf längere Sicht aber nicht ausreichend sein, um die Entwicklung der Erkrankung zu verhindern. Da alle Mäuse der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe erkranken, muss es einen Weg geben wie die malignen Zellen diesen Zellzykluskontrollpunkt umgehen können.

Eine andere Erklärung für die Verlängerung der Latenzzeit der AML bei den Mäusen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe könnte der unkontrollierte Übergang in die Mitosephase mit nachfolgender mitotischer Katastrophe sein. Bei den Mäusen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe wirken zwei beschleunigende Faktoren auf den Zellzyklus. Die *c-Myc*-Überexpression allein entfaltet ihr neoplastisches Potential durch die Steigerung der Proliferationsfähigkeit der Zelle (Dang 1999). Sie beschleunigt z.B. den G<sub>1</sub>/S-Übergang (Meyer and Penn 2008) und sorgt für eine gesteigerte Expression von *Cyclin B1* (Menssen and Hermeking 2002). Durch den *Nipa*-Verlust fällt zudem die Funktion der Ubiquitinligase SCF<sup>Nipa</sup> aus. Dies ermöglicht zusätzlich zu den erhöhten Cyclin B1-Konzentrationen einen vorzeitigen und übermäßigen Konzentrationsanstieg des MPF im Nukleus und damit eine vorzeitige Auslösung der Mitose (Bassermann, von Klitzing et al. 2005). Der somit beschleunigte G<sub>2</sub>/M-Übergang könnte verhindern, dass die Schutzmechanismen der Zelle die DNA auf Schäden überprüfen und einen Zellzyklusarrest einleiten können um diese zu reparieren. Die Stabilität des Genoms wäre massiv gefährdet. Die Zelle würde mit den angehäuften Schädigungen in die M-Phase eintreten und die mitotische Katastrophe in Form der Apoptose auslösen (Latif, den Elzen et al. 2004). Trifft diese Hypothese zu, so könnte der eigentlich unerwünschte vorzeitige G<sub>2</sub>/M-Übergang die Zelle vor der Entartung schützen, indem er die Zelle direkt in die mitotische

Katastrophe führt und somit jegliche Chance auf Ansammlung und Weitergabe maligner Mutationen unterbindet.

Auf dem G<sub>2</sub>/M-Übergang liegt schon seit längerem das Augenmerk der Forschung. Dies insbesondere deshalb, weil man sich durch seine Beeinflussung auch eine erfolgreiche Therapie von p53-defizienten Tumorzellen erhofft (Bucher and Britten 2008). Das Prinzip dieser Therapien ist durchaus ähnlich dem Effekt, der der Verlängerung der Latenzzeit der AML in den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen zu Grunde liegen könnte. Im Zentrum dieser Forschung steht das Protein Chk1, das entscheidend auf den G<sub>2</sub>/M-Übergang einwirken kann und dessen Wirkprinzip bereits unter 2.3 erörtert wurde. Das Protein Chk1 wird durch Atm-Proteine, die DNA-Schäden aufspüren, in der G<sub>2</sub>-Phase aktiviert und bewirkt, dass sich der MPF im Nukleus nicht ansammeln kann. Dadurch geht die Zelle nicht in die M-Phase über und kann die während der S-Phase entstandenen DNA-Schäden reparieren (Kuntz and O'Connell 2009). Wenn die aufgetretenen Schäden reparabel sind, kann sich die Zelle durch diesen Aufschub des G<sub>2</sub>/M-Übergangs vor der mitotischen Katastrophe retten. Von diesem Mechanismus profitiert aber nicht nur die normale Körperzelle, sondern auch die entartete Tumorzelle. Denn auch in den Tumorzellen werden grobe DNA-Schäden durch die Reparaturmechanismen am G<sub>2</sub>/M-Übergang repariert, die sonst möglicherweise zur Apoptose geführt hätten. Dass dieser Mechanismus in der Tat auch für die Tumorzelle eine wichtige Rolle spielt, zeigt sich unter anderem daran, dass der beschriebene Mechanismus auch in Tumorzellen nur selten durch Mutationen ausgeschaltet wird (Kuntz and O'Connell 2009). Gelingt es, diesen Reparatur- bzw. Verzögerungsmechanismus in der Tumorzelle zu stören, wäre mit einer deutlich stärkeren Sensibilität der Zellen auf eine Zytostatika- oder Bestrahlungstherapie zu rechnen (Powell, DeFrank et al. 1995). Letzteres scheint unter anderem durch Chk1-Inhibitoren möglich zu sein (Bucher and Britten 2008). Ohne ein funktionierendes Chk1 kann der MPF nicht daran gehindert werden, sich im Nukleus anzusammeln. Die Zelle, deren DNA durch verschiedene Stoffe geschädigt wurde, geht also in die Mitose über, ohne die etwa vorhandenen Schäden zuvor repariert zu haben. Auf Grund der nicht reparierten Schäden kommt es zur Apoptose bzw. zur mitotischen Katastrophe (Bucher and Britten 2008; Kuntz and O'Connell 2009). Eine ähnliche Wirkung wie für den Funktionsverlust von Chk1 wäre für den Funktionsverlust von *Nipa* denkbar. Auch hier könnte es zu einem vorzeitigen G<sub>2</sub>/M-Übergang kommen, der die Reparaturmechanismen an diesem Zellzykluskontrollpunkt durchaus beeinträchtigen und in der Konsequenz in die mitotische Katastrophe führen könnte. Wie die Aktivierung eines Zellzykluskontrollpunktes am G<sub>2</sub>/M-Übergang könnte auch diese Hypothese die Verlängerung der Latenzzeit der AML bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen erklären.

Ob der zusätzliche Funktionsverlust von SCF<sup>*Nipa*</sup> den Zellzykluskontrollpunkt am G<sub>2</sub>/M-Übergang aktiviert und dort den Zellzyklusarrest oder die Apoptose auslöst oder, ob er den G<sub>2</sub>/M-Übergang beschleunigt und die Zelle zum vorzeitigen Eintritt in die M-Phase veranlasst

und deshalb zur Apoptose führt oder, ob er einen völlig anders gearteten Schutzmechanismus aktiviert, bleibt zu klären. Festzuhalten ist indessen, dass ein potentieller, wie auch immer gearteter, Schutzmechanismus umgangen werden konnte bzw., dass der Schutzmechanismus nicht ausreichte, um die Hyperproliferation der Zelle und damit die Erkrankung der Mäuse zu verhindern. Dies wird aus dem Umstand abgeleitet, dass alle Mäuse der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe die Erkrankung erst später entwickelten, jedoch dennoch eindeutig dieselbe Erkrankung wie die Mäuse der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe aufwiesen.

Neben der verlängerten Latenzzeit bei den Mäusen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe gibt es weitere Hinweise zur Untermauerung der Theorie, dass die *c-Myc*-Überexpression und der *Nipa*-Verlust gemeinsam einen Zellzyklusarrest bzw. die Apoptose am G<sub>2</sub>/M-Übergang einleiten. Die beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen zeigten, wie schon erwähnt, bei der ersten FACS-Analyse des peripheren Blutes ca. 2 Wochen nach der Transplantation einen nahezu gleich hohen Prozentanteil EGFP<sup>+</sup> Zellen, der in den darauf folgenden 2 Wochen bei den Mäusen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe schneller abfiel als bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe (Abb. 13 (A)). Als Ursachen für diese Beobachtung kommen eine verstärkte Apoptose oder eine zumindest langsamere Proliferation der EGFP<sup>+</sup> Zellen auf Grund des Auftretens eines Zellzyklusarrests in den Knochenmarkszellen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe in Betracht. Die Tatsache, dass der Prozentanteil an EGFP<sup>+</sup> Zellen in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe knapp 4 Wochen nach der Transplantation nicht mehr weiter sank, sich vielmehr konsolidierte und sogar wieder leicht anstieg, könnte dabei als Folge davon gedeutet werden, dass im genannten Beobachtungszeitraum zumindest ein gewisser Teil der betroffenen Knochenmarkszellen in der Lage war, den Zellzyklusarrest bzw. die Auslösung der Apoptose zu umgehen, und somit die Ausbildung der Erkrankung nicht mehr verhindert werden konnte. In die gleiche Richtung weisen die FACS-Daten mit dem GR-1 Antikörper. Auch hier kam es bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe nach anfänglich nahezu gleich hohen Prozentanteilen an EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen wie bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe in der Folgezeit zu einem rascheren Abfall dieser Anteile, der nach der zweiten Woche nach Transplantation bis über die dritte Woche hinaus zu signifikant niedrigeren Prozentanteilen EGFP<sup>+</sup> und GR-1<sup>+</sup> Zellen als in der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe führte. Im Verlauf stabilisierten sich die Werte wieder.

Weiter wird die hier vertretene Theorie auch durch Daten aus Zellzyklusanalysen gestützt, die mit Hilfe einer PI-Färbung von *c-Myc*-überexprimierenden *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmarkszellen zum Zeitpunkt der Transplantation erlangt wurden (Abb. 21 (A)). Korrespondierend mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeit, zeigte sich in den prämaligen Knochenmarkszellen bei der *Nipa*-defizienten Gruppe mit *c-Myc*-Überexpression ein deutlich höherer Anteil an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>-Phase und somit in der Apoptose als in den *c-Myc*-überexprimierenden Knochenmarkszellen mit normalem *Nipa*-Genotyp. Ähnliche Resultate ergaben sich bei Zellzyklusanalysen von *Nipa*<sup>-/-</sup> und *Nipa*<sup>+/+</sup> MEFs in denen *c-Myc* überexprimiert wurde (Illert, Fritz et al. 2008). Die erhöhte

Apoptoserate bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Zellen könnte sowohl die zunächst langsamere Rekonstitution der Leukozyten als auch die stärkere Abnahme EGFP<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäuse (Abb. 12 (A) u. 13 (A)) und den verzögerten Erkrankungsbeginn bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen erklären (Abb. 15 (A)). Die Zellzyklusanalysen brachten deutliche Anzeichen für eine erhöhte Sensibilisierung der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc*-Knochenmarkszellen für die Apoptose zutage, indessen enthielten sie keinen eindeutigen Hinweis auf das möglicherweise Vorliegen eines Zellzyklusarrest. Auf Grund der Ergebnisse der Zellzyklusanalysen ist anzunehmen, dass die Sensibilisierung für die Apoptose, die die *c-Myc*-Überexpression zur Folge hat (Evan, Wyllie et al. 1992), durch den Verlust der SCF<sup>Nipa</sup>-Funktion zusätzlich verstärkt wird.

Während bei den prämaligen Knochenmarkszellen hinsichtlich des Anteils an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>-Phase ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen bestand (Abb. 21 (A)), konnte dies bei den Knochenmarkszellen, die nach Ausbruch der Erkrankung gewonnen worden waren, nicht mehr festgestellt werden (Abb. 21 (B)). Bei diesen Knochenmarkszellen waren bei beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen die Anteile an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>-Phase gegenüber den beiden Kontrollgruppen signifikant höher, untereinander jedoch wiesen die Unterschiede keine Signifikanz auf. Dies steht mit den Ergebnissen der FACS-Analysen und der histologischen Aufarbeitung in Einklang, wonach sich in Bezug auf die Krebserkrankung zwischen den beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* und *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* keine wesentlichen Unterschiede ergaben.

Die bei den beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen bei den Zellzyklusanalysen festgestellte Angleichung der Anteile an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>-Phase in den malignen Knochenmarkszellen, die im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Zellzyklusanalysen der prämaligen Knochenmarkszellen steht, deutet auf eine Veränderung in den Knochenmarkszellen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäuse nach der Transplantation hin. Während nämlich bei der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe die Anteile an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>-Phase bei den prämaligen – übrig gebliebenen, nicht transplantierten – Knochenmarkszellen und den malignen – transplantierten – Knochenmarkszellen zum Todeszeitpunkt der Mäuse unmittelbar nach Symptomausbruch kaum voneinander abwichen, waren bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen die Anteile an Zellen in der Sub-G<sub>0</sub>-Phase zum Todeszeitpunkt dieser Mäuse nach Symptomausbruch deutlich abgesunken. Dies lässt die Vermutung zu, dass bei den Knochenmarkszellen der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäuse die Apoptose, die die Proliferation der *c-Myc*-überexprimierenden Zellen zunächst behindert, nach Transplantation im weiteren Verlauf von diesen Zellen umgangen wurde. Hierdurch wurde den Zellen die Proliferation und damit die wenn auch verspätete Ausbildung der Erkrankung ermöglicht.

Mithin ist davon auszugehen, dass der *Nipa*-Verlust die *c-Myc*-induzierte Krebsentwicklung verzögert, was nach den hier gemachten Beobachtungen bei den *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäusen

nahezu eine Verdoppelung der Zeit bis zum Ausbruch der Erkrankung bedeutete. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse erscheint es dabei als sehr wahrscheinlich, dass die Ursache für die Verzögerung der Ausbildung der Erkrankung bei der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe in der erhöhten Apoptoserate bei den Knochenmarkszellen zu suchen ist, wie sie sich bei der Zellzyklus-FACS-Analyse prämaligener Knochenmarkszellen darstellte. Es liegt nahe, dass die Kombination aus *c-Myc*-Überexpression und *Nipa*-Verlust durch ihre jeweilige Interaktion mit Cyclin B1 einen Zellzykluskontrollpunkt aktiviert, der in die Apoptose mündet und damit die Zelle vor übermäßiger Proliferation und Instabilität des Genoms schützen soll. Die genauen Mechanismen eines solchen Zellzykluskontrollpunkts und wie dieser Kontrollpunkt umgangen werden kann, um letztlich doch zur Ausbildung der Erkrankung zu führen, gilt es zu erforschen.

Luo, Li et al. stellten bei ihrem *Myc*-AML-Mausmodell fest, dass die *c-Myc*-induzierte Krebsentwicklung keiner weiteren antiapoptotischen Mutationen, sei es einer Störung des Arf-p53-Apoptosesignalwegs oder einer *Bcl-2*-Überexpression, bedurfte, um eine AML auszulösen. Ebenso wurden auch keine klonalen Abnormitäten der Chromosomen entdeckt, die als Ursache für die Krankheitsentstehung in Betracht kommen könnten (Luo, Li et al. 2005). Es stellt sich die Frage, ob Entsprechendes auch für die bei den vorliegenden Versuchen festgestellte AML bei *c-Myc*-Überexpression in Verbindung mit dem *Nipa*<sup>-/-</sup> Genotyp gilt, oder ob hier eine weitere Mutation erforderlich ist, um die malignen Zellen vor der Apoptose zu bewahren. Dabei ist zu berücksichtigen, dass alle transplantierten Mäuse der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe nach einer verlängerten Latenzzeit innerhalb eines Zeitraums von nur 5 Tagen (Abb. 15 (A)) dieselben Symptome aufwiesen und histologisch an der gleichen Leukämieform erkrankten, wie die Mäuse der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Gruppe. Die Wahrscheinlichkeit, dass 100% der Mäuse der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe dieselbe Mutation entwickelten oder unterschiedliche Mutationen zu einer derart einheitlichen Symptomatik, wie sie hier festgestellt wurde, führten, ist als gering zu bewerten. In Versuchen, bei denen eine *c-Myc*-Überexpression mit anderen Mutationen kombiniert wurde, hatte diese Kooperation häufig eine Veränderung nicht nur der Latenzzeit sondern auch der Art der Erkrankung zur Folge (Strasser, Harris et al. 1990; Luo, Li et al. 2005). Auch wenn die beiden zuletzt genannten Punkte gegen die Notwendigkeit einer zusätzlichen Mutation für die Auslösung der AML sprechen, sollten die am häufigsten vorkommenden antiapoptotischen Mutationen wie die Störung des Arf-p53-Signalweges (Bhatia, Gutierrez et al. 1992; Eischen, Weber et al. 1999) oder die *Bcl-2*-Überexpression (Strasser, Harris et al. 1990), auch wenn sie im ursprünglichen Maus-AML-Modell von Luo, Li et al. keine Rolle spielten, bei der Erforschung des Umgehungsmechanismus des Zellzyklusarrest oder der Apoptose nicht außer Acht gelassen werden.

Unterdessen sind neben den Genen des Arf-p53-Signalweges und *Bcl-2* eine Reihe anderer Gene bekannt, die mit der *c-Myc*-Überexpression bei der Tumorentstehung kooperieren.

In neueren Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass dem antiapoptotisch wirkenden Protein Mcl1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der AML zuzuschreiben ist und das entsprechende Gen in vielen leukämischen Blasten humaner AML Zellen überexprimiert wird (Xiang, Luo et al. 2010). Zudem konnte mit Hilfe des Myc-AML-Mausmodells (Luo, Li et al. 2005) nachgewiesen werden, dass eine Reduzierung der Mcl1-Konzentrationen durch *Mcl1*-Haploinsuffizienz in *c-Myc*-überexprimierenden Knochenmarkszellen die *c-Myc*-induzierte AML-Entstehung verhindert (Xiang, Luo et al. 2010).

Von proapoptotischen Proteinen wie Bim (Egle, Harris et al. 2004) und auch Bax (Eischen, Roussel et al. 2001; Juin, Hunt et al. 2002) ist schon länger bekannt, dass ihr Verlust bzw. ihre Haploinsuffizienz in E $\mu$ -Myc Mäusen zu einer beschleunigten Tumorgenese führen. Während der Bax-Verlust die Lymphomentwicklung nur beschleunigt (Eischen, Roussel et al. 2001), führt die Defizienz von Bim neben der Beschleunigung der Erkrankung auch zum Auftreten von akuten B-Zell Leukämien (Egle, Harris et al. 2004).

Ähnliches gilt für das proapoptotische Protein Puma. Der komplette Verlust der Puma-Funktion führte zu einem früheren Auftreten der Lymphome bei E $\mu$ -Myc Mäusen und gleichzeitig zur Entwicklung von Leukämien mit deutlich höheren Leukozytenzahlen und einer stärker vergrößerten Milz als bei den Wt-E $\mu$ -Myc Mäusen. Der Verlust des Proteins Noxa hingegen führte bei E $\mu$ -Myc Mäusen nur in Verbindung mit dem Verlust zumindest eines *Puma*-Allels zu einer rascheren Lymphomentstehung (Michalak, Jansen et al. 2009).

Interessant wäre es, die jeweiligen relativen Expressionen der genannten Gene bzw. die Konzentrationen ihrer Proteinprodukte in den leukämischen Blasten der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten direkt vor und kurz nach der Transplantation bis zum erstmaligen Auftreten der Symptome zu messen und mit den Konzentrationen leukämischer Blasten der *Nipa*<sup>+/+</sup> *c-Myc* Mäuse zu vergleichen. Gleiches gilt für eine Vielzahl weiterer Gene und ihrer Produkte, die mit der *c-Myc*-induzierten Krebsentstehung in Verbindung gebracht werden.

Viele der Mutationen, die sich als Kooperationspartner von *c-Myc* bei der Malignomentstehung erwiesen, wurden mit Hilfe des E $\mu$ -Myc-Modells erforscht. Deshalb ergäbe es durchaus einen Sinn, die Wirkweise und die Folgen des Funktionsverlustes von *Nipa* auf die *c-Myc*-induzierte Krebsentwicklung beim E $\mu$ -Myc-Mausmodell zu ergründen. Von Interesse wäre insbesondere, ob bei diesem gut untersuchten Lymphom-Mausmodell der Verlust von *Nipa* in Bezug auf Entstehung und Entwicklung der Krebserkrankung Ergebnisse hervorbringt, die mit denen beim hier verwendeten Myc-AML-Mausmodell übereinstimmen. Außerdem könnten durch die Versuche an dem E $\mu$ -Myc-Modell die Ergebnisse und damit der Einfluss des Funktionsverlustes von *Nipa* auf die *c-Myc*-induzierte Krebsentstehung direkt mit den Effekten anderer, bekannter Kooperationspartner von *c-Myc*, die aus früheren Tests bei dem E $\mu$ -Myc-Modell bereits festgestellt wurden, verglichen und entsprechend eingeordnet werden.

Zusätzlich zu den Untersuchungen, die zur Beantwortung der hier aufgeworfenen Fragen zum Mechanismus der *c-Myc*- und *Nipa*-Interaktion durchzuführen sind, sind des Weiteren auch noch Transplantationen an *Nipa*<sup>+/+</sup> und *Nipa*<sup>-/-</sup> Mäusen notwendig, um den hier erlangten Ergebnissen durch größere Fallzahlen bei den untersuchten Mausgruppen eine höhere Aussagekraft zu verleihen.

Darüber hinaus werfen die im murinen Modell festgestellten Ergebnisse die Frage auf, ob NIPA auch bei humanen Tumorerkrankungen eine entsprechende Rolle spielt.

Die wissenschaftliche Untersuchungen betreffs *Nipa* dienen zum einen dazu, daraus ein besseres Verständnis über die Vorgänge und Störmechanismen am G<sub>2</sub>/M-Übergang und damit über einen der wichtigsten Abläufe im Zellzyklus zu erlangen. Zum anderen resultieren aus den Untersuchungsergebnissen folgende Überlegungen für weitere Nachforschungen: Danach könnte NIPA u.a. die Funktion eines prognostischen Merkmals zugeschrieben werden, über das möglicherweise zur Geschwindigkeit der Proliferation bzw. die Aggressivität des Tumorwachstums Aussagen gemacht werden können. Noch wichtiger jedoch ist, ob und inwieweit die Untersuchungsergebnisse in Richtung eines möglichen therapeutischen Nutzens in der onkologischen Behandlung hilfreich sein könnten. Die Möglichkeit, mittels des Proteins NIPA auf den G<sub>2</sub>/M-Übergang Einfluss nehmen zu können, sei es durch Aktivierung eines Zellzykluskontrollpunktes oder durch die Einleitung der Apoptose, könnte z.B. für Tumoren mit Defekten der wichtigen Zellzykluskontrollpunkte am G<sub>1</sub>/S-Übergang, beispielsweise mit p53- oder p27<sup>kip</sup>-Defizienz (Martins and Berns 2002), von entscheidender therapeutischer Bedeutung werden.

Andere Stoffe, wie z.B. die Chk1-Inhibitoren werden auf Grund erfolgversprechender Daten aus in vitro Versuchen bzw. Tiermodellen bereits in klinischen Studien getestet (Bucher and Britten 2008; Kuntz and O'Connell 2009). Neuere Daten weisen sogar darauf hin, dass Chk1-Inhibitoren speziell für die Therapie *c-Myc*-überexprimierender Tumore eine gute Therapieoption darstellen könnte. Eμ-*Myc* Lymphomzellen, die in Mäusen transplantiert wurden sprachen gut auf Chk1-Inhibitoren an, ebenso wie p53-defiziente Eμ-*myc* Lymphome. Der *c-Myc*-induzierte replikative Stress könnte die Ursache für das gute Ansprechen dieser Tumoren sein (Murga, Campaner et al. 2011).

Möglicherweise könnte in Zukunft auch *Nipa* das Ziel eines Therapieansatzes bei *c-Myc*-überexprimierenden Krebserkrankungen darstellen. Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Kombination aus *c-Myc*-Überexpression und dem Funktionsverlust von *Nipa* zu einer verstärkten Apoptoseeinleitung im Bereich des G<sub>2</sub>/M-Übergangs führt. Um dies therapeutisch einsetzen zu können, muss aber erst geklärt werden ob ein bzw. welcher Schutzmechanismus im Zellzyklus durch die Kooperation zwischen der *c-Myc*-Überexpression und dem Funktionsverlust von *Nipa* aktiviert wird und auf welche Art und Weise dieser Schutzmechanismus von den Tumorzellen umgangen werden kann.

## 7 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor *c-Myc* nimmt durch die große Anzahl seiner Zielgene auf viele wichtige Zellprozesse wie das Zellwachstum oder die Proliferation, Einfluss. Viele dieser Zellprozesse sind in Krebszellen gestört. In schätzungsweise 20% aller humanen Krebsarten ist das Onkogen *c-Myc* dereguliert. Dabei kann eine große Anzahl von Genen *c-Myc* als Kooperationspartner bei der Krebsentwicklung unterstützen. Ein potentieller Kandidat für einen solchen Kooperationspartner ist *Nipa*. Sein Proteinprodukt ist als definierender Teil einer Ubiquitinligase an der Regulation der nukleären Cyclin B1-Konzentrationen beteiligt. Während *c-Myc* die Cyclin B1-Konzentrationen durch Hochregulation der *Cyclin B1*-Expression beeinflusst, wirkt *Nipa*, indem es in der Interphase nukleäres Cyclin B1 ubiquitiniert und zum Abbau freigibt.

Die Zielsetzung dieser Dissertation ist die funktionelle Überprüfung der Rolle von *Nipa* bei der Tumorentstehung in dem *Myc*-AML-Mausmodell von Luo, Li et al. In diesem Mausmodell wird *c-Myc*-überexprimierendes murines Knochenmark letal bestrahlt, ursprünglich gesunden Mäusen transplantiert. Dies führt zur Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie, ohne dass dabei typische proapoptotische Schutzmechanismen, wie z.B. der Arf-p53-Signalweg, durch Mutation ausgeschaltet wurden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen zunächst die erfolgreiche Etablierung des *Myc*-AML-Mausmodells, wie es von Luo, Li et al. beschrieben wurde. Schließlich konnte in einem weiteren Transplantationsversuch gezeigt werden, dass der Verlust der *Nipa*-Funktion eine deutliche Auswirkung auf die *c-Myc*-induzierte Krebsentwicklung hat. Mäuse, die mit *c-Myc*-überexprimierendem *Nipa*<sup>-/-</sup> Knochenmark transplantiert wurden, wiesen im Vergleich zu Mäusen, denen *c-Myc*-überexprimierendes *Nipa*<sup>+/+</sup> Knochenmark übertragen wurde, eine deutliche Verzögerung in der Entwicklung der akuten myeloischen Leukämie auf. Die Symptome und die histologischen Befunde der Erkrankung in den beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander.

Eine mögliche Erklärung für die verlängerte Latenzzeit in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe bieten die Zellzyklusanalysen von prä malignen *c-Myc*-überexprimierenden Knochenmarkszellen vom *Nipa*<sup>-/-</sup> und vom *Nipa*<sup>+/+</sup> Genotyp. Diese zeigen eine signifikant höhere Apoptoserate in den Knochenmarkszellen des *Nipa*<sup>-/-</sup> Genotyp. Damit deuten unsere Daten darauf hin, dass die Kombination aus der *c-Myc*-Überexpression und dem Funktionsverlust von *Nipa* zu einer verstärkten Apoptoseeinleitung im Bereich des G<sub>2</sub>/M-Übergangs führt. Denkbare Mechanismen hierfür sind entweder die Eliminierung eines Zellzykluskontrollpunktes am G<sub>2</sub>/M-Übergang mit vorzeitigem Eintritt in die M-Phase und darauf folgender mitotischer Katastrophe oder die Freilegung eines Zellzykluskontrollpunktes am G<sub>2</sub>/M-Übergang, der die Apoptose einleitet.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen aber auch darauf hin, dass der Mechanismus, der zunächst zur verstärkten Apoptoseeinleitung in der *Nipa*<sup>-/-</sup> *c-Myc* Gruppe führt, umgangen

werden kann. Unabhängig vom *Nipa*-Genotyp kam es in beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen zur Ausbildung eines identischen Krankheitsbildes, und auch die Zellzyklusanalysen von Knochenmarkszellen sämtlicher erkrankter Tiere zeigten nahezu keinen Unterschied mehr zwischen den Apoptoseraten der beiden *c-Myc*-überexprimierenden Gruppen.

Die genauen Mechanismen, die zur Apoptoseeinleitung einerseits und zur Umgehung der Apoptose andererseits führen, sind bislang noch ungeklärt. Die Aufdeckung dieser Abläufe könnte jedoch einen wichtigen Beitrag für die Weiterentwicklung erfolgversprechender Krebstherapien leisten, die sich mit der Beeinflussung des G<sub>2</sub>/M-Übergangs beschäftigen.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Regulation nukleärer Cyclin B1-Konzentrationen mittels Ubiquitinligasen im Zellzyklus.....	24
Abb. 2	Fragestellung der Arbeit.....	26
Abb. 3	Ablauf der Transplantation.....	46
Abb. 4	RT-PCR von humanen Burkitt-Lymphomzellen, MEFs mit <i>Myc</i> -ER-System und Westernblot von P493-6-Zellen.....	50
Abb. 5	Blutbildkontrollen der MIG/ MIG <i>c-Myc</i> Gruppe *.....	54
Abb. 6	FACS-Analyse EGFP <sup>+</sup> , lymphatischer und myeloischer Zellen im peripheren Blut *.....	55
Abb. 7	FACS-Analyse der verschiedenen EGFP <sup>+</sup> Leukozytenanteile mittels spezifischer Oberflächenantikörper im peripheren Blut *.....	57
Abb. 8	Erkrankungskurven, Gewichtsvergleich und Westernblot der Milzen *.....	59
Abb. 9	FACS-Analyse EGFP <sup>+</sup> , lymphatischer und myeloischer Zellen in Knochenmark/Milzgewebe *.....	60
Abb. 10	FACS-Analyse verschiedener EGFP <sup>+</sup> Lymphozytenanteile/myeloischer Vorläuferzellen mittels spezifischer Oberflächenantikörper im Knochenmark/Milzgewebe *.....	61
Abb. 11	FACS-Analyse EGFP <sup>+</sup> myeloischer Zellen mittels spezifischer Oberflächenantikörper im Knochenmark/Milzgewebe *.....	62
Abb. 12	Blutbildkontrollen der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe sowie der Kontrollgruppen **.....	64
Abb. 13	FACS-Analyse EGFP <sup>+</sup> , lymphatischer und myeloischer Zellen im peripheren Blut der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe **.....	66
Abb. 14	FACS-Analyse der verschiedenen EGFP <sup>+</sup> Leukozytenanteile mittels spezifischer Oberflächenantikörper im peripheren Blut der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe **.....	67
Abb. 15	Erkrankungskurven und Vergleich der Milzgewichte der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe sowie der Kontrollgruppen **.....	70
Abb. 16	FACS-Analyse EGFP <sup>+</sup> , lymphatischer und myeloischer Zellen im Knochenmark/Milzgewebe der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe**.....	71
Abb. 17	FACS-Analyse verschiedener EGFP <sup>+</sup> Lymphozytenanteile/myeloischer Vorläuferzellen mittels spezifischer Oberflächenantikörper im Knochenmark/Milzgewebe der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe **.....	72
Abb. 18	FACS-Analyse EGFP <sup>+</sup> myeloischer Zellen mittels spezifischer Oberflächenantikörper im Knochenmark/Milzgewebe der <i>Nipa</i> <sup>+/+</sup> <i>c-Myc</i> und <i>Nipa</i> <sup>-/-</sup> <i>c-Myc</i> Gruppe **.....	73
Abb. 19	Milzgewebeschnitte nach HE-Färbung **.....	74

Abb. 20 Milzgewebeschnitte von *Nipa+/+* *c-Myc* und *Nipa-/-* *c-Myc* Mäusen nach HE- und immunhistologischer Färbung \*\* .....76

Abb. 21 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid bei prämaligen und malignen Knochenmarkszellen mit *Nipa+/+* *c-Myc* und *Nipa-/-* *c-Myc* Genotyp sowie Kontrollzellen \*\* .....78

\* 1. Transplantation

\*\* 2. Transplantation

## 9 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M. and S. Cory. "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." *Oncogene* 26 (2007) 1324-37.
- Alitalo, K., M. Schwab, C. C. Lin, H. E. Varmus and J. M. Bishop. "Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983) 1707-11.
- Barr, L. F., S. E. Campbell, B. S. Bochner and C. V. Dang. "Association of the decreased expression of alpha3beta1 integrin with the altered cell: environmental interactions and enhanced soft agar cloning ability of c-myc-overexpressing small cell lung cancer cells." *Cancer Res* 58 (1998) 5537-45.
- Barsyte-Lovejoy, D., D. Y. Mao and L. Z. Penn. "c-Myc represses the proximal promoters of GADD45a and GADD153 by a post-RNA polymerase II recruitment mechanism." *Oncogene* 23 (2004) 3481-6.
- Bassermann, F., C. Peschel and J. Duyster. "Mitotic entry: a matter of oscillating destruction." *Cell Cycle* 4 (2005) 1515-7.
- Bassermann, F., C. von Klitzing, A. L. Illert, S. Munch, S. W. Morris, M. Pagano, C. Peschel and J. Duyster. "Multisite phosphorylation of nuclear interaction partner of ALK (NIPA) at G2/M involves cyclin B1/Cdk1." *J Biol Chem* 282 (2007) 15965-72.
- Bassermann, F., C. von Klitzing, S. Munch, R. Y. Bai, H. Kawaguchi, S. W. Morris, C. Peschel and J. Duyster. "NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry." *Cell* 122 (2005) 45-57.
- Baudino, T. A., C. McKay, H. Pendeville-Samain, J. A. Nilsson, K. H. Maclean, E. L. White, A. C. Davis, J. N. Ihle and J. L. Cleveland. "c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression." *Genes Dev* 16 (2002) 2530-43.
- Bello-Fernandez, C., G. Packham and J. L. Cleveland. "The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 7804-8.
- Bertram, J. S. "The molecular biology of cancer." *Mol Aspects Med* 21 (2000) 167-223.
- Bhatia, K. G., M. I. Gutierrez, K. Huppi, D. Siwarski and I. T. Magrath. "The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors." *Cancer Res* 52 (1992) 4273-6.
- Blackwood, E. M. and R. N. Eisenman. "Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc." *Science* 251 (1991) 1211-7.
- Bouchard, C., O. Dittrich, A. Kiermaier, K. Dohmann, A. Menkel, M. Eilers and B. Luscher. "Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter." *Genes Dev* 15 (2001) 2042-7.
- Brooks, C. L. and W. Gu. "Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation." *Curr Opin Cell Biol* 15 (2003) 164-71.
- Bucher, N. and C. D. Britten. "G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer." *Br J Cancer* 98 (2008) 523-8.
- Cheng, S. W., K. P. Davies, E. Yung, R. J. Beltran, J. Yu and G. V. Kalpana. "c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function." *Nat Genet* 22 (1999) 102-5.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green. "Dissecting p53-dependent apoptosis." *Cell Death Differ* 13 (2006) 994-1002.
- Christoffersen, N. R., R. Shalgi, L. B. Frankel, E. Leucci, M. Lees, M. Klausen, Y. Pilpel, F. C. Nielsen, M. Oren and A. H. Lund. "p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC." *Cell Death Differ* 17 (2010) 236-45.
- Coller, H. A., C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E. S. Lander, R. N. Eisenman and T. R. Golub. "Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 3260-5.
- Collins, S. and M. Groudine. "Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line." *Nature* 298 (1982) 679-81.
- Cory, S. and J. M. Adams. "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 647-56.
- Cory, S., D. C. Huang and J. M. Adams. "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." *Oncogene* 22 (2003) 8590-607.
- Coultas, L. and A. Strasser. "The molecular control of DNA damage-induced cell death." *Apoptosis* 5 (2000) 491-507.
- Cowling, V. H. and M. D. Cole. "Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins." *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 242-52.

- Cowling, V. H. and M. D. Cole. "The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding." *Mol Cell Biol* 27 (2007) 2059-73.
- Croce, C. M. "Oncogenes and cancer." *N Engl J Med* 358 (2008) 502-11.
- Dalla-Favera, R., F. Wong-Staal and R. C. Gallo. "Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient." *Nature* 299 (1982) 61-3.
- Dang, C. V. "c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism." *Mol Cell Biol* 19 (1999) 1-11.
- Dang, C. V. "MYC on the path to cancer." *Cell* 149 (2012) 22-35.
- Dang, C. V., K. A. O'Donnell, K. I. Zeller, T. Nguyen, R. C. Osthus and F. Li. "The c-Myc target gene network." *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 253-64.
- Dang, C. V., L. M. Resar, E. Emison, S. Kim, Q. Li, J. E. Prescott, D. Wonsey and K. Zeller. "Function of the c-Myc oncogenic transcription factor." *Exp Cell Res* 253 (1999) 63-77.
- de Alboran, I. M., E. Baena and A. C. Martinez. "c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death." *Cell Death Differ* 11 (2004) 61-8.
- DESTATIS. (2011). "Pressemitteilung Nr. 354, 2010: Herz-/Kreislaufkrankungen verursachen rund 41 % aller Todesfälle." *Pressemitteilung Nr. 354*, ([http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2011/09/PD11\\_\\_354\\_\\_232,templateId=renderPrint.psml](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2011/09/PD11__354__232,templateId=renderPrint.psml)), Stand: 23.09.2011
- Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E. E. Furth, W. M. Lee, G. H. Enders, J. T. Mendell and A. Thomas-Tikhonenko. "Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster." *Nat Genet* 38 (2006) 1060-5.
- Diehl, J. A., F. Zindy and C. J. Sherr. "Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." *Genes Dev* 11 (1997) 957-72.
- Egle, A., A. W. Harris, P. Bouillet and S. Cory. "Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 6164-9.
- Eischen, C. M., G. Packham, J. Nip, B. E. Fee, S. W. Hiebert, G. P. Zambetti and J. L. Cleveland. "Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1." *Oncogene* 20 (2001) 6983-93.
- Eischen, C. M., M. F. Roussel, S. J. Korsmeyer and J. L. Cleveland. "Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis." *Mol Cell Biol* 21 (2001) 7653-62.
- Eischen, C. M., J. D. Weber, M. F. Roussel, C. J. Sherr and J. L. Cleveland. "Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis." *Genes Dev* 13 (1999) 2658-69.
- Eischen, C. M., D. Woo, M. F. Roussel and J. L. Cleveland. "Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis." *Mol Cell Biol* 21 (2001) 5063-70.
- Eisenman, R. N. "Deconstructing myc." *Genes Dev* 15 (2001) 2023-30.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* 75 (1993) 817-25.
- Evan, G. I. and T. D. Littlewood. "The role of c-myc in cell growth." *Curr Opin Genet Dev* 3 (1993) 44-9.
- Evan, G. I., A. H. Wyllie, C. S. Gilbert, T. D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C. M. Waters, L. Z. Penn and D. C. Hancock. "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein." *Cell* 69 (1992) 119-28.
- Felsher, D. W. and J. M. Bishop. "Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 3940-4.
- Fesquet, D., J. C. Labbe, J. Derancourt, J. P. Capony, S. Galas, F. Girard, T. Lorca, J. Shuttleworth, M. Doree and J. C. Cavadore. "The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues." *EMBO J* 12 (1993) 3111-21.
- Gandarillas, A. and F. M. Watt. "c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells." *Genes Dev* 11 (1997) 2869-82.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner. "Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene." *Exp Cell Res* 246 (1999) 280-9.
- Gautier, J., M. J. Solomon, R. N. Booyer, J. F. Bazan and M. W. Kirschner. "cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2." *Cell* 67 (1991) 197-211.
- Gomez-Roman, N., C. Grandori, R. N. Eisenman and R. J. White. "Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc." *Nature* 421 (2003) 290-4.

- Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James and R. N. Eisenman. "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16 (2000) 653-99.
- Gregory, M. A. and S. R. Hann. "c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells." *Mol Cell Biol* 20 (2000) 2423-35.
- Guo, Y., C. Niu, P. Breslin, M. Tang, S. Zhang, W. Wei, A. R. Kini, G. P. Paner, S. Alkan, S. W. Morris, M. Diaz, P. J. Stiff and J. Zhang. "c-Myc-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors." *Blood* 114 (2009) 2097-106.
- Hagting, A., M. Jackman, K. Simpson and J. Pines. "Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal." *Curr Biol* 9 (1999) 680-9.
- Hagting, A., C. Karlsson, P. Clute, M. Jackman and J. Pines. "MPF localization is controlled by nuclear export." *EMBO J* 17 (1998) 4127-38.
- Hakem, R. "DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly." *EMBO J* 27 (2008) 589-605.
- Hanson, K. D., M. Shichiri, M. R. Follansbee and J. M. Sedivy. "Effects of c-myc expression on cell cycle progression." *Mol Cell Biol* 14 (1994) 5748-55.
- Harper, J. W., S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L. H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, E. Swindell and et al. "Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21." *Mol Biol Cell* 6 (1995) 387-400.
- Harrington, E. A., M. R. Bennett, A. Fanidi and G. I. Evan. "c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines." *EMBO J* 13 (1994) 3286-95.
- Hartwell, L. H. and M. B. Kastan. "Cell cycle control and cancer." *Science* 266 (1994) 1821-8.
- Hayward, W. S., B. G. Neel and S. M. Astrin. "Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia." *Nature* 290 (1981) 475-80.
- He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein and K. W. Kinzler. "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* 281 (1998) 1509-12.
- Heald, R., M. McLoughlin and F. McKeon. "Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase." *Cell* 74 (1993) 463-74.
- Hermeking, H. and D. Eick. "Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53." *Science* 265 (1994) 2091-3.
- Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, T. C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. "14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression." *Mol Cell* 1 (1997) 3-11.
- Honda, R., Y. Ohba, A. Nagata, H. Okayama and H. Yasuda. "Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase." *FEBS Lett* 318 (1993) 331-4.
- Honda, R. and H. Yasuda. "Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53." *EMBO J* 18 (1999) 22-7.
- Hopewell, R. and E. B. Ziff. "The nerve growth factor-responsive PC12 cell line does not express the Myc dimerization partner Max." *Mol Cell Biol* 15 (1995) 3470-8.
- Hurlin, P. J. and J. Huang. "The MAX-interacting transcription factor network." *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 265-74.
- Illert, A. L., C. Fritz, H. Kawaguchi, P. Schenk, S. W. Morris, C. Peschel, U. Keller and J. Duyster. "NIPA Checkpoint Control Is Essential for Efficient Oncogenic Transformation by C-Myc." *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 112 (2008) Abstract 2838.
- Illert, A. L., H. Kawaguchi, C. Antinozzi, F. Bassermann, L. Quintanilla-Martinez, C. von Klitzing, M. Hiwatari, C. Peschel, D. G. de Rooij, S. W. Morris, M. Barchi and J. Duyster. "Targeted inactivation of nuclear interaction partner of ALK disrupts meiotic prophase." *Development* 139 (2012) 2523-34.
- Inghirami, G., F. Grignani, L. Sternas, L. Lombardi, D. M. Knowles and R. Dalla-Favera. "Down-regulation of LFA-1 adhesion receptors by C-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells." *Science* 250 (1990) 682-6.
- Jiang, X. and X. Wang. "Cytochrome C-mediated apoptosis." *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 87-106.
- Juin, P., A. Hunt, T. Littlewood, B. Griffiths, L. B. Swigart, S. Korsmeyer and G. Evan. "c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis." *Mol Cell Biol* 22 (2002) 6158-69.
- Karlsson, A., D. Deb-Basu, A. Cherry, S. Turner, J. Ford and D. W. Felsher. "Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 9974-9.
- Kaufmann, W. K. "Initiating the uninitiated: replication of damaged DNA and carcinogenesis." *Cell Cycle* 6 (2007) 1460-7.
- Keller, U. B., J. B. Old, F. C. Dorsey, J. A. Nilsson, L. Nilsson, K. H. MacLean, L. Chung, C. Yang, C. Spruck, K. Boyd, S. I. Reed and J. L. Cleveland. "Myc targets Cks1 to provoke the suppression of p27Kip1, proliferation and lymphomagenesis." *EMBO J* 26 (2007) 2562-74.

- Kelly, K., B. H. Cochran, C. D. Stiles and P. Leder. "Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor." *Cell* 35 (1983) 603-10.
- Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen-Durr, J. W. Ellwart, E. Kremmer, H. J. Delecluse, C. Rottenberger, G. W. Bornkamm and W. Hammerschmidt. "B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2." *EMBO J* 14 (1995) 88-96.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26 (1972) 239-57.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein. "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." *Nature* 386 (1997) 761, 763.
- Klitzing, C., R. Huss, A. L. Illert, A. Froschl, S. Wotzel, C. Peschel, F. Bassermann and J. Duyster. "APC/C(Cdh1)-mediated degradation of the F-box protein NIPA is regulated by its association with Skp1." *PLoS One* 6 (2011) e28998.
- Knoepfler, P. S., X. Y. Zhang, P. F. Cheng, P. R. Gafken, S. B. McMahon and R. N. Eisenman. "Myc influences global chromatin structure." *EMBO J* 25 (2006) 2723-34.
- Kumar, V., A. K. Abbas and N. Fausto. Cellular Adaptation, Cell Injury, and Cell Death, Apoptosis. In Robbins and Cotran pathologic basis of disease. V. Kumar, A. K. Abbas and N. Fausto (Ed.), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005a, 7th, 26 - 32.
- Kumar, V., A. K. Abbas and N. Fausto. Neoplasia, Molecular Basis of Cancer. In Robbins and Cotran pathologic basis of disease. V. Kumar, A. K. Abbas and N. Fausto (Ed.), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005b, 7th, 1, 288 - 315.
- Kumar, V., A. K. Abbas and N. Fausto. Tissue Renewal and Repair: Regeneration, Healing, and Fibrosis, Control of Normal Cell Proliferation and Tissue Growth, Cell Cycle and the Regulation of Cell Replication. In Robbins and Cotran pathologic basis of disease. V. Kumar, A. K. Abbas and N. Fausto (Ed.), Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005c, 7th, 100 - 101.
- Kuntz, K. and M. J. O'Connell. "The G(2) DNA damage checkpoint: could this ancient regulator be the Achilles heel of cancer?" *Cancer Biol Ther* 8 (2009) 1433-9.
- L'Italien, L., M. Tanudji, L. Russell and X. M. Schebye. "Unmasking the redundancy between Cdk1 and Cdk2 at G2 phase in human cancer cell lines." *Cell Cycle* 5 (2006) 984-93.
- Lammer, C., S. Wagerer, R. Saffrich, D. Mertens, W. Ansorge and I. Hoffmann. "The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells." *J Cell Sci* 111 ( Pt 16) (1998) 2445-53.
- Langdon, W. Y., A. W. Harris, S. Cory and J. M. Adams. "The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice." *Cell* 47 (1986) 11-8.
- Latif, C., N. R. den Elzen and M. J. O'Connell. "DNA damage checkpoint maintenance through sustained Chk1 activity." *J Cell Sci* 117 (2004) 3489-98.
- Levens, D. "You Don't Muck with MYC." *Genes Cancer* 1 (2010) 547-554.
- Li, Z., S. Van Calcar, C. Qu, W. K. Cavenee, M. Q. Zhang and B. Ren. "A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 8164-9.
- Lindstrom, M. S., U. Klangby and K. G. Wiman. "p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53." *Oncogene* 20 (2001) 2171-7.
- Luo, H., Q. Li, J. O'Neal, F. Kreisel, M. M. Le Beau and M. H. Tomasson. "c-Myc rapidly induces acute myeloid leukemia in mice without evidence of lymphoma-associated antiapoptotic mutations." *Blood* 106 (2005) 2452-61.
- Maclean, K. H., U. B. Keller, C. Rodriguez-Galindo, J. A. Nilsson and J. L. Cleveland. "c-Myc augments gamma irradiation-induced apoptosis by suppressing Bcl-XL." *Mol Cell Biol* 23 (2003) 7256-70.
- Mao, D. Y., J. D. Watson, P. S. Yan, D. Barsyte-Lovejoy, F. Khosravi, W. W. Wong, P. J. Farnham, T. H. Huang and L. Z. Penn. "Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression." *Curr Biol* 13 (2003) 882-6.
- Marhin, W. W., S. Chen, L. M. Facchini, A. J. Fornace, Jr. and L. Z. Penn. "Myc represses the growth arrest gene gadd45." *Oncogene* 14 (1997) 2825-34.
- Martins, C. P. and A. Berns. "Loss of p27(Kip1) but not p21(Cip1) decreases survival and synergizes with MYC in murine lymphomagenesis." *EMBO J* 21 (2002) 3739-48.
- Mateyak, M. K., A. J. Obaya, S. Adachi and J. M. Sedivy. "Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination." *Cell Growth Differ* 8 (1997) 1039-48.
- McMahon, S. B., M. A. Wood and M. D. Cole. "The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc." *Mol Cell Biol* 20 (2000) 556-62.
- Meeran, S. M. and S. K. Katiyar. "Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents." *Front Biosci* 13 (2008) 2191-202.

- Menssen, A. and H. Hermeking. "Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 6274-9.
- Meyer, N., S. S. Kim and L. Z. Penn. "The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis." *Semin Cancer Biol* 16 (2006) 275-87.
- Meyer, N. and L. Z. Penn. "Reflecting on 25 years with MYC." *Nat Rev Cancer* 8 (2008) 976-90.
- Michalak, E. M., E. S. Jansen, L. Happo, M. S. Cragg, L. Tai, G. K. Smyth, A. Strasser, J. M. Adams and C. L. Scott. "Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis." *Cell Death Differ* 16 (2009) 684-96.
- Millar, J. B., J. Blevitt, L. Gerace, K. Sadhu, C. Featherstone and P. Russell. "p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 10500-4.
- Miner, J. H. and B. J. Wold. "c-myc inhibition of MyoD and myogenin-initiated myogenic differentiation." *Mol Cell Biol* 11 (1991) 2842-51.
- Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H. G. Wang, H. K. Lin, D. A. Liebermann, B. Hoffman and J. C. Reed. "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* 9 (1994) 1799-805.
- Morin, J. P., J. M. Trent, F. S. Collins and B. Vogelstein. *Cancer Genetics*. In Harrison's principles of internal medicine. D. L. Kasper, E. Braunwald, A. S. Fauci, S. L. Hauser, D. L. Longo and J. L. Jameson (Ed.), McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York, 2005, 16th, 1, 447 - 453.
- Morrow, M. A., G. Lee, S. Gillis, G. D. Yancopoulos and F. W. Alt. "Interleukin-7 induces N-myc and c-myc expression in normal precursor B lymphocytes." *Genes Dev* 6 (1992) 61-70.
- Mueller, P. R., T. R. Coleman, A. Kumagai and W. G. Dunphy. "Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15." *Science* 270 (1995) 86-90.
- Murga, M., S. Campaner, A. J. Lopez-Contreras, L. I. Toledo, R. Soria, M. F. Montana, L. D'Artista, T. Schleker, C. Guerra, E. Garcia, M. Barbacid, M. Hidalgo, B. Amati and O. Fernandez-Capetillo. "Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors." *Nat Struct Mol Biol* 18 (2011) 1331-5.
- Nakano, K. and K. H. Vousden. "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Mol Cell* 7 (2001) 683-94.
- Neel, B. G., S. C. Jhanwar, R. S. Chaganti and W. S. Hayward. "Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 7842-6.
- Nilsson, J. A. and J. L. Cleveland. "Myc pathways provoking cell suicide and cancer." *Oncogene* 22 (2003) 9007-21.
- Nolan, G. P. "Nolan Lab Retroviral Systems." (<http://www.stanford.edu/group/nolan>), Stand: 09.08.2012
- O'Connell, M. J., N. C. Walworth and A. M. Carr. "The G2-phase DNA-damage checkpoint." *Trends Cell Biol* 10 (2000) 296-303.
- O'Connor, P. M. "Mammalian G1 and G2 phase checkpoints." *Cancer Surv* 29 (1997) 151-82.
- O'Donnell, K. A., E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang and J. T. Mendell. "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression." *Nature* 435 (2005) 839-43.
- Obaya, A. J., M. K. Mateyak and J. M. Sedivy. "Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle." *Oncogene* 18 (1999) 2934-41.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi and N. Tanaka. "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* 288 (2000) 1053-8.
- Ouyang, T., R. Y. Bai, F. Bassermann, C. von Klitzing, S. Klumpen, C. Miething, S. W. Morris, C. Peschel and J. Duyster. "Identification and characterization of a nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA)." *J Biol Chem* 278 (2003) 30028-36.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge and G. Draetta. "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." *EMBO J* 11 (1992) 961-71.
- Pajic, A., D. Spitkovsky, B. Christoph, B. Kempkes, M. Schuhmacher, M. S. Staeger, M. Brielmeier, J. Ellwart, F. Kohlhuber, G. W. Bornkamm, A. Polack and D. Eick. "Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line." *Int J Cancer* 87 (2000) 787-93.
- Palomero, T., W. K. Lim, D. T. Odom, M. L. Sulis, P. J. Real, A. Margolin, K. C. Barnes, J. O'Neil, D. Neuberg, A. P. Weng, J. C. Aster, F. Sigaux, J. Soulier, A. T. Look, R. A. Young, A. Califano and A. A. Ferrando. "NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 18261-6.
- Passalaris, T. M., J. A. Benanti, L. Gewin, T. Kiyono and D. A. Galloway. "The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways." *Mol Cell Biol* 19 (1999) 5872-81.

- Peukert, K., P. Staller, A. Schneider, G. Carmichael, F. Hanel and M. Eilers. "An alternative pathway for gene regulation by Myc." *EMBO J* 16 (1997) 5672-86.
- Powell, S. N., J. S. DeFrank, P. Connell, M. Eogan, F. Preffer, D. Dombkowski, W. Tang and S. Friend. "Differential sensitivity of p53(-) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay." *Cancer Res* 55 (1995) 1643-8.
- Ramana, C. V., N. Grammatikakis, M. Chernov, H. Nguyen, K. C. Goh, B. R. Williams and G. R. Stark. "Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways." *EMBO J* 19 (2000) 263-72.
- Ray, S., K. R. Atkuri, D. Deb-Basu, A. S. Adler, H. Y. Chang, L. A. Herzenberg and D. W. Felsher. "MYC can induce DNA breaks in vivo and in vitro independent of reactive oxygen species." *Cancer Res* 66 (2006) 6598-605.
- Rosenblatt, J., Y. Gu and D. O. Morgan. "Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 2824-8.
- Russell, P. and P. Nurse. "Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog." *Cell* 49 (1987) 559-67.
- Sachdeva, M., S. Zhu, F. Wu, H. Wu, V. Walia, S. Kumar, R. Elble, K. Watabe and Y. Y. Mo. "p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 3207-12.
- Sakamuro, D., V. Eviner, K. J. Elliott, L. Showe, E. White and G. C. Prendergast. "c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms." *Oncogene* 11 (1995) 2411-8.
- Sato, N., K. Sakamaki, N. Terada, K. Arai and A. Miyajima. "Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling." *EMBO J* 12 (1993) 4181-9.
- Schmitt, C. A., M. E. McCurrach, E. de Stanchina, R. R. Wallace-Brodeur and S. W. Lowe. "INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53." *Genes Dev* 13 (1999) 2670-7.
- Schmitt, E., C. Paquet, M. Beauchemin and R. Bertrand. "DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis." *J Zhejiang Univ Sci B* 8 (2007) 377-97.
- Schuhmacher, M., M. S. Staege, A. Pajic, A. Polack, U. H. Weidle, G. W. Bornkamm, D. Eick and F. Kohlhuber. "Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division." *Curr Biol* 9 (1999) 1255-8.
- Shchors, K., E. Shchors, F. Rostker, E. R. Lawlor, L. Brown-Swigart and G. I. Evan. "The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta." *Genes Dev* 20 (2006) 2527-38.
- Sherr, C. J. and F. McCormick. "The RB and p53 pathways in cancer." *Cancer Cell* 2 (2002) 103-12.
- Shibuya, H., M. Yoneyama, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto and T. Taniguchi. "IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc." *Cell* 70 (1992) 57-67.
- Stark, G. R. and W. R. Taylor. "Control of the G2/M transition." *Mol Biotechnol* 32 (2006) 227-48.
- Steiger, D., M. Furrer, D. Schwinkendorf and P. Gallant. "Max-independent functions of Myc in *Drosophila melanogaster*." *Nat Genet* 40 (2008) 1084-91.
- Strasser, A., A. W. Harris, M. L. Bath and S. Cory. "Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2." *Nature* 348 (1990) 331-3.
- Takayama, N., S. Nishimura, S. Nakamura, T. Shimizu, R. Ohnishi, H. Endo, T. Yamaguchi, M. Otsu, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Sawaguchi, R. Nagai, K. Takahashi, S. Yamanaka, H. Nakauchi and K. Eto. "Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells." *J Exp Med* 207 (2010) 2817-30.
- Taub, R., I. Kirsch, C. Morton, G. Lenoir, D. Swan, S. Tronick, S. Aaronson and P. Leder. "Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) 7837-41.
- Thompson, A., Y. Zhang, D. Kamen, C. W. Jackson, R. D. Cardiff and K. Ravid. "Deregulated expression of c-myc in megakaryocytes of transgenic mice increases megakaryopoiesis and decreases polyploidization." *J Biol Chem* 271 (1996) 22976-82.
- Thompson, A., Z. Zhao, D. Ladd, J. Zimmet and K. Ravid. "A new transgenic mouse model for the study of cell cycle control in megakaryocytes." *Stem Cells* 14 Suppl 1 (1996) 181-7.
- Todaro, G. J. and H. Green. "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines." *J Cell Biol* 17 (1963) 299-313.
- Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine. "Surfing the p53 network." *Nature* 408 (2000) 307-10.

- Wang, X., M. Cunningham, X. Zhang, S. Tokarz, B. Laraway, M. Troxell and R. C. Sears. "Phosphorylation regulates c-Myc's oncogenic activity in the mammary gland." *Cancer Res* 71 (2011) 925-36.
- Wang, X. W., Q. Zhan, J. D. Coursen, M. A. Khan, H. U. Kontny, L. Yu, M. C. Hollander, P. M. O'Connor, A. J. Fornace, Jr. and C. C. Harris. "GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 3706-11.
- Wanzel, M., S. Herold and M. Eilers. "Transcriptional repression by Myc." *Trends Cell Biol* 13 (2003) 146-50.
- Waters, C. M., T. D. Littlewood, D. C. Hancock, J. P. Moore and G. I. Evan. "c-myc protein expression in untransformed fibroblasts." *Oncogene* 6 (1991) 797-805.
- Weber, J. D., L. J. Taylor, M. F. Roussel, C. J. Sherr and D. Bar-Sagi. "Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53." *Nat Cell Biol* 1 (1999) 20-6.
- Wert, M., S. Kennedy, H. C. Palfrey and N. Hay. "Myc drives apoptosis in PC12 cells in the absence of Max." *Oncogene* 20 (2001) 3746-50.
- Wu, S., C. Cetinkaya, M. J. Munoz-Alonso, N. von der Lehr, F. Bahram, V. Beuger, M. Eilers, J. Leon and L. G. Larsson. "Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter." *Oncogene* 22 (2003) 351-60.
- Xiang, Z., H. Luo, J. E. Payton, J. Cain, T. J. Ley, J. T. Opferman and M. H. Tomasson. "Mcl1 haploinsufficiency protects mice from Myc-induced acute myeloid leukemia." *J Clin Invest* 120 (2010) 2109-18.
- Yang, B. S., T. J. Geddes, R. J. Pogulis, B. de Crombrughe and S. O. Freytag. "Transcriptional suppression of cellular gene expression by c-Myc." *Mol Cell Biol* 11 (1991) 2291-5.
- Yang, J., E. S. Bardes, J. D. Moore, J. Brennan, M. A. Powers and S. Kornbluth. "Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1." *Genes Dev* 12 (1998) 2131-43.
- Yin, X. Y., L. Grove, N. S. Datta, K. Katula, M. W. Long and E. V. Prochownik. "Inverse regulation of cyclin B1 by c-Myc and p53 and induction of tetraploidy by cyclin B1 overexpression." *Cancer Res* 61 (2001) 6487-93.
- Zeller, K. I., A. G. Jegga, B. J. Aronow, K. A. O'Donnell and C. V. Dang. "An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets." *Genome Biol* 4 (2003) R69.
- Zhan, Q., M. J. Antinore, X. W. Wang, F. Carrier, M. L. Smith, C. C. Harris and A. J. Fornace, Jr. "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45." *Oncogene* 18 (1999) 2892-900.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon and D. R. Green. "The machinery of programmed cell death." *Pharmacol Ther* 92 (2001) 57-70.
- Zindy, F., C. M. Eischen, D. H. Randle, T. Kamijo, J. L. Cleveland, C. J. Sherr and M. F. Roussel. "Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization." *Genes Dev* 12 (1998) 2424-33.

## 10 Danksagung

An dieser Stelle geht mein Dank zuallererst an meinen Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Herrn Privatdozent Dr. med. Ulrich Keller für sein Vertrauen, die wissenschaftliche Förderung und seine stets vorhandene Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Christian Peschel, der mir ermöglichte, meine Dissertation in seiner Abteilung durchzuführen.

Dank sage ich Herrn Professor Dr. med. Justus Duyster und seiner Arbeitsgruppe für die Ausbildung und die große Hilfe bei den Transplantationsversuchen. Ganz besonders gilt hier mein Dank Frau Dr. med. Anna-Lena Illert, Frau Diplom-Biologin Corinna Albers, Herrn Michael Zech, Frau Petra Schenk und Frau Alexandra Stoeckl.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Professor Dr. med. Falko Fend und seiner Frau, Frau Privatdozentin Dr. Leticia Quintanilla-Fend für ihren wissenschaftlichen Rat und die Auswertung der histologischen Präparate.

Ein herzlicher Dank gilt allen Mitgliedern aus meiner Arbeitsgruppe Frau Steffi Graf, Frau Susanne Kratzat, Frau Elke Pietschmann, Herr Jürgen Huber, Herr Ulrich Platz, Herr Markus Scheerer und Frau Sabine Stritzke für ihre Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung der unterschiedlichsten Probleme, insbesondere für ihre gute Kameradschaft und Freundschaft. Danken möchte ich auch Frau Monika Gruber, Frau Madlen Oelsner, Frau Steffi Marz und allen anderen Mitgliedern des Labors für ihre Unterstützung bei meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank richtet sich an meinen langjährigen Kommilitonen, Mitlaboranten und Freund Herrn Dr. med. Benedikt Lampl für anregende Gespräche, seinen unerschütterlichen Optimismus und seine stets positive Einstellung gegenüber allen Dingen sowohl innerhalb des Labors als auch außerhalb des Labors, was mich persönlich bereicherte.

Letztlich ist die vorliegende Arbeit, insbesondere in Bezug auf die jüngere Vergangenheit, in der nicht alles „rund lief“, nur mit Geduld und Hilfe meiner Familie und meiner Freundin Julia in dieser Form entstanden, wofür ich mich sehr herzlich bedanke.

## 11 Lebenslauf

Name: Christian Johannes Fritz

Anschrift: Graf-Stauffenberg-Str.7  
53115 Bonn

E-mail: chris-fritz@gmx.net

Geburtsdatum und –ort: 04.04.1984, München

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

### Ausbildung:

1990 - 1994 Grundschule Icking

1994 - 2003 Gymnasium Icking, Abschluss: Abitur (1,4)

2003 - 2005 Ludwig-Maximilians Universität München/TU München

Medizin (Vorklinische Semester, 1.-4. Semester)

1. Teil der ärztlichen Prüfung (Physikum) Aug. 2005 (2,5)

2005 - 2010 Technische Universität München

Medizin (Klinische Semester, 5.-14. Semester)

2. Teil der ärztlichen Prüfung (Hammerexamen) Jun. 2010 (2,0)

### Famulaturen:

März 2006 Kardiologie (Campus Benjamin Franklin, Universitätsklinikum Charité, Berlin, Prof. Dr. med Heinz-Peter Schultheiss)

August 2006 Onkologie (Klinikum Rechts der Isar, Universitätsklinikum TU München, Prof. Dr. med Christian Peschel)

März 2008 Pädiatrie (Praxengemeinschaft Frau Dr. med. Barbara Przyklenk und Prof. Dr. med Walter Dorsch, München)

August 2008 Pädiatrie (Städt. Krankenhaus München-Harlaching, Kinder- und Jugendheilkunde, Prof. Dr. med Reinhard Roos)

### Praktisches Jahr:

Februar – Juni 2009 Pädiatrie (Kinderklinik Dritter Orden Passau, Lehrkrankenhaus der TU München, Prof. Dr. med Franz Staudt)

Juni – Oktober 2009 Innere Medizin (Department for General Medicine, St.James's Hospital, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland, Senior Lecturer Dr. Nasir Mahmud, MBBS, MD, FRCPI)

Oktober 2009 – Januar 2010 Chirurgie (Städtisches Krankenhaus München-Schwabing, Lehrkrankenhaus der TU München, Klinik für Kinderchirurgie, Prof. Dr. med Stuart Hosie)

Seit Oktober 2010 Assistenzarzt Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Bonn